

САМООРГАНИЗУЮЩИЕСЯ СТРУКТУРЫ И НАНОСБОРКИ

УДК 577.112.083

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА НА РОСТ ЦИАНОБАКТЕРИИ *Arthrospira platensis* И НАКОПЛЕНИЕ С-ФИКОЦИАНИНА

© 2023 г. Я. Э. Сергеева^{1,2,*}, Д. В. Сухинов¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

²Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

*E-mail: yanaes2005@gmail.com

Поступила в редакцию 05.10.2022 г.

После доработки 07.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Свыше половины антропогенных выбросов углерода фиксируется и повторно используется в цикле углерода, при этом до 30% осуществляется с участием цианобактерий. Цианобактерии рода *Arthrospira* являются одними из наиболее широко культивируемых в промышленных масштабах фототрофных микроорганизмов ввиду высокого содержания белка, а также биологически активных соединений с высокой добавленной стоимостью. Исследовано влияние возраста посевного материала (инокулята) на рост цианобактерии *Arthrospira platensis* В-12619 (ВКПМ) при культивировании в колбах Эрленмейера на питательных средах разного состава. Выявлено, что продуктивность биомассы зависит от возраста инокулята и эта зависимость отмечена для всех испытанных составов питательных сред. Максимальный выход С-фикоцианина не менее 300 мг/л достигнут при использовании четырехсуточного инокулята.

DOI: 10.56304/S1992722323010132

ВВЕДЕНИЕ

Высокие выбросы двуокси углерода в результате антропогенной деятельности стали глобальной проблемой. Текущие стратегии контроля выбросов CO₂ включают в себя каталитическое восстановление, повышение энергоэффективности, использование менее углеродоемких видов топлива, ядерную энергию, возобновляемые источники энергии и улучшение биологических поглотителей. Одним из альтернативных способов, который естественным образом способствует улавливанию CO₂, является фитосеквестрация — фиксация атмосферного углерода растениями и фототрофными микроорганизмами (водорослями и цианобактериями) [1].

Известно, что ~57% антропогенных выбросов углерода фиксируется и повторно используется в цикле углерода [2] и до 30% глобальной фиксации углерода осуществляется цианобактериями [3]. По эффективности фиксации углекислого газа фототрофные микроорганизмы, в том числе цианобактерии, в десятки раз превосходят наземные растения [4]. Цианобактерии характеризуются высокой скоростью роста, кроме того, за короткие промежутки времени они способны

синтезировать и накапливать различные ценные компоненты.

Цианобактерии рода *Arthrospira* являются одними из наиболее широко культивируемых в промышленных масштабах фототрофных микроорганизмов в виду высокого содержания белка, а также биологически активных соединений с высокой добавленной стоимостью.

Благодаря присвоению *A. platensis* статуса GRAS (общепризнано безопасным) и значительному содержанию в ней незаменимых аминокислот и жирных кислот, антиоксидантов и витаминов биомасса цианобактерии широко используется как пищевая добавка в виде сухого порошка или капсул, а также как кормовая добавка в животноводстве [5]. Помимо этого, в продукты здорового питания могут включаться биологически активные соединения с высокой добавленной стоимостью (каротиноиды, хлорофиллы, полиненасыщенные жирные кислоты и пр.) [6].

Одним из наиболее ценных компонентов, получаемых из биомассы *A. platensis*, является С-фикоцианин (С-ФЦ) — пигмент-белковый комплекс, обладающий рядом полезных свойств, среди которых антиоксидантные, противовоспалительные, иммуностимулирующие и противора-

ковые [7, 8]. Учитывая эти свойства и естественный насыщенный синий цвет, С-ФЦ используется не только в качестве натурального пищевого красителя, но и как действующий агент для косметической и фармацевтической промышленности, а также как флуоресцентный краситель в лабораторных исследованиях [9]. Кроме того, возможно использование С-ФЦ в проточной цитометрии, флуоресцентном иммуноанализе и флуоресцентной микроскопии [10].

При рассмотрении крупномасштабного (промышленного) производства биомассы фототрофных организмов (микроводорослей и цианобактерий), а также ценных продуктов, синтезируемых данными организмами, одним из ключевых вопросов для исследователей и инвесторов является определение экономической целесообразности производства. Анализ затрат любого производства зависит от досконального знания всех этапов производственного процесса: от входных данных, баланса массы и энергии до деталей используемого оборудования [11].

