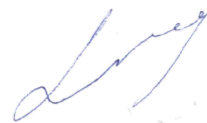


На правах рукописи



Лелеков Александр Сергеевич

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ
РОСТА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ И
ПАРАМЕТРЫ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССОМ ФОТОБИОСИНТЕЗА**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Севастополь – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени
А. О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБЮМ РАН) г. Севастополь

Научный консультант: **Егоров Виктор Николаевич**
академик РАН, доктор биологических наук, профессор,
научный руководитель ФИЦ ИнБЮМ РАН

Официальные оппоненты: **Ризниченко Галина Юрьевна**
доктор физико-математических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М. В. Ломоносова», профессор кафедры биофизики Биологического
факультета

Антал Тарас Корнелиевич
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Псковский государственный университет»,
проректор по научной работе

Брильков Анатолий Васильевич
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет», профессор
кафедры ЮНЕСКО «Новые материалы и технологии»

Ведущая организация: Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр
биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ
РАН)

Защита диссертации состоится «17» октября 2023 г. в 14:00 на заседании диссертационного
совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск,
Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики Сибирского
отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН и на
сайте <http://www.ibp.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.1.228.03, к.б.н.



Дементьев Дмитрий Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Низшие фотоавтотрофные организмы – одни из древнейших обитателей Земли, их значимость для нормального протекания энергетических процессов в биосфере огромна (Билич, Крыжановский, 2002). В современной систематике к категории низших фотоавтотрофов относят одноклеточные водоросли и цианопрокариоты, которые способны к оксигенному фотосинтезу, характеризуются разделением фотохимических и ферментативных процессов.

Культуры микроводорослей (цианобактерий) используются в качестве модельных объектов при исследовании экологических основ жизнедеятельности гидробионтов, закономерностей влияния факторов среды на скорость роста и продукцию биохимических компонентов клеток. Основным достоинством использования культур является возможность получения воспроизводимых результатов. Широкое распространение культуры микроводорослей получили ещё в начале двадцатого века при исследовании фотосинтеза. На сегодняшний день достигнуты впечатляющие успехи в исследованиях фотосинтетической системы: открыты структуры практически всех белков, определены характерные времена протекания отдельных стадий фотосинтеза, разработаны комплексные математические модели фотосинтетической мембраны (Ризниченко, Рубин, 2020). Ассимилируя углекислоту и выделяя кислород при фотосинтезе, микроводоросли являются незаменимыми компонентами искусственных замкнутых экосистем, включающих человека (Гительзон и др., 1975; Дегерменджи, Тихомиров, 2014).

Одним из наиболее эффективных методов исследования микроводорослей является математическое моделирование. Метаболизм живой клетки представляет собой сложную систему с многочисленными кинетическими и регуляторными связями (Минкевич, 2016). В общем случае, попытки детального описания метаболических реакций в клетке или роста популяции приводят к невозможности корректного построения математической модели вследствие наличия большого количества неизвестных параметров. Кроме того, при переходе с клеточного на популяционный уровень описания процессов роста, возникает необходимость введения дополнительных параметров, что ещё больше усложняет задачу их расчёта. Для уменьшения количества неизвестных можно редуцировать систему дифференциальных уравнений, используя общепринятые аксиомы биологии (Вилли, Детье, 1975), балансовые представления об энерго- и массообмене гидробионтов (Ивлев, 1966; Заика, 1985), принцип определяющего звена в цепи ферментативных реакций (Чернавский, Иерусалимский, 1965) или "узкое место" метаболизма (Monod, 1949), представление о метаболонах – функциональных образованиях, в которых осуществляется целый комплекс ферментативных реакций (Курганов, 1986). Основные успехи в области изучения закономерностей роста микроводорослей достигнуты при работе с непрерывными культурами (Силкин, Хайлов, 1988), для которых применение метода стационарных

состояний позволяет перейти от систем дифференциальных к алгебраическим уравнениям, что значительно упрощает определение параметров моделей.

К настоящему моменту, несмотря на появление огромного количества новых знаний о фотосинтезе, структурной и временной организации "узкого места" метаболизма (Тренкеншу, 2005), теории материально-энергетического баланса микробного роста (Минкевич, 2005), моделирование роста культуры микроводорослей по-прежнему основывается на формализме ферментативной кинетики. В микробиологии уравнение Моно либо его производные во многих случаях с достаточной степенью точности описывают кинетические кривые для различных лимитирующих субстратов. Подобные кривые часто подтверждаются экспериментально при исследовании ассимиляции биогенных элементов среды фитопланктоном (Молисмология ..., 1992). Однако для интенсивных культур микроводорослей, клетки которых адаптированы к заданным условиям, зависимость скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата практически никогда не описывается гиперболой. Особенно наглядно это демонстрируется на мгновенных кривых фотосинтеза, которые во многих случаях ближе к ломаной Блэкмана (Blackman, 1905), что привело к возникновению десятков математических моделей фотосинтетической кривой.

Не менее важным аспектом, который необходимо учитывать при моделировании роста культуры микроводорослей, является изменение биохимического состава биомассы. Современная концепция предполагает рассмотрение биомассы микроводорослей в виде суммы двух (структурной и резервной) или большего количества составляющих (Flynn, 2001; Nisbet, 2012). Зависимость скорости синтеза того или иного компонента от концентрации субстрата (интермедиата) задаётся в виде гиперболы Моно. Однако для накопительной культуры решения полученных дифференциальных уравнений часто не выражаются в элементарных функциях, что значительно затрудняет интерпретацию полученных результатов. Кроме того, в процессе роста биомассы может происходить смена лимитирующего фактора, что приводит к резкому изменению продуктивности культуры или продукции её биохимических составляющих. Это приводит к необходимости разделения кривой роста на несколько участков, что ещё больше усложняет математику. В целом, ограниченное число теоретических работ, посвящённых моделированию роста накопительной культуры, обусловлено сложностью решения систем дифференциальных уравнений для нестационарных условий.

С практической точки зрения на сегодняшний день существует необходимость в разработке алгоритмов управления процессом фотобиосинтеза. В промышленных масштабах микроводоросли, как правило, выращивают в открытых фотобиореакторах в условиях естественного освещения, что обуславливает суточную ритмику роста и биосинтеза. Изменяющиеся световые условия по-разному воздействуют на скорости синтеза биохимических составляющих биомассы, математические модели фотобиосинтеза микроводорослей в условиях естественного освещения в литературе практически не встречаются.

Таким образом, на сегодняшний день не существует общепризнанного теоретического подхода, который бы позволил объяснить рост и биосинтез культуры микроводорослей в изменяющихся внешних условиях. Поэтому основной задачей настоящей работы являлись анализ и обобщение существующих подходов, а также разработка универсальных принципов моделирования роста микроводорослей. Накопленные к настоящему моменту знания о фотосинтезе, биосинтезе, ассимиляции и фиксации биогенных элементов клетками микроводорослей, совместно с фундаментальными принципами биологии и физики позволяют вплотную подойти к решению проблем, связанных с созданием теории роста микроводорослей. По крайней мере, это близко к реальности на популяционном уровне изучения закономерностей роста с учётом видоспецифических свойств микроводорослей и внешних условий, в которых находятся клетки.

Цели и задачи работы

Цель работы – разработка теоретических основ моделирования фотобиосинтеза микроводорослей в культуре.

