

УДК 579.66 579.266.

НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА В БИОМАССЕ *NANNOCHLORIS SP. NAUMANN* IPPAS C-1509 В УСЛОВИЯХ НАПРАВЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

О.Р. Левчук, Ю.Г. Базарнова

*ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Высшая школа биотехнологий и пищевых производств,
г. Санкт-Петербург, Россия
levchuk.or@edu.spbstu.ru*

Использование биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов — микроводорослей и цианобактерий, которые способны поглощать углекислый газ и превращать его в ценные пищевые вещества может стать альтернативой традиционным кормовым источникам. Внедрение углеродно-нейтральных биотехнологий с использованием микроводоросли *Nannochloris sp.* для перехода к технологиям с нулевым выбросом углерода и получением сырья с высоким содержанием «одноклеточного» белка, который содержит все необходимые аминокислоты и превосходит по качеству другие кормовые продукты. Цель данной работы: исследовать влияние содержания бикарбонатного углерода на накопление белка в биомассе *Nannochloris sp.* в стационарной фазе роста при культивировании. Результаты исследований влияния содержания растворенного диоксида углерода на накопление белка в биомассе *Nannochloris sp.* в стационарной фазе роста позволили выявить критическую концентрацию HCO_3^- , при которой достигается максимальное содержание белковых веществ в полученной биомассе. Полученные результаты согласуются с литературными данными и открывают перспективы использования культуры *Nannochloris sp.* для производства высокобелковых кормовых ингредиентов.

Ключевые слова: фотосинтезирующие микроорганизмы, *Nannochloris sp.*, направленное культивирование, концентрацией HCO_3^- в питательной среде, стационарная фаза роста, содержание белка в биомассе

ACCUMULATION OF PROTEIN IN THE BIOMASS OF *NANNOCHLORIS SP. NAUMANN* IPPAS C-1509 UNDER DIRECTED CULTIVATION CONDITIONS

O.R. Levchuk, Yu.G. Bazarnova

*Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic
University, St. Petersburg, Russia.
levchuk.or@edu.spbstu.ru*

The use of biomass of photosynthetic microorganisms - microalgae and cyanobacteria, which are capable of absorbing carbon dioxide and converting it into valuable nutrients, can become an alternative to traditional feed sources. Implementation of carbon-neutral biotechnologies using microalgae *Nannochloris sp.* to transition to technologies with zero carbon emissions and obtain raw materials with a high content of “single-cell” protein, which contains all the necessary amino acids and is superior in quality to other feed products. The purpose of this work: to study the effect of dissolved carbon dioxide on the accumulation of protein in the biomass of *Nannochloris sp.* in the stationary growth phase during cultivation. Research results: the influence of dissolved carbon dioxide content on protein accumulation in the biomass of *Nannochloris sp.* in the stationary phase of growth made it possible to identify the critical concentration of HCO_3^- at which the maximum content of protein substances in the resulting

biomass is achieved. The results obtained are consistent with the literature data and open up prospects for using the culture of *Nannochloris* sp. for the production of high-protein feed ingredients.

Keywords: photosynthetic microorganisms, *Nannochloris* sp., targeted cultivation, HCO_3^- concentration in the nutrient medium, stationary growth phase, protein content in biomass

Введение

Перспективы развития биоэкономики связаны с внедрением технологий декарбонизации, которые включают поглощение и утилизацию CO_2 и призваны осуществлять переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству для повышения качества продуктивности сельского хозяйства и обеспечения продовольственной безопасности. Основными источниками выбросов CO_2 являются нефтехимические и биотехнологические промышленные производства [1]. Примерно 60% атмосферных выбросов CO_2 поглощается гидросферой, частично преобразовываясь в карбонаты и бикарбонаты. Процесс постоянного газообмена обеспечивает возврат части газообразного CO_2 из гидросферы обратно в атмосферу [1].

Именно характер продовольствия, как базовый показатель жизнедеятельности человека, выступает основным индикатором социально-экономического развития России. Проблема обеспечения населения продуктами питания в сохранения баланса с природными экосистемами требует инновационных решений [5,15]. Использование потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов, таких как водоросли и цианобактерии, которые способны поглощать углекислый газ и превращать его в органическое вещество, позволяет быстро синтезировать ценные биопродукты и может стать альтернативой традиционным источникам кормов. Биомасса фотосинтезирующих микроорганизмов содержат большое количество белков, углеводов, липидов, витаминов и других биологически активных веществ, что делает их перспективным источником ингредиентов для кормов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных [5,9,20].

