

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений**

ВЕЧЕРЕК Максим Сергеевич

**ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РОСТА КУЛЬТУР, НАКОПЛЕНИЯ
БЕЛКА И ПРОДУКЦИИ БИОВОДОРОДА МИКРОВОДОРОСЛЯМИ
*PARACHLORELLA KESSLERI***

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
Демидчик Вадим Викторович
член-корреспондент НАН
Беларуси, доктор биологических
наук, профессор

Допущен к защите

«___» _____ 20__ г.

Зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений

_____ О.Г. Яковец

кандидат биологических наук, доцент

Минск, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат.....	4
Список условных обозначений.....	10
Введение.....	11
Глава 1 Обзор литературы.....	13
1.1 Продукция биоводорода клетками зелёных микроводорослей.....	13
1.1.1 Стимуляция продукции биоводорода в результате депривации элементов минерального питания.....	14
1.1.2 Методические подходы к переводу и поддержанию культур зелёных микроводорослей в условиях, индуцирующих продукцию биоводорода.....	18
1.2 Биосинтез аминокислот у микроводорослей.....	22
1.2.1 Изменение уровня свободных аминокислот при стрессе, связанном с продукцией биоводорода.....	30
1.3 Пути использования биомассы микроводорослей.....	34
Глава 2 Материалы и методы.....	37
2.1 Условия культивирования <i>Parachlorella kessleri</i> , стимулирующие генерацию H ₂	37
2.2 Анализ продукции биоводорода клетками микроводоросли.....	38
2.3 Анализ скорости роста культур и статистическая обработки экспериментальных данных.....	38
2.4 Анализ содержания белка в клетках <i>Parachlorella kessleri</i> , продуцирующих биоводород.....	39
2.5 Направленная селекция и фенотипирование <i>Parachlorella kessleri</i> ...	40
2.5.1 Селекция микроводорослей.....	40
2.5.2 Цифровое фенотипирование <i>Parachlorella kessleri</i>	40
2.6 Создание системы регистрации ОВП.....	42
Глава 3 Результаты и обсуждения.....	43
3.1 Продукция биоводорода культурами <i>P. kessleri</i> на средах, депривированных по различным элементам минерального питания....	43
3.2 Ростовые характеристики исследуемой микроводоросли при продукции H ₂	44
3.3 Изменение содержания белка в культурах микроводорослей, продуцирующих H ₂	46
3.4 Селекция микроводорослей.....	50
3.4.1 Изменение ростовых характеристик культур <i>P. kessleri</i> во время селекции.....	50

3.4.2	Продукция водорода во время селекции.....	52
3.4.3	Изменение диаметров клеток во время селекции.....	54
3.4.4	Применение нейронной сети для анализа фенотипической информации, полученной во время селекции.....	56
3.4.5	Результаты селекции микроводорослей.....	57
3.5	Создание и тестирование системы регистрации ОВП.....	57
	Заключение.....	60
	Список использованных источников.....	62

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 70 с., 10 рис., 112 источников.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РОСТА КУЛЬТУР, НАКОПЛЕНИЯ БЕЛКА И ПРОДУКЦИИ БИОВОДОРОДА МИКРОВОДОРОСЛЯМИ *PARACHLORELLA KESSLERI*

Объект исследования: продукция биоводорода культурами микроводоросли *Parachlorella kessleri* RA-002.

Цель работы: анализ ростовых характеристик культур штамма RA-002 микроводоросли *Parachlorella kessleri* в условиях стресса, связанного с продукцией биоводорода, анализ накопления белка в тех же условиях, селекция культур микроводорослей способных продуцировать большие количества биоводорода, разработка метода регистрации ОВП без изменения газового состава среды закрытой системы.

Методы исследования: спектрофотометрический метод определения плотности культур микроводоросли, определение концентрации белка по методу Бредфорда, потенциометрический метод определения ОВП, циклическое анаэробное субкультивирование микроводоросли, цифровое фенотипирование с использованием машинного зрения и нейронных сетей.

Полученные результаты:

1. Во время анаэробного культивирования на среде, депривированной по N, наибольшая концентрация H_2 наблюдалась на 6 сут и составила $7,43 \pm 1,49$ ммоль/г сухой массы. В свою очередь, для среды, депривированной по S с заменой Cu на Ca, наибольшая концентрация H_2 наблюдалась на 2 сут и составила $10,46 \pm 2,84$ ммоль/г сухой массы. Проведённый ANOVA тест не обнаружил статистически значимых различий между данными показателями ($p=0,4$).

2. При стимуляции продукции биоводорода, вызванной аноксией в комбинации с депривацией по N и S с заменой Cu на Ca, наблюдается снижение скорости роста культуры *Parachlorella kessleri* по сравнению с контрольными условиями. При этом рост культур не ингибируется полностью, т.е. они продолжают накапливать полезную биомассу, которая в дальнейшем может быть использована как дополнительный продукт (кроме H_2).

3. Концентрации общего белка в культурах, продуцирующих биоводород, возрастала на средах, депривированных по N и S с заменой Cu на Ca, на 25,7% и 95,4% относительно изначального значения, соответственно.

4. Созданная система регистрации ОВП продемонстрировала высокую эффективность для оценки концентрации H_2 .

5. Была выявлена неэффективность циклического анаэробного субкультивирования микроводорослей на среде ТАР депривированной по сере для отбора клеток с увеличенным выходом водорода, так как показана неспособность данного состава среды индуцировать устойчивую продукции биоводорода.

ABSTRACT

Graduated paper 70 p., 10 fig., 112 sources.