Обоснованность предлагаемого теоретического подхода должна быть проиллюстрирована конкретными примерами его практического использования при анализе экспериментальных данных, построении прогностических моделей роста культуры микроводорослей при заданных внешних условиях.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. На основе анализа современных литературных данных о метаболизме микроводорослей оценить границы применимости существующей парадигмы моделирования их роста в условиях интенсивной культуры;
2. Разработать динамическую модель роста накопительной культуры микроводорослей с учётом смены лимитирующего фактора, определить параметры среды, влияющие на коэффициенты модели;
3. Рассматривая рост микроводорослей как совокупность энергообменных реакций, сформулировать принципы моделирования, позволяющие количественно описать изменение биохимического состава биомассы в различных условиях;
4. Провести верификацию предлагаемого теоретического подхода на экспериментальных данных роста культур микроводорослей различных систематических групп в условиях светового лимитирования и недостатке минерального азота;
5. Исследовать рост оптически плотной культуры микроводорослей в условиях искусственного и естественного освещения, дать оценку предельной продуктивности культуры для южного берега Крыма. Установить количественную взаимосвязь биохимического состава биомассы с уровнем облучённости фотобиореактора.

Научная новизна

Впервые предложено использовать линейные сплайны при описании зависимости скорости роста культур микроводорослей различных систематических групп от приведённой плотности потока энергетического или пластического субстрата. Это позволило получить аналитические решения

систем дифференциальных уравнений, задать точку переключения лимитирующего фактора, определить видоспецифические коэффициенты моделей.

Разработана двухкомпонентная модель фотоавтотрофного роста культуры микроводорослей, которая предполагает разделение биомассы на структурную и резервную части, скорости синтеза которых заданы линейными сплайнами и выражены через приведённые потоки лимитирующего субстрата. Для культур невысокой оптической плотности получено частное решение модели, объясняющее зависимость содержания хлорофилла *a* в биомассе от интенсивности света, что сделано впервые без учёта процессов фотодеструкции пигмента. Для оптически плотных культур установлена количественная взаимосвязь удельной скорости роста и концентрации хлорофилла *a*, что впервые позволило объяснить постоянство продуктивности накопительной культуры микроводорослей снижением доли структурных компонентов биомассы.

Установлено, что при лимитировании роста культуры микроводорослей азотом, уравнение Моно является лишь частным решением предлагаемой двухкомпонентной модели. Для условий хемостата выявлена взаимосвязь удельной скорости роста культуры с долей структурных форм азота, что является уточнением концепции Друпа. Для накопительной культуры впервые получено выражение, описывающее динамику роста накопительной культуры микроводорослей на внутриклеточных запасах азота при его полном отсутствии в среде.

Практическая значимость работы

Принципы моделирования фотобиосинтеза, сформулированные в данной работе, позволили получить прогностические модели роста культуры микроводорослей в условиях искусственного и естественного освещения, а также определить ключевые параметры, на основе которых можно разрабатывать алгоритмы управления биохимическим составом биомассы. Предложено новое объяснение линейного роста биомассы микроводорослей в условиях светолимитирования. Постоянство скорости роста позволяет относительно простыми способами управлять биохимическим составом получаемой биомассы в довольно широком диапазоне: без потери продуктивности можно выбрать такую плотность непрерывной культуры, при которой на выходе будет получена биомасса с заданным биохимическим составом.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Зависимость скорости синтеза биомассы микроводорослей от приведённой плотности потока энергетического или пластического субстрата задаётся линейными сплайнами.
2. Соотношение резервных и структурных компонентов биомассы является ключевым экспериментально измеряемым параметром, который определяет скорость синтеза структуры. Скорость образования резервных составляющих определяется приведённой плотностью потока внешнего лимитирующего субстрата.

3. Зависимость удельной скорости роста культуры от интенсивности света характеризуется двойной сменой лимитирующего фактора. Удельная скорость роста микроводорослей определяется поверхностной облучённостью, соотношением резервной и структурной частей биомассы, а также долей структурной биомассы.
4. При азотном лимитировании удельная скорость роста культуры определяется долей структурных форм азота. С увеличением потока азота в клетку, доля структурных форм уменьшается, при этом удельная скорость роста достигает максимального видоспецифического значения.
5. В оптически плотных культурах микроводорослей линейный рост обусловлен снижением количества световой энергии, приходящейся на единицу структурной биомассы, а также уменьшением её доли.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в постановке цели и задач исследования, предложении универсальных принципов моделирования роста культуры микроводорослей, получении экспериментальных данных о росте и биохимическом составе биомассы, верификации моделей, интерпретации и обобщении полученных результатов.

Степень достоверности результатов и апробация работы

В работе применяются современные теоретические подходы и экспериментальные методы культивирования микроводорослей. Достоверность полученных результатов была подтверждена путём верификации разработанных моделей на собственных и литературных данных о росте микроводорослей различных систематических групп, использованием статистических методов анализа.

Материалы диссертации были представлены на семинарах отдела Биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ, кафедры Биофизики Биологического факультета МГУ, Института Биофизики СО РАН, Института перспективных исследований СевГУ, IX Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (г. Пущино, 17 – 19 октября 2022 г.), IX Съезде Российского фотобиологического общества (пос. Шепси, 12 – 19 сентября 2021 г.), Юбилейной научной конференции "Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019", посвященной 60-летию кафедры биофизики физического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова (г. Москва, 21 – 24 ноября 2019 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, приуроченной к 145-летию Севастопольской биологической станции (г. Севастополь, 19 – 24 сентября 2016 г.).

Публикации

У автора имеется 74 публикации в рецензируемых научных изданиях, по теме диссертации – 25 статей, индексируемых базами данных РИНЦ, SCOPUS, WOS, 2 патента на изобретение, а также 1 монография.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, 7 глав (обзор литературы, методическая часть, результаты исследования), обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы, включающего 281 наименование. Общий объём

рукописи составляет 232 страницы. В работе представлено 68 рисунков и 6 таблиц.

Глава 1. Кинетические модели роста культуры микроводорослей (Обзор литературы)

Рассмотрено современное состояние теоретических и экспериментальных исследований роста культур. Изложены общие сведения о росте микроводорослей в закрытых и открытых системах культивирования, дано определение основным продукционным характеристикам, приведены основные математические модели роста и биосинтеза культуры. Отдельные разделы обзора посвящены анализу физиологических механизмов поглощения света, ассимиляции основных биогенных элементов (углерода, азота, фосфора) клетками микроводорослей. Дана оценка применимости существующих принципов моделирования при описании роста культуры микроводорослей.

Глава 2. Материал и методы исследований

Для верификации теоретических подходов использовались литературные и собственные экспериментальные данные по культивированию четырёх видов низших фотоавтотрофов, относящихся к различным систематическим группам: *Phaeodactylum tricornutum* Bohl., *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross, *Dunaliella salina* Teod., *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Gomont. Культуры выращивались как в лабораторных условиях в плоскопараллельных фотобиореакторах при постоянном освещении, так и в полупромышленных масштабах в горизонтальных бассейнах при естественном освещении. Дано подробное описание разработанной унифицированной лабораторной установки, которая применялась в лабораторных экспериментах и альгобиотехнологического модуля, используемого для исследования роста микроводорослей в условиях естественного освещения.

Глава 3. Динамические модели роста накопительной культуры микроводорослей

В главе рассмотрена группа динамических неструктурированных моделей роста накопительной культуры микроводорослей. В общем случае на классической S-образной накопительной кривой необходимо выделить минимум два участка: область неограниченного (нелимитированного) роста и область лимитирования, причём в точке их сопряжения наблюдается резкое изменение продуктивности. Поэтому в первом приближении зависимость скорости синтеза биомассы от концентрации лимитирующего субстрата задана линейными сплайнами: скорость синтеза биомассы прямо пропорциональна концентрации лимитирующего субстрата, а при некоторой пороговой концентрации скорость синтеза достигает максимума. Конечно, в области, где наблюдается насыщение скорости роста, возможно отклонение экспериментальных данных от идеализированной ломаной. С другой стороны, при моделировании накопительной кривой необходимо учитывать возможную смену лимитирующего фактора, что вынуждает к делению кривой на отдельные

участки, фазы роста. Поэтому применение ломаной для каждой фазы позволяет снизить неточности при описании данных и значительно упростить математический аппарат (Абросов и др., 1982).