Доказано, что на активность ростовых процессов и накопление биомассы *Arthrospira*, на ее способность синтезировать белки и С-ФЦ влияет ряд химических и физических факторов, а именно, состав питательной среды, концентрация солей, температура, интенсивность освещения, световой режим, а также параметры культивирования и конфигурации фотобиореактора [5].

Arthrospira, будучи алкофильной, характеризуется стабильным ростом на средах с высоким рН (9–11) и высокими концентрациями солей (карбонаты и бикарбонаты) [12]. Отметим, что бикарбонаты включаются в состав компонентов питательной среды для достижения высокой щелочности, обеспечивая при этом постоянное снабжение источником углерода для оптимального роста [5].

Стандартной, классической, эталонной питательной средой для культивирования *Arthrospira* (*Spirulina*) является среда Заррука [13] ввиду оптимального состава компонентов, который способствует быстрому росту и высокому выходу (г/л) биомассы. Для крупномасштабного культивирования цианобактерии классический состав питательной среды Заррука подвергался различным модификациям за счет изменения концентрации компонентов, а также с использованием недорогих источников питательных веществ [14]. Кроме того, в качестве альтернативы для обеспечения экономической жизнеспособности производства *Arthrospira* были рассмотрены сточные воды [15, 16], промышленные отходы, такие как стоки анаэробного сбраживания, меласса [11].

Отметим, что наряду с данными о составах питательных сред одним из ключевых моментов для создания рентабельного производства и эконо-

мической эффективности культивирования коммерчески значимых цианобактерий и микроводорослей являются фундаментальные знания о физиологии организма, в том числе для подготовки и производства инокулята [11, 17].

Цель исследования – изучение влияния возраста инокулята на рост цианобактерии *A. platensis* и накопление С-ФЦ для стандартизации инокулята.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была выбрана нитевидная цианобактерия *Arthrospira platensis* В-12619 (ВКПМ).

Условия культивирования. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера (объемом 500 мл с 200 мл питательной среды) на питательных средах трех составов [13, 17, 19] в шейкер-инкубаторе Innova 42R (30°C, 140 об./мин, круглосуточное освещение с плотностью потока фотонов 15 ± 1 мкмоль/(м² · с)).

Рост и накопление биомассы контролировали по изменению оптической плотности суспензии клеток при 750 нм (OD₇₅₀, спектрофотометр Genesys 10S UV-Vis) и величине рН.

Биомассу собирали центрифугированием (12500 г, 15 мин, SL40R Thermo Scientific, США), дважды промывали дистиллированной водой и до проведения анализов хранили при –20°C.

Определение характеристик посевного материала. Содержание белка определяли согласно [20], липидов – [21, 22], хлорофиллов – [23].

Продуктивность биомассы цианобактерии рассчитывали по формуле

$$\text{Продуктивность (мг/(л · сутки))} = \frac{m_2 - m_1}{t_2 - t_1}, \quad (1)$$

где m_i (мг/л) – выход биомассы с литра среды, t_i (сутки) – время культивирования.

Экстракция С-фикоцианина. Исчерпывающую экстракцию С-ФЦ из предварительно обработанной (трехкратный цикл замораживание/оттаивание: –20/25°C) влажной биомассы проводили 0.1 М натрий-фосфатным буфером (рН 7.00 ± 0.02) при 4°C. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (20500 г, 30 мин, 4°C), спектры поглощения раствора С-ФЦ снимали в диапазоне 190–700 нм.

Концентрацию (мг/мл) С-ФЦ рассчитывали согласно [24]:

$$\text{С-ФЦ (мг/мл)} = \frac{(A_{620} - 0.474 \times A_{650})}{5.34}, \quad (2)$$

где A_λ – поглощение при λ нм.

Содержание (мг/г) С-ФЦ в биомассе рассчитывали по формуле

$$\text{С-ФЦ}_m \text{ (мг/г)} = \frac{\text{С-ФЦ (мг/мл)} \times V_3 \text{ (мл)}}{m_{6/м} \text{ (г)}}, \quad (3)$$

где V_3 (мл) – объем экстракта С-ФЦ, $m_{6/м}$ (г) – навеска сухой биомассы цианобактерии *A. platensis*, взятой для экстракции.

