

ПРОДУКТИВНОСТЬ МИКРОВОДОРОСЛИ *NANNOCHLOROPSIS LIMNETICA* ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ МИНЕРАЛЬНЫМ АЗОТОМ

Золотарева Е.К., Шнюкова Е.И.

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
Киев, Украина, membrana@ukr.net*

Виды рода *Nannochloropsis* (Chromalveolata) из-за способности накапливать высокие уровни полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) привлекают возрастающее внимание как перспективное сырьё для получения ряда коммерческих препаратов, в частности, докозагексаеновой кислоты (22:6 n-Ω3) и, особенно, эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК; 20:5 n-Ω3) [1]. В настоящее время единственным промышленным источником ЭПК является морской рыбий жир, препараты из которого имеют своеобразный вкус и запах, ограниченную стабильность и требуют дорогостоящей очистки. Поскольку организмы рыб не способны синтезировать ω-3 жирные кислоты и получают их, в конечном счете, из фитопланктона, культивирование микроводорослей является привлекательной альтернативой для производства ЭПК. Несмотря на несомненную биотехнологическую перспективность культивирования фитопланктонных микроводорослей, физиологические, биофизические, биохимические характеристики видов *Nannochloropsis* изучены недостаточно. Мелкие округлые клетки *Nannochloropsis* (2-2,5 мкм в диаметре) не содержат хлорофиллов *b* и *c*, и, наряду с липидами, способны накапливать высокие концентрации каротиноидов (астаксантин, зеаксантин и кантаксантин).

Одним из биотехнологических приемов, позволяющих повысить содержание ЭПК в биомассе *Nannochloropsis*, является лимитирование минеральных компонентов в питательной среде. Так, при ограничении азотного питания в значительной степени уменьшается содержание белков и происходит накопление липидов и углеводов [2]

Целью настоящей работы было исследование влияния уровня азотного питания на накопление биомассы и фотосинтетическую эффективность клеток *Nannochloropsis N. limnetica* Krientz, Hepperle, Stich, Weiler. Водоросли выращивали в стерильных условиях при температуре 27-28°C на жидкой минеральной среде в накопительном режиме в конических колбах Эрленмейера на модифицированной среде Эрдшрейбера с использованием морской воды. Культуры освещали люминесцентными лампами (плотность потока фотонов 100-150 мкмоль•м⁻²•с⁻¹) с периодич-

ностью 12/12 ч. Эксперименты проводили в пяти вариантах при трехкратной повторности каждого. Концентрация азота (NaNO_3) в питательной среде составляла 32,19; 24,48; 16,33; 8,16 и 0 в пересчете на мг азота в литре, что соответствовало 100, 75, 50, 25 и 0 % NaNO_3 . В каждом варианте инокулят вносили в питательную среду в таком количестве, чтобы начальная плотность культуры была одинаковой – 43, 5 мг/л. Накопление биомассы анализировали на разных фазах роста культуры: в период лаг-фазы, в начале, в середине и при завершении линейной фазы (начальный этап стационарной фазы роста).

Концентрацию хлорофилла определяли в спиртовых экстрактах клеток на спектрофотометре СФ-46 по Винтерману и Демонтсу. По модифицированной нами методике Кэмпбелла и др. [3] с помощью флуориметра ХЕ-РАМ (Heinz Walz GmbH, Германия) определяли следующие параметры флуоресценции хлорофилла в суспензии водорослей (концентрация хлорофилла 2 мкг/мл): 1) F_v/F_m – максимальную эффективность фотохимических реакций в фотосистеме II (ФС II), 2) F_v'/F_m' – эффективность фотохимических реакций в открытых центрах ФСII; 3) q_P – коэффициент фотохимического тушения флуоресценции; 4) квантовый выход электронного транспорта в ФС II; 5) q_N – коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции.

Данные экспериментов свидетельствуют о том, что на первых этапах эксперимента, когда культура находилась в лаг-фазе, увеличение биомассы практически не наблюдалось независимо от концентрации азота в среде. Это объясняется тем, что в этот период одновременно с началом размножения водорослей происходит частичный лизис мало жизнеспособных клеток. Увеличение биомассы микроводорослей происходило в начальный период фазы линейного роста как при полном обеспечении культуры нитратным азотом, так и при ее лимитировании по азоту. При 50%-ном и особенно 25%-ном дефиците азота существенно тормозился рост водорослей. На стадии перехода к стационарной фазе рост *N. limnetica* активировался как в условиях полного обеспечения азотом, так и частичного его лимитирования (75 % и даже 50 % от нормы), тогда как при отсутствии в среде азота прирост водорослей изменялся незначительно по сравнению с исходной культурой. Жизнеспособность водорослей в этот период могла частично поддерживаться за счет внутриклеточных запасов азота (таблица).

Концентрация хлорофилла при уменьшении содержания азота, в частности при умеренном его дефиците (50 и 75% обеспеченности) снижалась, хотя и незначительно (табл.). Параметры индукции флуоресценции клеток *N. limnetica*, выращенных при различных уровнях обеспечен-

ности азотом, позволили заключить, что при умеренном его дефиците эффективность фотосинтеза в целом, как и функционирования ФСII, сохранялись на уровне, близком к контрольному.

Таблица – Продуктивность накопительной культуры *Nannochloropsis limnetica* при различных условиях обеспечения минеральным азотом

Начальная конц. Азота, %	Накопление сухой биомассы в ходе роста (мг/л)					Концентрация хлф. а, мкг/мл
	Исходная культура	Лаг-фаза	Линейная фаза			
			Начало	Середина	Завершение	
100	435	440	535	780	840	3,15±0,04
75	–“–	390	515	770	745	3,10±0,05
50	–“–	410	495	642	710	2,95±0,08
25	–“–	405	475	472	455	1,25±0,07
0	–“–	365	380	410	445	0,86±0,06

Таким образом, использование 75% и даже 50% азота от его пула в среде, рекомендованной для выращивания *N. limnetica*, обеспечивает увеличение прироста биомассы водорослей в 1,6-1,9 раза. Благоприятным является использование биомассы в период завершения фазы линейного роста культуры и начала стационарной фазы. Поскольку согласно существующим данным дефицит азота способствует синтезу жирных кислот и липидов, полученная при указанных условиях биомасса *N. limnetica* может рассматриваться как возможный перспективный источник для использования в биотехнологии.

Литература

1. Guschina I. A., Harwood J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic Algae // Progress in Lipid Research . – 2006.–Vol. 45, N 1. – P. 160-186.
2. Xu F., Cai Z., Cong W., Ouyang F. Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis sp.* grown mixotrophically in fed-batch culture // Biotech. Lett. – 2004.–Vol. 26, N 1. – P. 1319–1322.
3. Campbell D., Hurry V., Clarke A.K., Gustafsson P., Oquist G. Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. Vol. 62(3). – P.667-683.