3.1 Моделирование динамики плотности накопительной культуры

Рассмотрим простейшие модели динамики плотности культуры микроводорослей. Фундаментальным свойством живых систем является способность к самовоспроизведению. В отсутствии лимитирования величина скорости роста числа клеток будет прямо пропорциональна их количеству, а продуктивность – биомассе. Запишем уравнение неограниченного роста:

$$B = B_0 \cdot e^{\mu \cdot t}, \quad (1)$$

где B_0 – биомасса в начальный момент времени $t = 0$, г·л⁻¹; μ – удельная скорость роста, сут⁻¹.

Рассмотрим случай лимитирования роста накопительной культуры в закрытой системе одним из биогенных элементов питательной среды. Известно, что для таких условий кривая роста имеет S-образную форму и описывается логистической функцией (Силкин, Хайлов, 1988; Ризниченко, 2003). Логистическая функция может быть получена из предположения о пропорциональности величины продуктивности произведению текущей плотности B культуры и концентрации лимитирующего субстрата в околочелочной среде S . Вводя понятие потребности в субстрате Y_s (Гуревич, 1984), при заданных начальных условиях и постоянной величине Y_s , получим:

$$B = B_m / \left(1 + \frac{S_0}{Y_s \cdot B_0} \cdot e^{-Y_s \cdot B_m \cdot k \cdot t} \right), \quad (2)$$

где Y_s – потребность биомассы в субстрате, г·г⁻¹; S_0 , B_0 – начальные значения концентрации субстрата и биомассы, г·л⁻¹; B_m – максимальная плотность культуры, г·л⁻¹; k – константа связи единиц размерности, л·(г·сут)⁻¹, которая является светозависимым параметром.

Можно показать, что логистическая кривая (2) имеет точку перегиба, в которой продуктивность максимальна. Кроме того, функция (2) характеризуется симметричностью относительно точки перегиба. Однако на практике часто наблюдается несимметричность накопительной кривой (см. рис. 1), что в некоторых случаях можно объяснить соотношением значений начальной концентрации субстрата и начальной плотности культуры. Например, если коэффициент, стоящий перед экспонентой в выражении (2), меньше единицы, то накопительная кривая не будет иметь точки перегиба. Следовательно, при таких условиях культура микроводорослей будет находиться в фазе замедления роста. В фазе замедления роста плотность культуры близка к своему максимальному значению, а концентрация субстрата становится настолько мала, что в некоторый момент времени продуктивность становится независимой от плотности культуры:

$$\frac{dB}{dt} = k_s \cdot S,$$

где k_s – константа связи единиц размерности, г·(г·сут)⁻¹.

Решение последнего уравнения имеет вид:

$$B = B_n + \frac{S_n}{Y_S} \cdot \left(1 - e^{-k_S \cdot Y_S \cdot (t - t_i)}\right), \quad (3)$$

где S_n , B_n – начальные значения концентрации субстрата и биомассы в среде в момент времени, когда скорость роста становится независимой от плотности культуры.

Таким образом, для описания динамики биомассы в накопительной культуре может использоваться несколько уравнений, которые, строго говоря, применимы только для части накопительной кривой (одной из фаз роста). Даже логистическая функция, которую формально описывает экспериментальные данные (рис. 1 А), в связи с непостоянством биохимического состава клеток (величина Y_S изменяется) не применима для описания всей S-образной кривой. Разделение кривой минимум на два участка (рис. 1 В) позволяет значительно повысить точность описания данных и определения кинетических характеристик культуры.

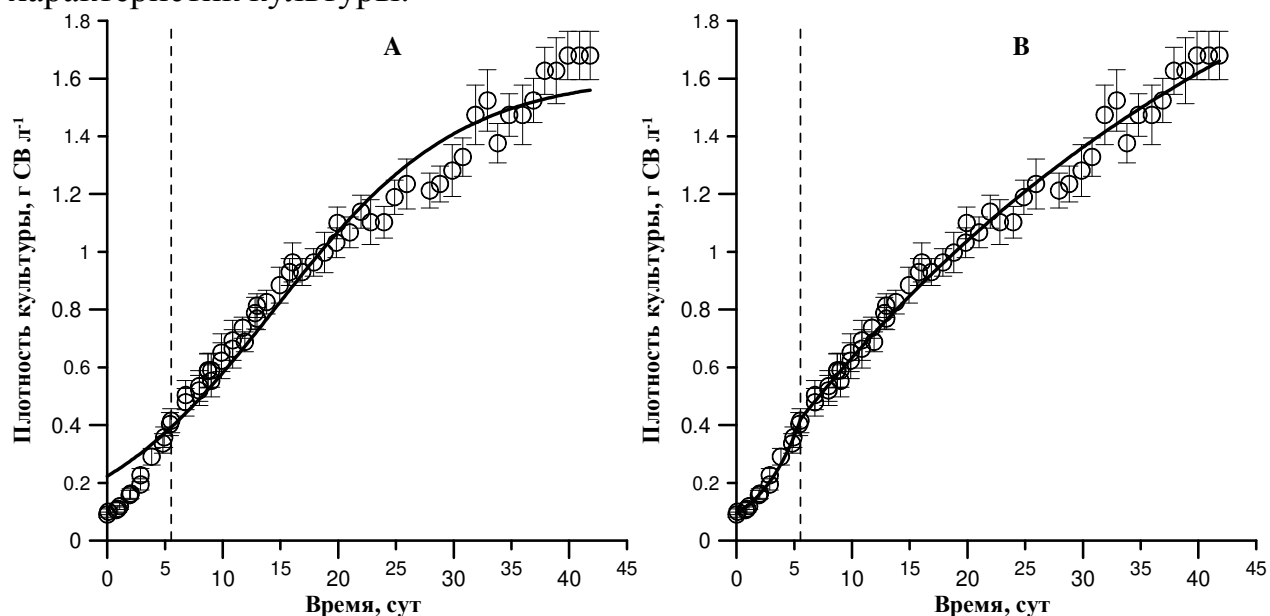


Рисунок 1 Ассиметричная накопительная кривая роста культуры *Ph. tricorutum*. Аппроксимация экспериментальных данных: А – логистической функцией (2), В – выражениями (1) и (3). Пунктирная линия указывает на точку переключения лимитирующего фактора

3.2. Динамическая модель накопительной культуры с учётом потерь биомассы

Приведённые в разделе 3.1 модели не учитывают снижение скорости роста за счёт потерь биомассы – совокупности процессов, приводящих к уменьшению плотности культуры. Известно, что скорость роста культуры определяется разностью скоростей биосинтеза и потерь биомассы. Так как скорость роста зависит от самой биомассы, рассмотрим зависимость удельной скорости роста культуры μ от концентрации лимитирующего субстрата в среде S в виде ломаной:

$$\mu(S) = \begin{cases} \mu_0 - \mu_r, S \geq K \\ \frac{\mu_0}{K} \cdot S - \mu_r, S < K \end{cases} \quad (4)$$

где μ_0 и μ_r – максимальная удельная скорость синтеза и удельная скорость потерь биомассы, сут⁻¹; K – насыщающая концентрация субстрата, г·л⁻¹.

Из выражения (4) следует, что при постоянстве удельных скоростей синтеза и потерь, а также $S \geq K$, культура будет расти согласно экспоненциальному закону (1). Рассмотрим случай лимитирования роста культуры микроводорослей субстратом S ($S < K$). В выражении (4) максимальную удельную скорость синтеза, удельную скорость потерь биомассы и константу насыщения будем считать постоянными видоспецифичными коэффициентами, которые можно определить экспериментально. Из (4) можно получить выражения, описывающие динамику изменения удельной скорости роста, продуктивности и плотности накопительной культуры:

$$\begin{aligned} \mu &= \sqrt{2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_s}{K} \cdot \mu_r \cdot (B_m - B)}, & P &= \mu \cdot B = B \cdot \sqrt{2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_s}{K} \cdot \mu_r \cdot (B_m - B)}, \\ B &= B_m - B_m \cdot th \left(K_B - \frac{\sqrt{a_1}}{2} (t - t_K) \right)^2. \end{aligned} \quad (5)$$

где $K_B = \operatorname{arcth} \left(\sqrt{\frac{B_m - B_K}{B_m}} \right)$, $a_1 = 2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_s}{K} \cdot \mu_r \cdot B_m$, B_K – плотность культуры при $S = K$ в момент времени t_K .