Выход (мг/л) С-ФЦ с литра питательной среды рассчитывали по формуле

$$\text{С-ФЦ}_v \text{ (мг/л)} = \frac{\text{С-ФЦ (мг/мл)} \times V_3 \text{ (мл)}}{V_a \text{ (л)}}, \quad (4)$$

где V_3 (мл) – объем экстракта С-ФЦ, V_a (л) – объем аликвоты суспензии клеток цианобактерии *A. platensis*, взятой для экстракции.

Статистический анализ. Численные результаты представлены как среднее значение не менее чем трех независимых повторов ($n \geq 3$). Планки погрешностей – стандартное отклонение (SD). Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) и критерий Тьюки использовали для оценки значимости различий (значения $p < 0.05$ считали статистически значимыми).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно [17] для инициации и поддержания культуры необходима минимальная популяция клеток, тогда как для получения инокулята культуры требуется выращенная концентрированная культура цианобактерии. Различные фазы роста отражают изменения в биохимическом составе биомассы.

С целью стандартизации инокулята исследовали влияние возраста посевного материала на рост цианобактерии *A. platensis* и накопление С-ФЦ на питательных средах разного состава.

Отметим, что в публикациях, посвященных культивированию цианобактерий и микроводорослей, количество вносимого посевного материала (инокулята) выражается либо в количестве биомассы в пересчете на сухой вес (не более 200 мг/л), либо как процент (объемный) суспензии клеток (не более 10%), либо указывается начальная величина OD при определенной длине волны (560, 680, 720 или 880 нм).

При проведении исследований посевной материал вносили в питательную среду до достижения начальной величины OD_{750} 0.050, что обусловлено результатами предварительных исследований по влиянию исходной концентрации биомассы на рост цианобактерии (данные не приведены). При культивировании *A. platensis* на классической среде Заррука с начальными величинами OD_{750} 0.050, 0.100, 0.150, 0.200 существенной разницы в конечных (максимальных) значениях не выявлено. Все кривые роста достигали стационарной фазы на 15–16-е сутки (OD_{750} $1.90 \pm$

± 0.05), что согласуется с результатами, полученными в [25].

Согласно [26] при культивировании фототрофных микроорганизмов в начале лаг-фазы можно наблюдать некоторую задержку роста, которая, с одной стороны, может быть связана с наличием в посевном материале нежизнеспособных клеток, с другой, может быть обусловлена периодом физиологической адаптации из-за изменений в питательных веществах или условиях культивирования. Следовательно, сократить лаг-фазу можно при использовании в качестве инокулята клеток в поздней экспоненциальной фазе роста, которые были выращены на той же питательной среде в аналогичных условиях культивирования.

При проведении исследований биомассу *A. platensis*, используемую в качестве инокулята, выращивали на среде того же состава в условиях аналогичных эксперименту.

В данной работе исследовали влияние возраста инокулята при культивировании цианобактерии *A. platensis* на трех питательных средах: среда I – классическая среда Заррука [13] и на двух ее модификациях: среда II – модификации Корнета [18] и среда III – модификации Аиба–Огава [19].

В качестве инокулята использовали 4-, 10- и 17-суточную культуру клеток. В табл. 1 представлены данные о содержании белка, липидов и фотосинтетических пигментов инокулята. Как видно из таблицы, наибольшее содержание белка, липидов и фотосинтетических пигментов отмечено для инокулята, выращенного на среде III. При рассмотрении разновозрастного инокулята отмечено, что 4-суточный инокулят характеризуется максимальным содержанием липидов и белка, за исключением среды II, для которой максимальное содержание белка отмечено для 10-суточного инокулята. Что касается содержания фотосинтетических пигментов (С-ФЦ и хлорофилла), их максимальное содержание было у 10-суточного инокулята независимо от состава среды культивирования.

