

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 577.114;579.22

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *Euglena gracilis* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПАРАМИЛОНА НА СРЕДАХ, ПО СОСТАВУ ПРИБЛИЖЕННЫХ К СТОЧНЫМ ВОДАМ

© 2022 г. К. В. Горин*

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: Gorin_KV@nrcki.ru

Поступила в редакцию 23.12.2021 г.

После доработки 14.01.2022 г.

Принята к публикации 17.01.2022 г.

Фототрофные микроорганизмы считаются перспективным возобновляемым источником для получения различных ценных продуктов, таких как белки, жирные кислоты, углеводы, пигменты, антиоксиданты и др. Одним из таких соединений является полисахарид парамилон, синтезируемый одноклеточным фототрофным микроорганизмом *Euglena gracilis*.

DOI: 10.56304/S2782375X22010120

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время фототрофные микроорганизмы (ФМ) рассматриваются в качестве перспективного экологически чистого возобновляемого сырья для производства продуктов питания, кормов, материалов, химических препаратов, топлива и различных ценных продуктов (таких как белки, жирные кислоты, углеводы, пигменты, антиоксиданты и др.) [1, 2]. ФМ обладают рядом преимуществ по сравнению с высшими растениями: высокой скоростью роста и поглощения диоксида углерода из атмосферы, могут расти на пресной и морской воде, а также могут быть выращены в сточных водах [3].

Euglena gracilis – вид одноклеточных фототрофных протистов, обитающих преимущественно в пресных биотопах. *E. gracilis* способна расти фотоавтотрофно (используя солнечный свет), гетеротрофно (используя внешний источник углерода) и миксотрофно (объединяет оба способа), а также способна к фагоцитозу. Промышленно значимые биопродукты, синтезируемые *E. gracilis*, включают в себя белки, содержащие незаменимые аминокислоты, липиды и β -1,3-глюкан парамилон. *E. gracilis* обладает естественными способностями, обеспечивающими переносимость ряда внешних стрессовых факторов, включая кислотные условия выращивания и ионизирующее излучение, а также способны связывать тяжелые металлы. *E. gracilis* может накапливать большие количества запасного полисахарида парамилон- β -1,3-глюкана, который может составлять до 80% от сухой массы клетки. Парамилон и

другие β -1,3-глюканы представляют особый интерес из-за их иммуностимулирующей и антимикробной активности. Также имеются результаты, показывающие, что β -1,3-глюканы снижают уровень холестерина и обладают противодиабетической, антигипогликемической и гепатопротекторной активностью, а также используются для лечения рака прямой кишки и желудка [4].

С другой стороны, во многих научных работах показано использование ФМ, в том числе и *E. gracilis*, для эффективной очистки различных видов сточных вод с последующим получением из биомассы различных ценных продуктов, например таких, как биотопливо [5].

В настоящей работе рассмотрена возможность культивирования фототрофного микроорганизма *E. gracilis* ССАР 1224/5Z на питательной среде, имитирующей сточные воды, с целью накопления биомассы и полисахарида парамилона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали культуру *Euglena gracilis* ССАР 1224/5Z из коллекции культур водорослей и простейших. Была выбрана *E. gracilis*, так как данная культура активно растет на богатых органическими веществами средах.

Посевной материал культуры *E. gracilis* выращивали на среде HUT [6]. Питательную среду готовили на дистиллированной воде, pH питательной среды доводили до 7 с помощью pH-метра путем добавления в среду раствора гидроксида натрия или соляной кислоты. Выращивание про-

водили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 150 мл питательной среды с постоянным перемешиванием со скоростью 100 об./мин на шейкере Thermo Scientific MaxQ 2000. Температуру при культивировании поддерживали на уровне $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Культура росла в условиях постоянного искусственного освещения люминесцентной лампой в течение дня и ночи (20 Вт, 6400 К) при интенсивности 3000 Лк. Состав питательной среды HUT представлен табл. 1. Также в питательную среду добавляли 1 мл исходного раствора микроэлементов. Состав исходного раствора микроэлементов представлен в табл. 2.

Все эксперименты проводили в колбах объемом 250 мл с 150 мл питательной среды с постоянным перемешиванием со скоростью 100 об./мин на шейкере Thermo Scientific MaxQ 2000. Температуру при культивировании поддерживали на уровне $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Культура росла в условиях постоянного искусственного освещения люминесцентной лампой в течение дня и ночи (20 Вт, 6400 К) при интенсивности 3000 Лк. В качестве питательной среды использовали синтетическую среду X1, имитирующую сточные воды с типичным весенним или осенним составом [7]. Состав среды X1 в мг/л представлен в табл. 3.