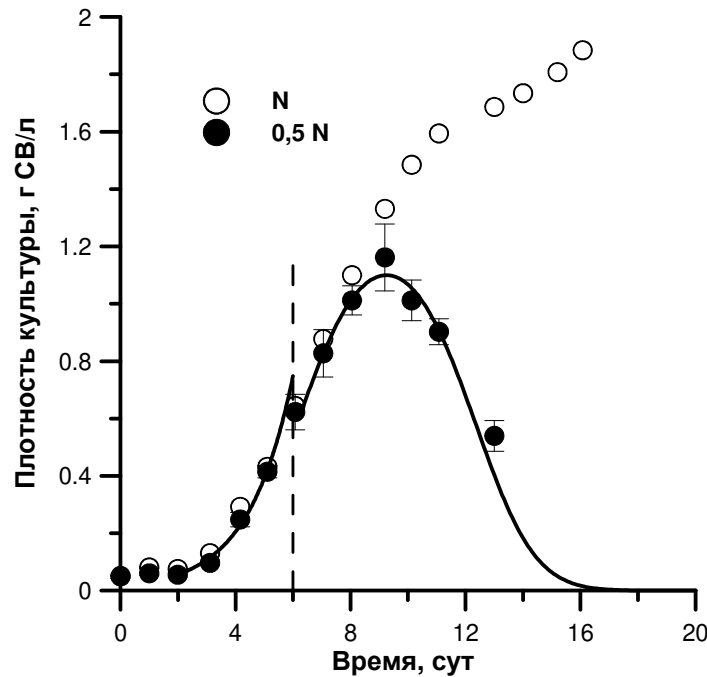


Рисунок 2 Накопительные кривые роста культуры *A. platensis* при различном содержании азота в среде. Линии – аппроксимация данных выражениями (1) и (5). Пунктирная линия – момент начала лимитирования роста азотом

Выражение (5) применимо для описания экспериментальных данных роста культуры микроводорослей в условиях лимитирования одним из биогенных элементов среды, например азотом. На рисунке 2 представлены накопительные кривые роста культуры *A. platensis* при различном содержании азота в среде. Можно отметить хорошее соответствие предлагаемой модели с реальными экспериментальными данными ($R^2 = 0,93$). Следует отметить, что уравнения (1) и (5) не сходятся в одну точку: на графике мы наблюдаем "разрыв" примерно на шестые сутки. Это связано с тем, что эта точка соответствует моменту, когда концентрация лимитирующего субстрата снижается до уровня константы насыщения K . Именно в области этой концентрации уравнение зависимости $\mu(S)$ в виде ломанной хуже всего описывает экспериментальные данные. Кроме того, при переходе культуры из экспоненциальной в фазу лимитирования роста происходят изменения биохимического состава клеток микроводорослей, что приводит к изменению параметров модели.

3.3. Динамика плотности культуры микроводорослей в стационарной фазе роста

Стационарная фаза роста накопительной культуры микроводорослей мало изучена, поскольку для биотехнологии не представляет интерес с точки зрения реализации максимальных продуктивностей. В этой фазе величина биомассы может изменяться в широком диапазоне. Например, на рисунке 3 приведена накопительная кривая и динамика pH при культивировании *A. platensis*.

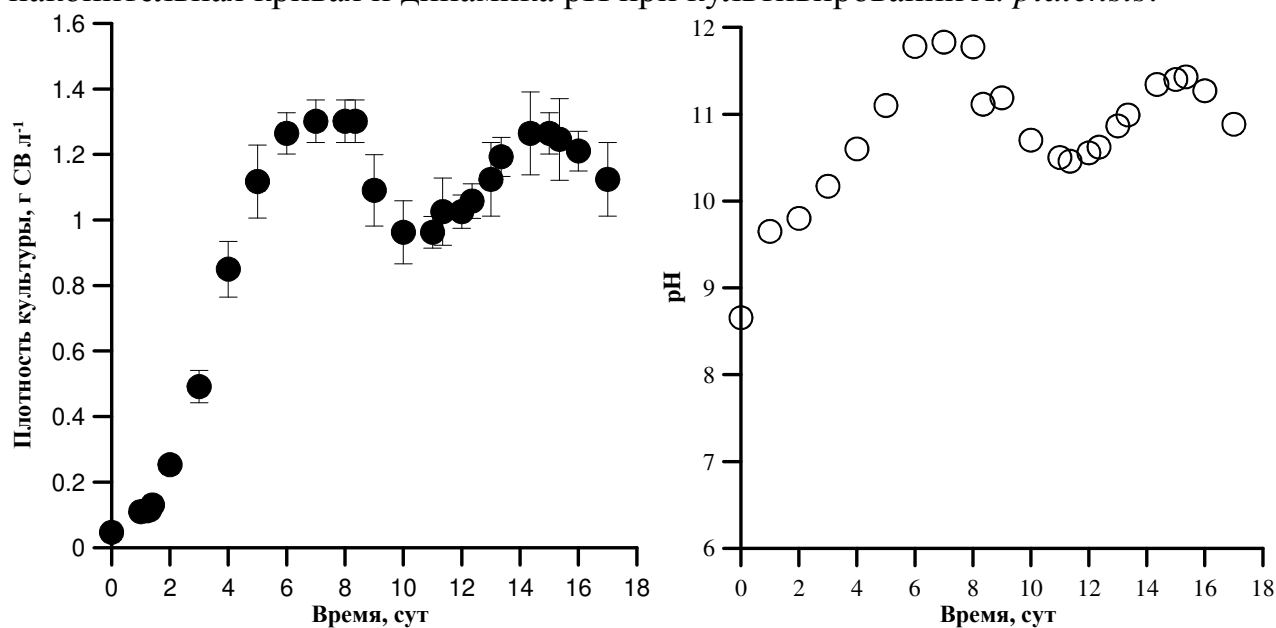


Рисунок 3 Динамика плотности накопительной культуры *A. platensis* и pH культуральной среды

На 8 сутки отмечалось статистически достоверное снижение плотности культуры, с последующим восстановлением её до первоначального значения, т. е. наблюдались колебания биомассы и pH среды. При достижении максимального значения биомассы величина pH среды составила 12 единиц. Известно, что при таких pH в среде практически отсутствуют доступные для

ассимиляции клетками гидрокарбонат-ионы (Бородина, 2002), культура переходит в фазу отмирания. Распавшаяся биомасса может служить источником биогенных элементов. Минеральные элементы либо повторно используются в биосинтезе, либо безвозвратно теряются, переходя в нерастворимые соединения (Лелеков, 2009). Обозначив через α – безразмерный коэффициент возврата субстрата из распавшейся биомассы, запишем балансовую модель роста культуры микроводорослей в закрытой системе:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = k_s \cdot S - \mu_R \cdot B \\ \frac{dS}{dt} = -Y_s \cdot k_s \cdot S + \alpha \cdot Y_s \cdot \mu_R \cdot B, \end{cases} \quad (6)$$

где S, B – концентрация субстрата и плотность культуры, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$; Y_s – потребность биомассы в субстрате, $\text{г} \cdot \text{г}^{-1}$; k_s – константа связи единиц размерности, $\text{г} \cdot (\text{г} \cdot \text{сут})^{-1}$.