Кривые роста *A. platensis* на трех испытываемых средах представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, при культивировании цианобактерии на средах I и II стационарная фаза роста, характеризующаяся максимальными значениями OD_{750} , достигнута при использовании 17-суточного инокулята (на 25-е и 23-и сутки культивирования – рис. 1а, 1б соответственно). При использовании более молодого инокулята (4- и 10-суточного) стационарная фаза роста достигалась быстрее (15-е и 17-е сутки соответственно независимо от типа используемой среды), при этом максимальная величина OD_{750} была несколько ниже, чем при использовании 17-суточного инокулята. При анализе кривых роста цианобактерии на среде III установлено, что возраст инокулята не оказывал

Таблица 1. Химический состав разновозрастного инокулята для культивирования *A. platensis* на питательных средах различного состава

Среда, возраст инокулята		Белки, %*	Липиды, %	С-ФЦ мг/г	Хлорофиллы, мг/г
I	4 с	48.02 ± 2.20	7.26 ± 0.33	122.69 ± 6.39	17.43 ± 1.00
	10 с	38.06 ± 2.20	6.65 ± 0.14	232.20 ± 5.71	22.26 ± 0.94
	17 с	36.01 ± 1.54	5.88 ± 0.39	212.59 ± 5.66	19.21 ± 0.47
II	4 с	35.80 ± 3.63	8.72 ± 0.44	110.18 ± 1.45	24.19 ± 2.50
	10 с	43.25 ± 2.11	7.27 ± 0.19	222.21 ± 3.49	27.99 ± 1.22
	17 с	37.30 ± 2.35	4.95 ± 0.46	171.92 ± 7.95	17.09 ± 0.78
III	4 с	56.63 ± 2.47	9.65 ± 0.24	140.84 ± 8.11	19.03 ± 1.03
	10 с	42.09 ± 2.41	7.03 ± 0.55	248.69 ± 6.07	25.77 ± 2.42
	17 с	33.77 ± 1.78	6.16 ± 0.38	209.95 ± 3.65	20.01 ± 0.34

* Процент от сухого веса.

Таблица 2. Влияние возраста инокулята на выход биомассы и С-фикоцианина при культивировании *A. platensis* на питательных средах различного состава

Среда	Возраст инокулята	Биомасса		С-ФЦ, мг/л
		мг/(л · сутки)	г/л	
I	4 с	95.43 ± 0.70	1.30 ± 0.23	299.30 ± 1.15
	10 с	91.55 ± 0.35	1.28 ± 0.18	290.52 ± 3.63
	17 с	66.81 ± 0.10	1.42 ± 0.27	281.45 ± 2.53
II	4 с	75.56 ± 0.56	1.12 ± 0.07	201.63 ± 2.28
	10 с	71.43 ± 0.36	1.12 ± 0.04	198.15 ± 2.31
	17 с	60.21 ± 0.30	1.18 ± 0.10	147.74 ± 1.64
III	4 с	76.14 ± 0.68	1.40 ± 0.14	332.05 ± 4.19
	10 с	75.85 ± 0.33	1.37 ± 0.09	311.28 ± 2.42
	17 с	63.24 ± 0.21	1.42 ± 0.10	292.03 ± 2.32

существенного влияния на максимальную величину биомассы (отклонения значений OD_{750} статистически незначимы). Кроме того, кривые роста при культивировании *A. platensis* на среде III при 4- и 10-суточном инокуляте практически идентичны (рис. 1в).

В табл. 2 приведены данные о максимальном выходе биомассы цианобактерии: при культивировании на среде II выход биомассы с литра среды (1.12–1.18 г/л) был меньше, чем на средах I (1.28–1.42 г/л) и III (1.37–1.42 г/л). Отметим, что биомасса с использованием самого молодого инокулята характеризовалась наибольшей продуктивностью: для среды I продуктивность составила ~95 мг/(л·сутки) и ~76 мг/(л·сутки) для сред II и III (табл. 2). Независимо от состава питательной среды выявлена зависимость продуктивности биомассы (мг/(л·сутки)) от возраста инокулята: снижение продуктивности при увеличении возраста инокулята.

Полученные данные отличаются от полученных ранее для *Spirulina platensis* (из коллекции Центра изучения автотрофных микроорганизмов Национального исследовательского совета университета Флоренции, Италия) [27]. Согласно которым при культивировании в колбах Эрленмейера на 500 мл с 200 мл питательной среды в экспериментах с 10- и 14-суточным инокулятом был отмечен слабый рост, а при культивировании в 5-литровых емкостях в опыте с 14-суточным инокулятом роста не наблюдали. Это объяснили тем фактом, что клетки находились в фазе отмирания и была нарушена адаптация к условиям культивирования. Таким образом, используемая в настоящей работе *A. platensis* В-12619 обладает большей жизнеспособностью.