Дефицит белка в рационах человека и сельскохозяйственных животных является одной из глобальных проблем в современной экономике и актуальна во всем мире [2,12]. В Мордовии дефицит протеина, макроэлементов и витаминов в кормах для поросят составляет 25–90% [3]. В Беларуси дефицит сырого протеина в кормах молочного скота зимой достигает 40% [13], что приводит к потере 30–35% молока [14]. Также удлиняется сервис-период молочного скота, увеличивается возраст первого отёла. А также, если содержание белка в рационе жвачных животных составляет 20–25 %, это приводит к снижению производства продукции на 30–34 %, увеличению себестоимости продукции в 1,5 раза и повышению расхода кормов в 1,3–1,4 раза по сравнению со сбалансированным по протеину рационом [4,6,7]. Дефицит протеина в корме также влияет на нормальное функционирование органов и систем, включая механизмы естественной резистентности. Например, у кур недостаток протеина и низкая питательность рациона вызывают расклёв пальцев ног, кожи и тканей тела [11].

Решением данной проблемы может служить внедрение углеродно-нейтральных биотехнологий с использованием микроводоросли *Nannochloris* sp. для перехода к технологиям с нулевым выбросом углерода и получением сырья с высоким содержанием «одноклеточного» белка, который содержит все необходимые аминокислоты и превосходит по качеству другие кормовые продукты [21]. Урожай биомассы микроводорослей с 1 га как сырья по содержанию белка равен урожаю пшеницы с 25 га и картофелю с 10 га [2]. Питательная ценность 1 кг биомассы микроводорослей в целом равнозначна 4–5 кг сои. При добавлении 5–7 кг массы сухого вещества микроводоросли к 1 т зерна биологическая ценность последнего возрастает в 1,5 раза [16].

Цель данной работы: исследовать влияние содержания бикарбонатного углерода на накопление белка в биомассе *Nannochloris* sp. в стационарной фазе роста при культивировании.

Материалы и методы исследований.

Для выполнения поставленной цели использовали культуру одноклеточных водорослей *Nannochloris sp. Naumann* штамм IPPAS C-1509 из коллекции Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта (г. Калининград).

Культивирование.

Культивирование микроводорослей *Nannochloris sp.* осуществляли в лабораторном фотобиореакторе (ФБР) цилиндрической формы с размерными параметрами (0.40×0.1 м) и объемом 1 л [22].

Цикл культивирования культуры составлял 10 сут; концентрация вносимой маточной культуры – 0,3-0,5 млн. клеток/мл. В качестве питательной среды использовали среду Заррука, модифицированную по микроэлементному составу и концентрации NaHCO_3 , которая варьировалась от 0,2 до 0,4 моль/л (с шагом 0.05 моль/л) (табл. 1). В качестве контроля сравнения использовали среду Заррука без добавок NaHCO_3 [1].

Таблица 1

Состав модифицированной питательной среды Заррука [17]

<i>Макроэлементы</i>			
Вещество	Количество массы вещества в питательной среде (г/л)	Молекулярная масса (г/моль)	Концентрация вещества в маточном растворе (моль/л)
NaHCO_3	0.0÷33.6	0.0÷168.00	0.0÷0.4
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1	228.23	$4.4 \cdot 10^{-3}$
NaNO_3	2.5	84.99	$2.9 \cdot 10^{-2}$
K_2SO_4	1	174.25	$5.7 \cdot 10^{-3}$
NaCl	1	58.44	$1.7 \cdot 10^{-2}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	246.48	$8.1 \cdot 10^{-4}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04	147.01	$2.7 \cdot 10^{-4}$
<i>Микроэлементы 1</i>			
H_3BO_3	2.86	61.83	$4.6 \cdot 10^{-2}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81	197.91	$9.1 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22	287.53	$7.8 \cdot 10^{-4}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08	249.66	$3.2 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	241.96	$4.1 \cdot 10^{-4}$
<i>Микроэлементы 2</i>			
NH_4VO_3	0.023	116.98	$1.9 \cdot 10^{-4}$
$\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$	0.096	998.80	$9.6 \cdot 10^{-5}$
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.048	280.86	$1.7 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.018	329.84	$5.5 \cdot 10^{-5}$
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.044	182.94	$2.4 \cdot 10^{-4}$
<i>Специальный раствор</i>			
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0249	270.21	$9.2 \cdot 10^{-5}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0302	372.24	$8.1 \cdot 10^{-5}$

В процессе культивирования осуществляли барботирование клеточной суспензии воздухом в непрерывном режиме со скоростью 1,5 л/мин. Температурный диапазон культивирования составлял $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$. pH среды поддерживали в диапазоне 8-10 [1].