Система (6) сводится к дифференциальному уравнению второго порядка, корни характеристического уравнения которого действительные, следовательно, конечное решение не может быть выражено с помощью периодических функций. Таким образом, (6) не описывает колебательные процессы в плотных культурах микроводорослей, но позволяет объяснить продолжительную стационарную фазу роста. Для уточнения модели, необходимо учесть современные представления о механизмах ассимиляции углерода клетками цианобактерий.

3.4. Моделирование динамики роста *Arthrospira platensis* и pH среды в закрытой по углероду системе

Рассмотрим закрытую по углероду систему культивирования микроводорослей. Существенную роль в ассимиляции углерода играет цинксодержащий фермент карбоангидраза, участвующий в различных стадиях работы CO_2 -концентрирующего механизма (Пронина, 2000). У цианопрокариот известно несколько разных карбоангидраз (Куприянова, Самылина, 2015). В простейшем рассмотрении в результате работы карбоангидразы на одну поглощенную молекулу HCO_3^- образуется одна молекула CO_2 и один гидроксил-ион OH^- (Janson, Northen, 2010). Так как содержание гидрокарбоната натрия в среде Заррук (Zarrouk, 1966) во много раз превышает содержание фосфата калия, можно считать, что изменение pH культуральной среды будет определяться отношением концентраций карбонат- и гидрокарбонат-ионов. Пренебрегая всеми остальными процессами защелачивания (либо закисления за счёт органики) среды, запишем дифференциальное уравнение изменения молярной концентрации гидроксил-ионов:

$$\frac{d[\text{OH}^-]}{dt} = k_1 \cdot N_{CA} \quad (7)$$

где k_1 – константа реакции, $\text{моль} \cdot (\text{моль} \cdot \text{сут})^{-1}$; N_{CA} – концентрация карбоангидразы, $\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Считая долю карбоангидразы f_{CA} в биомассе постоянной, можем выразить количество фермента через величину биомассы. Предполагая, что биомасса растёт по экспоненциальному закону (1), проинтегрируем последнее уравнение при заданных начальных условиях:

$$[OH^-] = [OH^-]_0 - \frac{\mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m} + \frac{\mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m} \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \quad (8)$$

где $\mu_{CA} = k_1 \cdot f_{CA}$.

Анализ выражения (8) показывает, что концентрация $[OH^-]$ в среде увеличивается экспоненциально. На рисунке 4 представлена накопительная кривая роста спирулины и динамика концентрации гидроксил-ионов в среде. Полученные результаты свидетельствуют об адекватности предложенной математической модели ($R^2 = 0,99$).

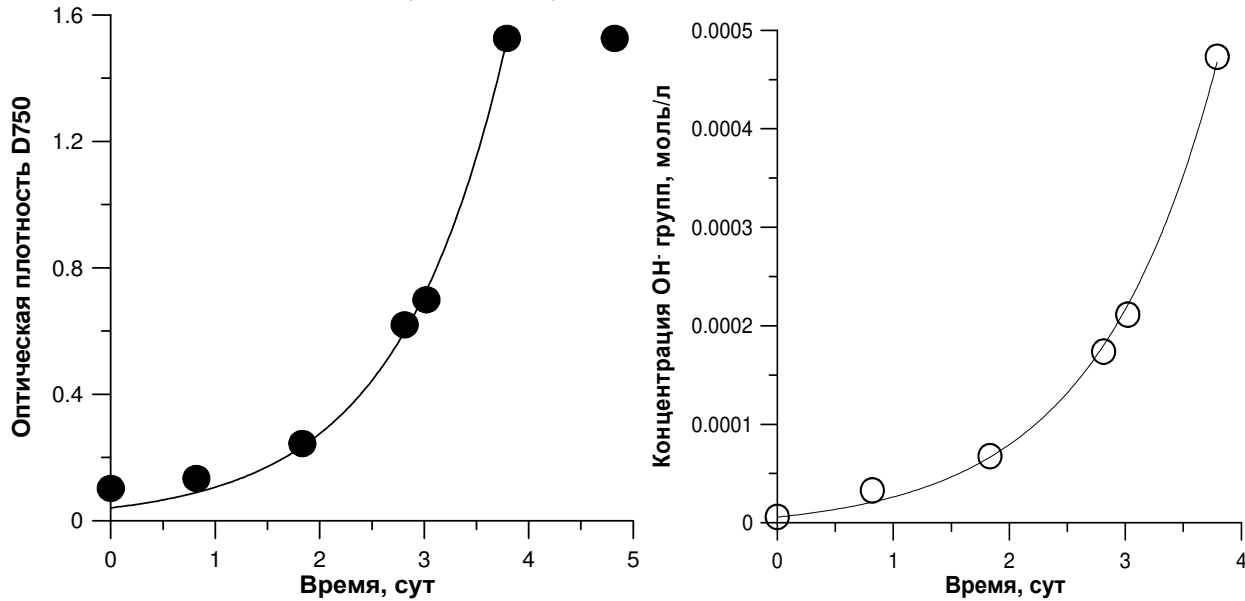


Рисунок 4 Накопительная кривая роста *A. platensis* и изменение концентрации гидроксил-ионов в среде. Аппроксимация экспериментальных данных выражениями (1) и (8)

С течением времени культура перейдёт в фазу замедления роста, описываемой следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = k_3 \cdot [HCO_3^-], \\ \frac{d[HCO_3^-]}{dt} = -\mu_{CA} \cdot B - k_2 \cdot [OH^-], \\ \frac{d[OH^-]}{dt} = \mu_{CA} \cdot B. \end{cases}$$

где k_3 – константа связи единиц размерности, $г \cdot (моль \cdot сут)^{-1}$.

Решение последней системы можно представить в виде:

$$B(t) = C_1 \cdot e^{-a_1 \cdot t} + C_2 \cdot \sin(a_2 \cdot t) + C_3 \cdot \cos(a_2 \cdot t), \quad (9)$$

где a_1, a_2, a_3 – обобщённые видоспецифичные кинетические коэффициенты, C_1, C_2, C_3 – константы, которые можно найти из начальных и граничных условий.

Выражение (9) применимо для описания динамики плотности культуры *A. platensis* при лимитировании углеродом. Отметим, что в (9) содержатся слагаемые, которые указывают на наличие отмеченных ранее (рис. 3) периодических колебаний биомассы.

3.5. Модель динамики пигментов в накопительной культуре микроводорослей

С ростом плотности накопительной культуры происходит изменение пигментного и биохимического состава клеток, что приводит к варьированию параметров вышеприведённых моделей. Получим уравнение, описывающее динамику относительного содержания пигментов в биомассе. Обозначим величину относительного содержания произвольного пигмента в биомассе (например, хлорофилла *a*) через β :

$$\beta = \frac{\pi}{B} \quad (10)$$

где $\pi = \pi(t)$ – функция, описывающая динамику концентрации пигмента, $B = B(t)$ – функция, описывающая динамику плотности культуры.

Таким образом, задача сводится к определению вида функциональной зависимости, описывающей изменение концентрации пигмента во времени.

Модель 1. Фотодеструкция пигментов.

Рассмотрим случай деструктивного распада пигментов под действием света. Изменение концентрации пигмента в произвольный момент времени *t* теперь определяется скоростями синтеза ($d\pi_s/dt$) и фотодеструкции ($d\pi_d/dt$). Тогда концентрация пигмента в культуре (π) будет определяться разностью скоростей синтеза и фотодеструкции. Оценим скорость фотодеструкции. Данная величина будет зависеть от количества поглощённой световой энергии (Геворгиз, Тренкеншу, 1998):

$$\frac{d\pi_d}{dt} = k_1 \cdot \alpha \cdot I_0, \quad (11)$$

где k_1 – константа связи единиц размерности, г хл а·Дж⁻¹; α – безразмерный коэффициент поглощения света культурой микроводорослей, I_0 – поверхностная облучённость, Дж·с⁻¹·м⁻².