Контроль роста культуры осуществляли путем измерения оптической плотности на спектрофотометре Thermo Scientific Genesys 10s UV-Vis при длине волны источника 750 нм.

После культивирования суспензию культуры *E. gracilis* центрифугировали при 5000 об./мин на центрифуге Awel Mf 20. Биомасса подвергалась разрушению при помощи ультразвуковой ванны (35 кГц, 0.2 кВт). Ультразвуковое разрушение проводили циклами по 1 мин. Целостность клеток *E. gracilis* проверяли после каждого цикла с помощью микроскопа Nikon Eclipse E200 MV RS, разрушение повторяли, если в обработанном образце были обнаружены неразрушенные клетки.

Очистку дезинтегрированной биомассы проводили ресуспендированием в растворе, содержащем 1% додецилсульфата натрия. Суспензию инкубировали в течение двух дней при 37°C . Затем гранулы парамилоната извлекали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об./мин. Промывку гранул парамилоната дистиллированной водой и центрифугирование повторяли 2 раза. После второй промывки гранулы высушивали при 60°C до постоянной массы. Выход парамилоната ($Y_{P/X}$) рассчитывался по формуле

$$Y_{P/X} = (P - P_0)/(X - X_0),$$

где P и P_0 – количество парамилоната в конце и начале культивирования соответственно, X_0 и X – количество биомассы в начале и в конце культивирования соответственно [8].

Таблица 1. Состав среды HUT

Компонент питательной среды	Концентрация, мг/л
KH_2PO_4	20
NH_4Cl	288.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25
Ацетат натрия	400
Дрожжевой экстракт	40

Таблица 2. Состав микроэлементов для питательной среды

Компонент питательной среды	Концентрация, мг/л
EDTA	5000
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100
MnCl_2	30
H_3BO_3	300
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200
CuCl_2	10
$\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	20

Таблица 3. Состав питательной среды X1

Компонент питательной среды	Концентрация, мг/л
Глюкоза	1000
NH_4Cl	95.5
KH_2PO_4	22.6
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12.6
NaHCO_3	309
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	56.3
Дрожжевой экстракт	35

Определение абсолютно сухого вещества биомассы проводили высушиванием образца до постоянной массы.

В предварительно взвешенный стеклянный бюкс помещали точную навеску влажной биомассы и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 95°C в течение двух часов. Далее образец биомассы охлаждали до комнатной температуры в эксикаторе над слоем хлорида кальция, взвешивали и повторно выдерживали в сушильном шкафу в течение 45 мин, после чего образец охлаждали и взвешивали.

Количество выросшей биомассы (X) определяли по формуле

$$X = X - X_0,$$

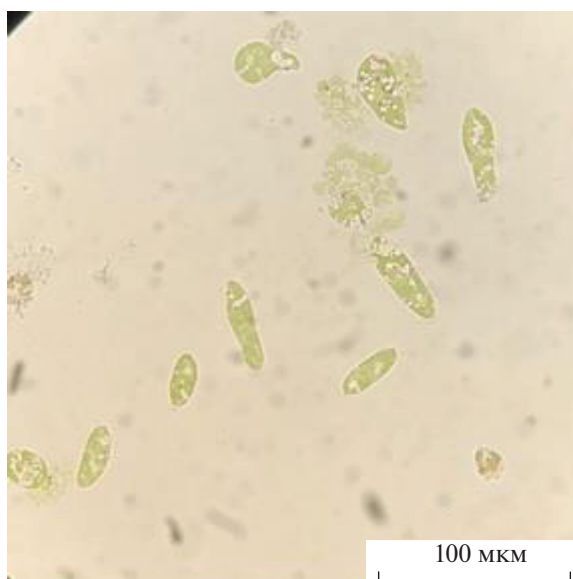


Рис. 1. Микрофотография культуры *E. gracillis* в проходящем свете.

где X_0 и X – количество биомассы в начале и в конце культивирования соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выращивание культуры *E. gracillis* осуществляли в люминостате при условиях, описанных выше, в течение девяти дней. Микрофотография культуры в экспоненциальной фазе роста *E. gracillis*, выращенной на среде X1, представлена на рис. 1. Выход парамилона после девяти суток культивирования в представленных условиях составил 61.7%.