В результате определения выхода С-ФЦ (мг/л) установлено, что независимо от типа питательной среды максимальный выход достигается при использовании 4-суточного инокулята, при этом

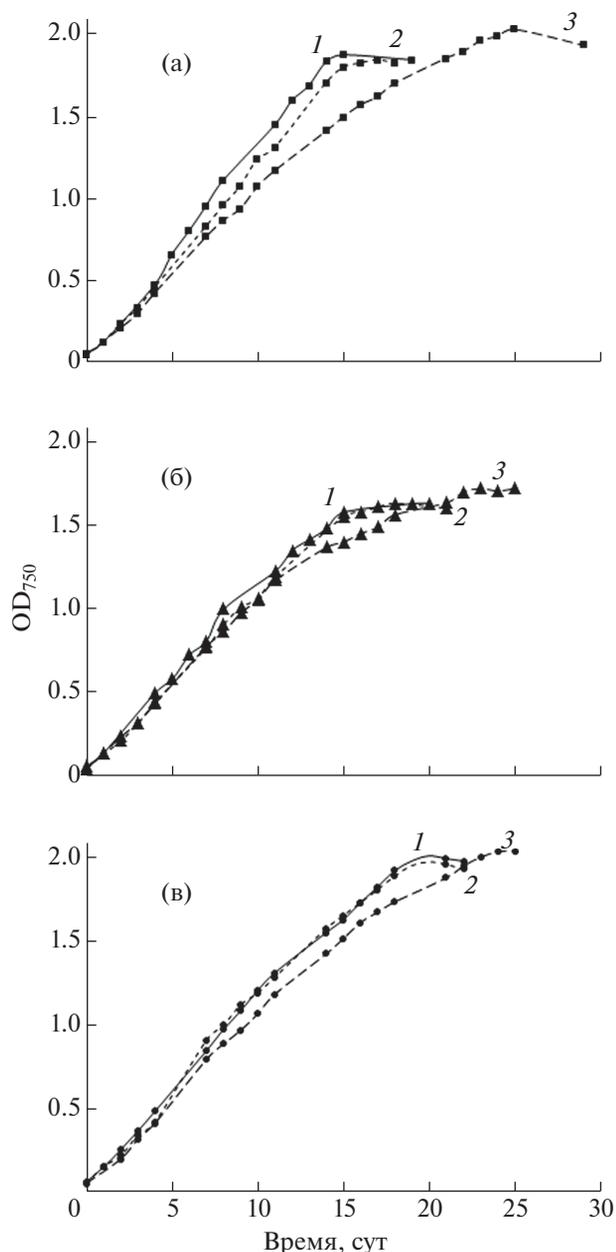


Рис. 1. Кривые роста цианобактерии *A. platensis* на среде I (а), II (б) и III (в) при засеве 4- (1), 10- (2) и 17-суточным (3) инокулятом.

максимальный выход на среде II составил ~200 мг/л, на среде I ~300 и ~330 мг/л на среде III.

Таким образом, при культивировании на среде II выход биомассы и С-ФЦ с литра среды был наименьшим для трех исследованных сред. Тогда как среды I и III могут быть рекомендованы для дальнейших исследований процесса масштабирования для выращивания цианобактерии *A. platensis* В-12619 для получения С-ФЦ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью стандартизации инокулята для культивирования цианобактерии *A. platensis* исследовано влияние возраста инокулята (посевного материала) на рост культуры и накопление С-ФЦ на классической питательной среде Зарукка и двух ее модификациях.

Выявлена зависимость продуктивности биомассы от возраста инокулята для всех испытанных составов питательных сред.

Максимальный выход С-ФЦ не менее 300 мг/л был достигнут при использовании 4-суточного инокулята.