При высокой плотности культуры свет поглощается практически полностью, а коэффициент поглощения равен единице. В культурах низкой плотности коэффициент поглощения можно считать прямо пропорциональным концентрации пигментов:

$$\alpha \cong k_2 \cdot \pi. \quad (12)$$

При экспоненциальном росте плотности культуры (1) с учётом начальных условий $t=0$, $\pi = \pi_0$ получим выражение, описывающее динамику накопления пигмента в культуре:

$$\pi = \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \cdot e^{\mu_m \cdot t} + \left(\pi_0 - \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \right) \cdot e^{-\mu_i \cdot t}. \quad (13)$$

Разделив (13) на текущее значение плотности культуры B , получим выражение, которое позволяет описать динамику изменения относительного содержания пигмента в биомассе:

$$\beta = \frac{\pi}{B} = \frac{\beta_m \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} + \left(\beta_0 - \frac{\beta_m \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \right) \cdot e^{-(\mu_m + \mu_i)t}, \quad (14)$$

где β_m – максимальное содержание хлорофилла в биомассе, %; $\mu_i = k_1 \cdot k_2 \cdot I_0$ – удельная скорость фотоингибирования, с^{-1} .

При длительном культивировании микроводорослей в непрерывном плотностатном режиме с экспоненциальным ростом содержание пигментов в клетках стабилизируется на некотором уровне (β_{st}):

$$\beta_{st} = \beta_m \cdot \frac{\mu_m}{\mu_m + K \cdot I_0}. \quad (15)$$

Из выражения (15) следует, что с увеличением интенсивности действующего света, стационарные значения относительного содержания пигментов неуклонно снижаются, что не противоречит существующим теоретическим подходам (Geider et al., 1996). Но при высоких интенсивностях света стационарные значения β стремятся к нулю, что не соответствует многочисленным экспериментальным данным, имеющимся в литературе (MacIntyre et al., 2002).

Модель 2. Фотодеструкция с последующим восстановлением пигментов.

Полагаем, что фотодеструкция проявляется в частичном разрушении пигментов и некоторая их доля может восстановиться до нормального состояния (Krasnovsky, 1998). Примем, что под действием света пигмент переходит в промежуточное (фотоокисленное) состояние (π_d). Из этого состояния пигмент переходит либо в нормальное состояние (восстанавливается, π_r), либо необратимо разрушается (π_π). Наиболее вероятным представляется вариант механизма восстановления, который требует некоторого времени на процесс восстановления. Если μ_r – интенсивность процесса, то скорость восстановления (необратимого распада) имеет вид:

$$\frac{d\pi_r}{dt} = \mu_r \cdot \pi_d, \quad \frac{d\pi_\pi}{dt} = \mu_\pi \cdot \pi_d.$$

Для произвольного момента времени t можно скорость изменения текущего содержания пигментов в культуре будет зависеть от скоростей синтеза, фотодеструкции и восстановления. В итоге получим систему дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами:

$$\begin{cases} \frac{d\pi_m}{dt} = \beta_m \cdot B_0 \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m t} - \mu_\pi \cdot \pi_d \\ \frac{d\pi_d}{dt} = \mu_i \cdot \pi_m \end{cases}$$

где π_m – наблюдаемая (измеряемая) концентрация хлорофилла a .

Опуская математические преобразования, относительное содержание пигмента в биомассе экспоненциально растущей культуры описывается выражением:

$$\beta = \beta_{st} + (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-\mu_m t} \cdot (c \cdot \sin \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + \cos \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t). \quad (16)$$

В качестве примера верификации выражения (16) рассмотрим экспериментальные данные работы (Паламодова, 2009), где проводились параллельные измерения биомассы и содержания хлорофилла *a* при переносе клеток *Phaeodactylum tricornutum* с низкой на высокую освещённость и наоборот (рис. 5).

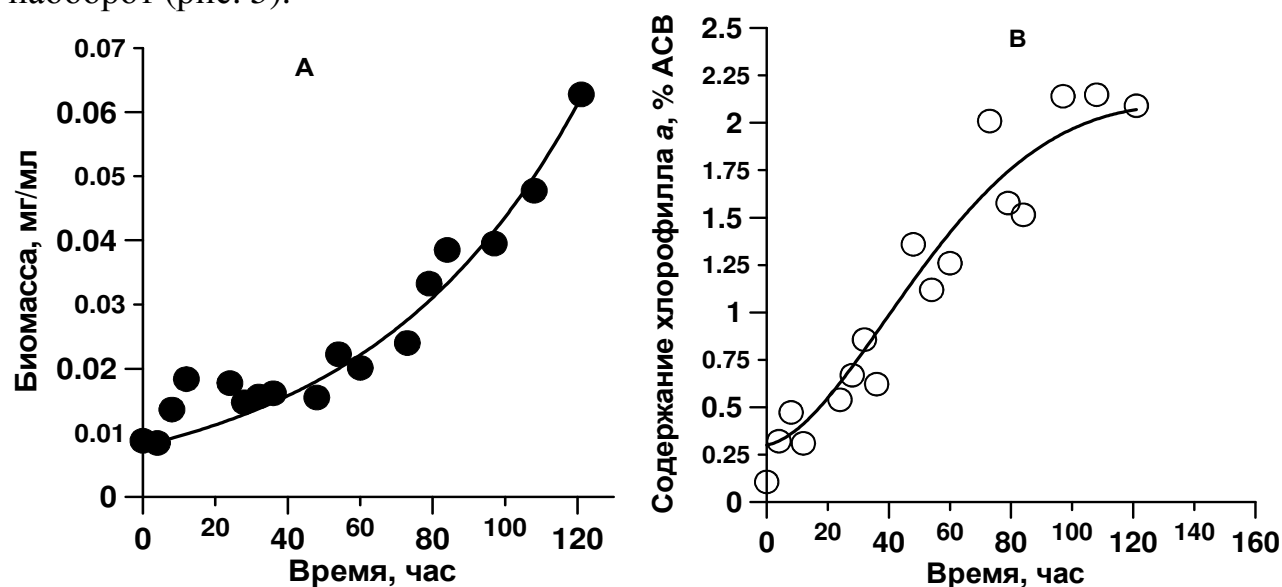


Рисунок 5 Динамика биомассы (А) и относительного содержания хлорофилла *a* (В) при переносе клеток *Ph. tricornutum* с высокой на низкую освещённость (Паламодова, 2009). Аппроксимация динамики биомассы уравнением (1), относительного содержания хлорофилла *a* уравнением (16)