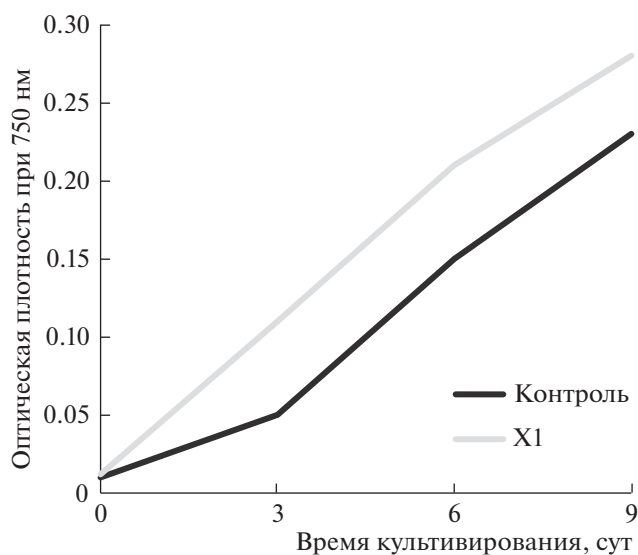


Рис. 2. Сравнение роста культуры *E. gracillis* на экспериментальной и контрольной среде.

Начальная концентрация клеток *E. gracillis* для контрольной среды и X1 была одинаковой. С первого дня культивирования на среде X1 рост культуры был быстрее, чем в контроле (рис. 2).

Согласно полученным данным выход биомассы на среде X1 на 17.8% больше, чем на контрольной среде.

Измерение pH в процессе роста культуры *E. gracillis* проводили в течение девяти суток. Исходные pH для экспериментальной и контрольной среды – 7.0 и 9.1 соответственно. Для контроля наблюдалось увеличение pH до 8.8, в случае с синтетической средой pH снизился до 8.4 (рис. 3).

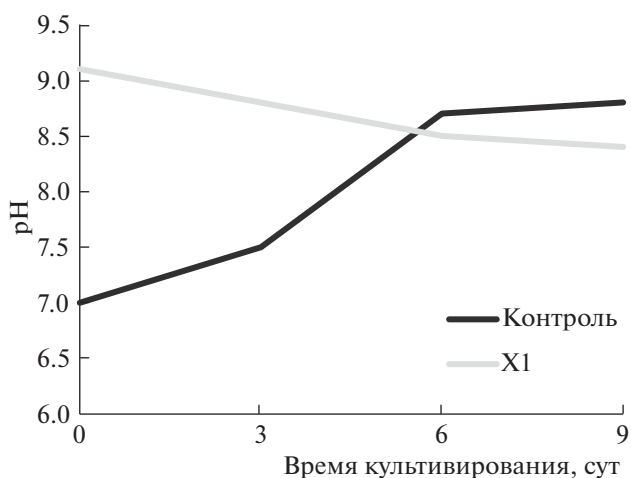


Рис. 3. Изменение pH в процессе роста культуры *E. gracillis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность эффективного культивирования *E. gracillis* на среде, имитирующей сточные воды. Продуктивность по биомассе на экспериментальной среде выше, чем на контрольной. Выход парамилона составил 61.7%.

Работа выполнена в рамках тематического плана 1.12 “Разработка научно-технических основ для создания автономных систем жизнеобеспечения для использования в условиях Крайнего Севера, Арктики и космоса” НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khan M.I., Shin J.H., Kim J.D. // Microb. C. Fact. 2018. V. 17. № 1. P. 1239.
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
2. Chew K.W. // Bioresour. Technol. 2017. V. 229. P. 53.
3. Горин К.В. // Вестник ВИТ “ЭРА”. 2021. Т. 2. № 2. С. 5.
4. Gissibl A., Sun A., Care A. et al. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. V. 7. P. 1.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108>
5. Mahapatra D.M., Chanakya H.N., Ramachandra T.V. // J. Appl. Phycol. 2013. V. 25. № 3. P. 855.
6. Kim S., Wirasmita R., Lee D. et al. // Appl. Sci. 2021. V. 11. № 17. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/app11178182>
7. Salgueiro J.L., Pérez L., Maceiras R. et al. // Int. J. Environ. Res. 2018. V. 4. P. 765.
<https://doi.org/10.1007/s41742-018-0129-4>
8. Ivušić F., Šantek B. // Bioproc. Biosyst. Eng. 2015. V. 38. № 6. P. 1103.
<https://doi.org/10.1007/s00449-015-1353-3>