Работа выполнена в рамках тематического плана исследований НИЦ “Курчатовский институт” 1.8. “Создание платформенной технологии для глубокой переработки биомассы фототрофных микроорганизмов с получением широкого спектра востребованной химической продукции”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nogia P., Sidhu G.K., Mehrotra R., Mehrotra S.* // Int. J. Low-Carbon Technol. 2016. V. 11. № 2. P. 266. <https://doi.org/10.1093/IJLCT/CTT077>
2. *Friend A.D., Geider R.J., Behrenfeld M.J., Still C.J.* // Photosynthesis in silico. Dordrecht: Springer, 2009. P. 465. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9237-4_20
3. *Noreña-Caro D., Benton M.G.* // J. CO₂ Util. 2018. V. 28. P. 335. <https://doi.org/10.1016/J.JCOU.2018.10.008>
4. *Yadav G., Sen R.* // J. CO₂ Util. 2017. V. 17. P. 188. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2016.12.006>
5. *Thevarajah B., Nishshanka G.K.S.H., Premaratne M. et al.* // Biochem. Eng. J. 2022. V. 185. P. 108541. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2022.108541>
6. *Nass P.P., do Nascimento T.C., Fernandes A.S. et al.* // Food Res. Int. 2022. V. 157. P. 111469. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111469>
7. *Furmaniak M.A., Misztak A.E., Franczuk M.D. et al.* // Front. Microbiol. 2017. V. 8. DEC. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02541>
8. *Liu Q., Huang Y., Zhang R. et al.* // Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7803846>
9. *Seyedi S., Parvin P., Jafarholi A. et al.* // Spectrochim. Acta. A. 2020. V. 239. P. 118468. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118468>
10. *Li W., Su H.N., Pu Y. et al.* // Biotechnol. Adv. 2019. V. 37. № 2. P. 340. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.008>
11. *Costa J.A.V., Freitas B.C.B., Rosa G.M. et al.* // Biore-sour. Technol. 2019. V. 292. P. 121946. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121946>
12. *Soni R.A., Sudhakar K., Rana R.S.* // Energy Reports. 2019. V. 5. P. 327. <https://doi.org/10.1016/J.EGYR.2019.02.009>

13. *Zarrouk C.* Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Seth et Gardner) Geitler. University of Paris (1966). Thesis. (In French)
14. *Yuan D., Yao M., Wang L. et al.* // *Algal Res.* 2019. V. 44. P. 101718.
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101718>
15. *Olguin E.J., Galicia S., Mercado G., Pérez T.* // *J. Appl. Phycol.* 2003. V. 15. № 2. P. 249.
<https://doi.org/10.1023/A:1023856702544>
16. *Wuang S.C., Khin M.C., Chua P.Q.D., Luo Y.D.* // *Algal Res.* 2016. V. 15. P. 59.
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.02.009>
17. *Soni R.A., Sudhakar K., Rana R.S.* // *Trends Food Sci. Technol.* 2017. V. 69. P. 157.
<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.09.010>
18. *Cornet J.F., Dussap C.G., Cluzel P., Dubertret G.* // *Bio-technol. Bioeng.* 1992. V. 40. № 7. P. 826.
<https://doi.org/10.1002/bit.260400710>
19. *Aiba S., Ogawa T.* // *J. Gen. Microbiol.* 1977. V. 102. № 1. P. 179.
<https://doi.org/10.1099/00221287-102-1-179>
20. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J.* // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
21. *Liu J., Liu Y., Wang H., Xue S.* // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 176. P. 284.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.094>
22. *Сергеева Я.Э., Мостова Е.Б., Горин К.В. и др.* // *Биотехнология.* 2017. Т. 33. № 1. С. 53.
<https://doi.org/10.21519/0234-2758-2017-33-1-53-61>
23. *Lichtenthaler H.K., Buschmann C.* // *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 2001. V. 1. № 1. P. F4.3.1.
<https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
24. *Bennett A., Bogorad L.* // *J. Cell Biol.* 1973. V. 58. № 2. P. 419.
25. *Delrue F., Alaux E., Moudjaoui L. et al.* // *Ferment.* 2017. V. 3. № 4. P. 59.
<https://doi.org/10.3390/FERMENTATION3040059>
26. *Lee Y.K.* // *Algae Biotechnol.* 2016. P. 1.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_1
27. *Pelizer L.H., Danesi E.D.G., Rangel C. de O. et al.* // *J. Food Eng.* 2003. V. 56. № 4. P. 371.
[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00209-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00209-1)