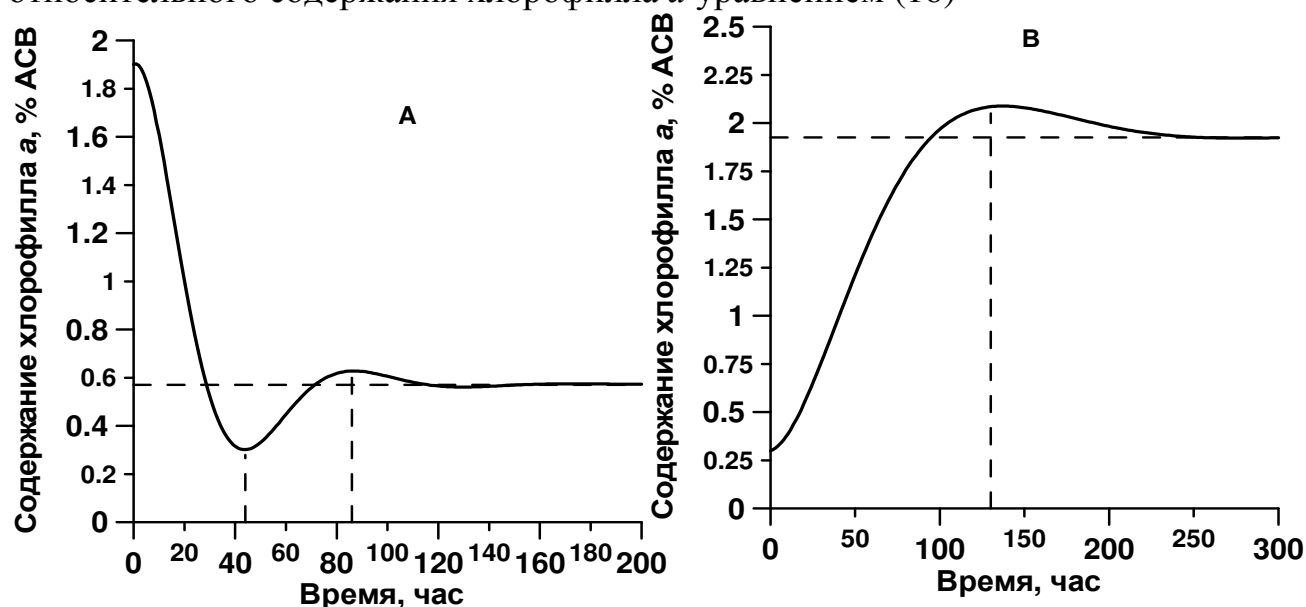


Рисунок 6 Теоретические кривые динамики относительного содержания хлорофилла *a* при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой на высокую (А) и с высокой на низкую (В) освещённость

Рассчитанные коэффициенты модели позволили построить прогностическую кривую содержания хлорофилла *a* (рис. 6). Таким образом, предлагаемая модель описывает явление «ложного старта» при переносе клеток

микроводорослей с низкой освещённости на высокую. В этом случае функция имеет явно выраженный минимум, который характеризуется параметрами β_{ext} и t_{ext} .

3.6. Заключение к главе 3

В данной главе на основе задания кинетики роста линейными сплайнами получены простые прогностические модели динамики плотности накопительной культуры микроводорослей. Существенным недостатком существующих в литературе динамических моделей, в том числе приведённых в данной главе, является предположение о пропорциональности скорости роста концентрации лимитирующего субстрата и предположение о неизменности биохимического состава клеток (постоянстве экономического коэффициента). Кроме того, другие параметры моделей также нельзя считать постоянными. Например, максимальная удельная скорость синтеза биомассы зависит от облучённости, так как для преобразования любого неорганического субстрата необходима энергия в виде АТФ. Прямая пропорциональность скорости изменения концентрации лимитирующего субстрата в среде скорости синтеза биомассы не выполняется ввиду того, что ассимиляция биогенов и биосинтез – это напрямую независимые процессы, которые протекают с разными скоростями на разных ферментных комплексах. Если рассмотреть процесс изменения содержания пигментов в клетках микроводорослей, то гипотеза о пропорциональности скорости фотодеструкции интенсивности света в некоторых работах экспериментально не подтверждается и подвергается сомнению (Goericke, Welschmeyer, 1992). Таким образом, необходима разработка новых принципов моделирования фотобиосинтеза микроводорослей, которые должны учесть вышеперечисленные недостатки, оперировать максимально простым математическим аппаратом, который позволит разрабатывать алгоритмы управления ростом культуры.

Глава 4. Моделирование энергообмена микроводорослей на макромолекулярном уровне организации

4.1. Разделение процессов энерго- и массообмена

В основе роста микроводорослей лежит фотосинтез. Микроводоросли характеризуются пространственным разделением фотохимических (световая стадия) и ферментативных (темновая стадия) процессов синтеза первичных углеводов за счёт энергии восстановленных макроэргов – НАДФ·Н и АТФ. Обобщённая блок-схема энерго- и массообмена микроводорослей представлена на рисунке 7. Необходимо отметить, что предлагаемая схема является сильно упрощённой, в ней не показано участие в реакциях обмена фосфора, электронов, протонов и других участников энергообмена. Учёт этих и других факторов впоследствии приведёт к громоздкости математических построений и сложностям в редуцировании систем уравнений. Хотя в дальнейшем, возможно, игнорирование отдельных процессов приведет к неадекватному количественному описанию экспериментальных результатов, в этом случае схему придется уточнить.

Разделение внешних потоков энергетического и минерального питания сразу приводит к вопросу о месте их сопряжения после преобразований в световых и биосинтетических реакциях внутри клетки. В схеме фотобиосинтеза таким местом являются реакции обмена, обеспечивающие согласование скоростей:



Базируясь на представленной на рисунке 7 схеме сопряжения реакций фото- и биосинтеза, рост микроводорослей следует рассматривать как процесс биосинтеза структур клетки из минеральных веществ за счёт энергии макроэргов, т. е. рост микроводорослей является совокупностью энергообменных реакций. Соответственно, понятия скорости роста и скорости энергообмена являются эквивалентными, а предельные скорости энергообмена будут определять предельные скорости роста. Такой подход хорошо согласуется с теорией материально-энергетического баланса (Минкевич, 2005).

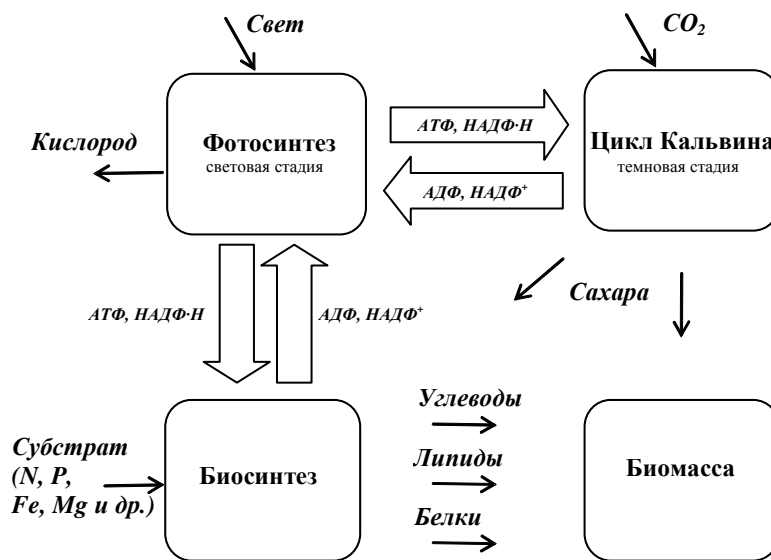


Рисунок 7 Схема сопряжения реакций фото- и биосинтеза у микроводорослей

4.2. Предельная скорость энергообмена

Максимальные скорости энергообмена могут реализоваться только при всех оптимальных физико-химических условиях среды. В этом случае максимальная скорость синтеза биомассы будет пропорциональна общему количеству ключевого ферментного комплекса F_0 , его активности μ_e и максимальной эффективности φ_0 преобразования энергии макроэргов в химическую энергию, запасенную в биомассе. Обозначив свободную энергию одной молекулы макроэрга через ς и заменив количество молекул на их суммарную энергию, получим выражение для максимальной скорости энергообмена. Если биомасса B содержит ключевой комплекс F_0 в количестве f на единицу биомассы ($f=F_0/B$), то для максимальной скорости синтеза биомассы можно записать:

$$P_{max}^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{max} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \mu^e F_0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma f \mu^e B, \quad (17)$$

где θ^0 – коэффициент перевода энергетических единиц в единицы биомассы, который обычно называют калорийностью биомассы, кДж·г⁻¹.

Величина максимальной скорости синтеза биомассы не может являться независимым параметром для характеристики роста, т. к. зависит от количества фермента или биомассы. Разделив максимальную скорость синтеза на биомассу, получим максимальную удельную скорость:

$$\mu_{max} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta f \mu^e. \quad (18)$$

По сути, определяемая таким образом максимальная удельная скорость является параметром, не зависящим от внешних потоков минерального и энергетического питания микроводорослей. Величина этого параметра определяется только механизмом трансформации энергии и вещества в клетке, включая структурную характеристику – содержание ключевого регулятора энергообмена в биомассе клеток f . В кинетическом смысле данная характеристика количественно отражает понятие, называемое в биокинетике лимитирующим звеном (Чернавский, Иерусалимский, 1965) или "узким местом" метаболизма (Monod, 1949).