Световой режим культивирования *Nannochloris sp. Naumann*: «день (16 ч) – ночь (8 ч)». В качестве источников освещения использовали светодиодные матрицы, состоящие из 25 ламп ТИС-15MIP с суммарным световым потоком 2300 Лм и суммарной мощностью светового потока 11 000

Лк, которую оценивали с помощью люксметра Ю116 и фотоэлемента Ф55С (ПрофКиП, Россия) [1].

Концентрирование биомассы.

Концентрирование биомассы проводили центрифугированием на аппарате ЦЛн-16 в режиме 6000 об/мин в течение 10 мин. с дальнейшим декантированием надосадочной жидкости. Биомасса промывалась дистиллированной водой для удаления остаточной питательной среды.

Определение содержания белковых веществ в биомассе.

К 10 мг лиофилизированной биомассы добавляли 10 мл дистиллированной воды. Дезинтеграцию клеток осуществляли на механическом гомогенизаторе при 5000 об/мин в течение 2 минут с охлаждением льдом. Затем проводили центрифугирование при 8000 об/мин в течение 15 минут для отделения белковых веществ. Для определения белковых веществ использовали метод [11]. Для получения калибровочной зависимости использовали яичный альбумин (ЯА) и серию разведений с концентрацией белка в субстрате от 10 до 50 мкг/мл. В 0,1 мл белкового субстрата вносили 5 мл реактива Bradford, выдерживали 10 мин при комнатной температуре для образования окрашенного комплекса и измеряли оптическую плотность при 595 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1280. Концентрацию белка рассчитывали по калибровочному графику [10].

Полученные результаты и их обсуждение.

Полученные результаты отображены на рис. 1, который демонстрирует зависимость накопления белка от концентрации HCO_3^- в питательной среде в процессе культивирования. Максимальная концентрация белковых веществ в биомассе достигается при культивировании *Nannochloris sp.* в питательной среде с концентрацией HCO_3^- 0,35 моль/л. Установлена линейная корреляция концентрации HCO_3^- в питательной среде и содержания белковых веществ в полученной биомассе. Однако, использование концентраций HCO_3^- свыше 0,35 моль/л вызывает снижение содержания белка в биомассе. Таким образом, для получения наибольшего содержания белка в биомассе *Nannochloris sp.* наиболее эффективной концентрацией HCO_3^- в питательной среде является 0,35 моль/л.

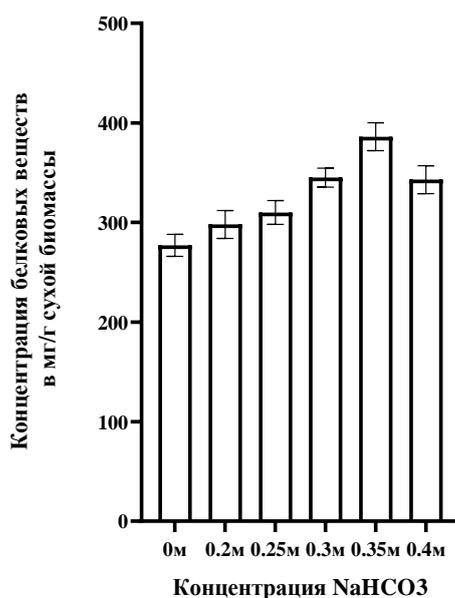


Рисунок 1. Зависимость содержания белковых веществ в биомассе *Nannochloris sp.* от концентрации HCO_3^- в питательной среде в процессе культивирования

Полученные результаты согласуются с данными, полученными ранее авторами Медведевой А.С, Синетовой М.А. и Сидоровом Р.А., которые установили, что культура *Nannochloris sp.* способна накапливать белок в количестве 400-500 мг/г (в экспоненциальной фазе роста) и 300 мг/г (в стационарной фазе) в условиях направленного культивирования на питательных средах с добавками HCO_3^- в количестве 0,2 моль/л [8].

Заключение.

Результаты исследований влияние содержания растворенного диоксида углерода на накопление белка в биомассе *Nannochloris sp.* в стационарной фазе роста позволили выявить критическую концентрацию HCO_3^- , при которой достигается максимальное содержание белковых веществ в полученной биомассе. Полученные результаты согласуются с литературными данными и открывают перспективы использования культуры *Nannochloris sp.* для производства высокобелковых кормовых ингредиентов.