IDENTIFICATION OF THE FEATURES OF GROWTH, PROTEIN ACCUMULATION AND PRODUCTION OF BIOHYDROGEN BY MICROALGAE *PARACHLORELLA KESSLERI*

Subject of research: production of biohydrogen by cultures of microalgae *Parachlorella kessleri* RA-002.

The purpose of the work: analysis of the growth characteristics of cultures of the strain RA-002 of the microalgae *Parachlorella kessleri* under stress associated with the production of hydrogen sulfide, analysis of protein accumulation under the same conditions, selection of microalgae cultures capable of producing large amounts of biohydrogen, development of a method for registering ORP without changing the gas composition of the medium of a closed system.

Research methods: spectrophotometric method for determining the density of microalgae cultures, determination of protein concentration by the Bradford method, potentiometric method for determining ORP, cyclic anaerobic subcultivation of microalgae, digital phenotyping using machine vision and neural networks.

Findings:

1. During anaerobic cultivation on an N-deprived medium, the highest concentration of H₂ was observed on day 6 and amounted to 7.43± 1.49 mmol/g of dry weight. In turn, for the medium deprived of S with the replacement of Cu by Ca, the highest concentration of H₂ was observed on day 2 and amounted to 10.46±2.84 mmol/g of dry weight. The ANOVA test did not find statistically significant differences between these indicators (p=0.4).

2. When stimulating the production of biohydrogen caused by anoxia in combination with N and S deprivation with Cu replacement by Ca, a decrease in the growth rate of *Parachlorella kessleri* culture is observed compared with control conditions. At the same time, the growth of crops is not completely inhibited, i.e. they continue to accumulate useful biomass, which can later be used as an additional product (except H₂).

3. The concentration of total protein in cultures producing biohydrogen increased on media deprived of N and S with Cu replaced by Ca by 25.7% and 95.4% relative to the initial value, respectively.

4. The created ORP registration system demonstrated high efficiency for assessing the concentration of H₂.

5. The inefficiency of cyclic anaerobic subcultivation of microalgae on a sulfur-deprived TAP medium for the selection of cells with increased hydrogen yield was revealed, since the inability of this medium composition to induce stable production of biohydrogen was shown.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 70 с., 10 мал., 112 крыніц.

ВЫЯЎЛЕННЕ АСАБЛІВАСЦЯЎ РОСТУ КУЛЬТУР,
НАЗАПАШВАННЯ БЯЛКУ І ПРАДУКЦЫІ БІЯВАДАРОДУ
МІКРАВОДАРАСЦЯМІ *PARACHLORELLA KESSLERI*

Аб'ект даследавання: прадукцыя біявадароду культурамі
мікраводарасцей *Parachlorella kessleri* RA-002.

Мэта работы: аналіз роставых характарыстык культур штаму RA-002
мікраводарасцей *Parachlorella kessleri* ва ўмовах стрэсу, звязанага з
прадукцыяй бавадароду, аналіз назапашвання бялку ў тых жа ўмовах,
селекцыя культур мікраводарасцей здольных прадукваць вялікія колькасці
біявадароду, распрацоўка метаду рэгістрацыі ОВП без змены газавога складу
асяроддзя закрытай сістэмы.

Метады даследавання: спектрафатаметрычны метады вызначэння
шчыльнасці культур мікраводарасцей, вызначэнне канцэнтрацыі бялку па
метады Бредфорда, потенциометрычны метады вызначэння ОВП, цыклічнае
анаэробнае субкультывіраванне мікраводарасцей, лічбавае фенатыпаванне з
выкарыстаннем машыннага зроку і нейронавых сетак.

Атрыманыя вынікі:

1. Падчас анаэробнай культывавання на асяроддзі, депривированной Па
N, найбольшая канцэнтрацыя H_2 назіралася на 6 сут і склала $7,43 \pm 1,49$ ммоль/г
сухой масы. У сваю чаргу, для асяроддзя, дэпрываванага па S з заменай Cu на
Ca, найбольшая канцэнтрацыя H_2 назіралася на 2 сут і склала $10,46 \pm 2,84$
ммоль/г сухой масы. Праведзены ANOVA тэст не выявіў статыстычна значных
адrozenняў паміж дадзенымі паказчыкамі ($p=0,4$).

2. Пры стымуляцыі прадукцыі бiоводарода, выкліканай аноксіяй ў
камбінацыі з дэпрывацыяй па N і S з заменай Cu на Ca, назіраецца зніжэнне
хуткасці росту культуры *Parachlorella kessleri* у параўнанні з кантрольнымі
ўмовамі. Пры гэтым рост культур не інгібіруецца цалкам, г.зн. яны
працягваюць назапашваць карысную біямасу, якая ў далейшым можа быць
выкарыстана як дадатковы прадукт (акрамя H_2).

3. Канцэнтрацыі агульнага бялку ў культурах, якія прадуючы б'явадарод, ўзрастаю на асяроддзях, депривіраваных Па N і S з заменай Cu на Ca, на 25,7% і 95,4% адносна першапачатковага значэння, адпаведна.

4. Створаная сістэма рэгістрацыі ОВП прадэманстравала высокую эфектыўнасць для ацэнкі канцэнтрацыі H_2 .

5. Была выяўлена неэфектыўнасць цыклічнага анаэробнага субкультывавання мікравадарасцей на асяроддзі ТАР дэпрыраванай па серы для адбору клетак з павялічаным выхадам вадароду, так як паказана няздольнасць дадзенага складу асяроддзя індукваць ўстойлівую прадукцыю б'явадароду.