Библиографический список

1. Базарнова Ю.Г., Левчук О.Р., Гинак А.И. Кинетические закономерности поглощения HCO_3^- и роста биомассы *Nannochloris sp.* Naumann IPPAS C-1509 в условиях направленного культивирования. *Бутлеровские сообщения*. 2023. Т.76. №12. С.83-92. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/23-76-12-83
2. Ганущенко О. Ф., Соболев Д. Т. Организация рационального кормления коров с использованием современных методов контроля полноценности их питания. – 2016.
3. Гурьянов, А.М. Оптимизация уровня белково–витаминно–минеральных добавок в рационах молодняка свиней / А.М. Гурьянов, В.А. Кокорев, А.В. Борин // Животноводство и ветеринарная медицина; ФГБНУ Мордовский НИИСХ. – Саранск. – 2016. – С. 29–37.
4. Кузнецова Е. А., Череповицына А. А. Утилизация углекислого газа и циркулярная экономика: мир, Россия, Арктика // Север и рынок: формирование экономического порядка. – 2021. – №. 4. – С. 42.
5. Кузьминых, А.Н. Урожайность и качество викозлаковых агроценозов в условиях дерново–подзолистой почвы Нечерноземной зоны / А.Н. Кузьминых, Г.И. Пашкова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – С. 52–55.
6. Кучин, Н.Н. Проблемы дозирования сыпучих консервантов / Н.Н. Кучин., М.С. Жужин, А.Н. Смирнов // Вестник НГИЭИ. – 2016. – №6 (61). – С. 60–65.
7. Марков С. А. Использование водорослей для получения биотоплива и удаления избытка углекислого газа из атмосферы // Альтернативная энергетика и экология. – 2009. – №. 2. – С. 83-90.
8. Медведева А. С. и др. Характеристика биотехнологического потенциала штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – №. 3.
9. Музафаров, А.М. Культивирование и применение микроводорослей / А.М. Музафаров, Т.Т. Таубаев. – Ташкент: Фан УзССР. – 1984. – 136 с.
10. Невмержицкая, Ю.Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): Учебно-методическое пособие / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. – К: Казанский университет, 2012. – 3 с.
11. Нуралиев, Е.Р. Производственные опыты по изучению мер борьбы и профилактики каннибализма кур в промышленном птицеводстве / Е.Р. Нуралиев, И.И. Кочиш // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – №3. – С. 117–120.
12. Остякова М. Е. Болезни обмена веществ крупного рогатого скота, связанные с неполноценным кормлением // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2015. – №. 12. – С. 195-198.

13. Райхман, А.Я. Эффективность использования злаково–бобового сена и сенажа в рационах лактирующих коров / А.Я. Райхман // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Ч. 1. – Горки: БГСХА. – 2017. – С. 238–246.
14. Соболева, Н.В. Качество кормов из люцерны посевной и козлятника восточного / Н.В. Соболева, И.А. Бабичева, С.В. Карамаев, А.С. Карамаева // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – С. 103–105.
15. Шинкевич П. С., Политаева Н. А. Применение микроводорослей в ССУ технологиях // Рациональное использование природных ресурсов и переработка техногенного сырья: фундаментальные проблемы науки, материаловедение, химия и биотехнология. – 2023. – С. 329–334.
16. Яковлева, Т.В. Применение суспензии хлореллы в кормлении свиней / Т.В. Яковлева, Л.А. Яковлев // Ученые записки УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: науч.–практ. журнал. – Витебск. – 2013. – Т. 49, вып. 2, ч. 1. – С. 264–268.
17. C. Rajasekaran et al. Effect of modified Zarrouk's medium on growth of different Spirulina strains. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 2016. Vol.13. No.1. P.67-75. DOI:10.14456/WJST.2016.7
18. Dewan, A. Growth kinetics of microalgae in microfluidic static droplet arrays / A. Dewan, J. Kim, DOI: 10.1016/ 2020.101235
19. Kent, M. Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements / M. Kent, H.M. Welladsen, A. Mangott, Y. Li // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, No. 2: e0118985.
20. R.H. McLean, S.A. Vanapalli, M.N. Karim // *Biotechnol. Bioeng.* – 2012. – Vol. 109, No. 12. – P. 2987–2996.
21. Suman, G. Single cell protein production: A review / G. Suman, M. Nupur, S. Anuradha, B. Pradeep // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* – 2015. – Vol. 4. – P. 251–262.
22. Z. Wang et al. Comparison of photosynthetic carbon fixation of *Nannochloropsis oceanica* cultivated with carbon suppliers: CO₂, NaHCO₃ and CH₃OH. *Journal of CO₂ Utilization*. 2020. Vol.41. 101235.