4.3. Зависимость скорости синтеза биомассы микроводорослей от внешних потоков субстрата

Поглощение света микроводорослями определяется интенсивностью, спектром падающего света, а также оптическими свойствами самих клеток (Фуряев, 1979). Интенсивность поглощения фотонов (или энергии) можно выразить через интенсивность света, падающего на поверхность культуры (I_0), и коэффициент поглощения (α):

$$I_n = \alpha \cdot I_0. \quad (19)$$

Коэффициент поглощения является безразмерной величиной и зависит от спектральных свойств источника света и пигментного состава биомассы. При полном минеральном обеспечении и прочих оптимальных значениях внешней среды скорость образования макроэргов будет определяться скоростью поглощения фотонов (I_n) и количеством квантов, необходимых для восстановления одной молекулы макроэрга (φ_e):

$$\frac{dE_+}{dt} = \varphi_e \cdot I_n. \quad (20)$$

В энергетических единицах выражение для скорости восстановления макроэргов можно выразить через интенсивность поглощения световой энергии I_e путем учёта энергии каждого фотона ($h\nu$). Отсюда находим скорость синтеза биомассы микроводорослей как функцию скорости поглощения световой энергии:

$$P^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \frac{dE_+}{dt} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \varphi_e I_n = \frac{\varphi_{max}}{\theta^0} \frac{I_e}{h\nu}, \quad (21)$$

$$\varphi_e \varphi^0 \zeta = \varphi_{max}.$$

Для удобства запишем уравнение в нормированном виде:

$$P_{norm}^0 = \frac{P^0}{P_{max}^0} = \frac{\frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \frac{dE_+}{dt}}{\frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{max}} = \frac{\varphi_e I_n}{\mu^e F_0} = \lambda_i. \quad (22)$$

Следовательно, скорость синтеза биомассы, выраженная в нормированном виде, линейно зависит от λ_i – количества квантов света, поступающих на одну молекулу мультиферментного комплекса за время его оборота. Фактически, эта величина представляет собой ранее введённую для метаболических реакций приведенную плотность потока энергетического субстрата (Тренкеншу, 2005).

При лимитировании роста минеральным питанием, скорость энергообмена будет ограничена скоростью поступления низкоэнергетических форм макроэргов в область сопряжения реакций энергообмена. По аналогии с (22), нормированная скорость синтеза биомассы микроводорослей как функция скорости потребления энергии макроэргов и связанная с ней скорость ассимиляции элементов питания:

$$P_{norm}^0 = \frac{\varphi_s I_s}{\mu^e F_0} = \lambda_s. \quad (23)$$

Выражения, полученные для светового и минерального лимитирования роста микроводорослей, можно обобщить в виде линейных сплайнов:

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_s; \lambda_s \leq \lambda_i \\ \lambda_i; \lambda_s \geq \lambda_i \\ 1; \lambda_i \geq 1, \lambda_s \geq 1 \end{cases}. \quad (24)$$

На практике обычно наблюдаются отклонения скорости «чистого» фотобиосинтеза от приведенной плотности потока, заданное в виде линейных сплайнов (24). Это обусловлено переходными процессами, которые протекают в культуре при изменении облучённости, потока субстрата, pH, температуры и др. параметров среды. Эти изменения могут быть количественно связаны с биохимическим составом. Клетки с лучшей организацией метаболических систем (высокой степенью адаптации к данным условиям) при равных потоках питания растут быстрее и с большей эффективностью используют этот поток.

4.4. Ограничение роста микроводорослей внутриклеточными потоками субстрата

Система (24), задающая скорость синтеза биомассы от приведённой плотности потока субстрата в виде линейных сплайнов, может быть записана как для внешних потоков, так и для потоков лимитирующего субстрата внутри клетки. Рассмотрим двухкомпонентную модель, подразумевающую наличие в биомассе B двух основных макромолекулярных форм – структурной B_{str} и резервной B_{res} . Скорость синтеза структуры определяется количеством резервной биомассы, приведённая плотность потока резервной биомассы λ_r на ключевой ферментный комплекс F_0 за время его оборота ($1/\mu^e$) имеет вид:

$$\lambda_r = \frac{\varphi_{rs} \cdot B_{res}}{\mu^e \cdot F_0}, \quad (25)$$

где φ_{rs} – количество структурной биомассы, образующейся из единицы резервной за время оборота ферментного комплекса.

Учитывая, что ключевой ферментный комплекс F_0 имеет белковую природу, а, значит, является частью структуры с постоянной долей f , получим:

$$\lambda_r = \frac{\varphi_{rs} \cdot B_{res}}{\mu^e \cdot f \cdot B_{str}}. \quad (26)$$

Обозначим через ε величину соотношения структурной и резервной биомассы, тогда:

$$\lambda_r = \frac{\varphi_{rs}}{\mu^e \cdot f} \varepsilon. \quad (27)$$

Последнее выражение связывает величину приведённой плотности потока с измеряемым биохимическими методами параметром ε . При условии постоянства кинетических констант будет иметь место прямо пропорциональная зависимость λ_r от ε . При единичном потоке соотношение ε будет равным:

$$\varepsilon_{sat} = \frac{\mu^e \cdot f}{\varphi_{rs}}. \quad (27)$$

Теперь появляется возможность выразить поток λ_r *только* через измеряемые соотношения макромолекулярных составляющих биомассы:

$$\lambda_r = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_{sat}}. \quad (28)$$

Для синтеза структуры необходима энергия в виде АТФ, которая может поступать в область реакции напрямую от фотосинтеза, либо образовываться при митохондриальном дыхании. Согласно литературным данным, транспорт АТФ через мембрану хлоропластов и митохондрий осуществляется через сложную транспортных каналов, в т.ч. посредством образования промежуточных соединений (Pottosin, Shabala, 2016). Таким образом, энергия, необходимая для обеспечения процессов биосинтеза в цитоплазме (или наоборот в пластидах), поступает туда в виде АТФ и восстановительных эквивалентов через некоторые интермедиаты, которые безусловно относятся к резервным формам биомассы. Поэтому будем считать, что часть резервной биомассы $(1 - q_{rs})$, используется на энергетические затраты. Конечно, такое представление является довольно упрощённым, однако оно позволяет нам получить *базовую систему уравнений*, описывающую динамику трансформации структурных и резервных форм биомассы микроводорослей при фотоавтотрофном росте:

$$\begin{cases} \frac{dB_{str}}{dt} = \frac{q_{rs} \mu_{mrs} B_{str}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r B_{str} \\ \frac{dB_{res}}{dt} = \mu_m B_{str} \begin{cases} \lambda_i, \lambda_i < 1 \\ 1, \lambda_i \geq 1 \end{cases} - \frac{\mu_{mrs} B_{str}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} \end{cases} \quad (29)$$

где μ_m – максимальная удельная скорость фотосинтеза, ε_{sat} – насыщающее соотношение резервная / структурная биомасса, μ_{mrs} – максимальная удельная

скорость преобразования резервной биомассы в структурную, q_{rs} – экономический коэффициент перехода резервной биомассы в структурную, μ_r – удельная скорость распада структуры. λ_i – приведённый поток квантов.

4.5. Моделирование скорости фотобиосинтеза линейными сплайнами

Рассмотрим возможность применения линейных сплайнов на примере описания световых кривых фотосинтеза. При анализе таких экспериментальных данных необходимо учитывать степень адаптации клеток микроводорослей к конкретному уровню облучённости. В этом плане интерес представляют результаты, полученные для культуры микроводорослей в плотностате, когда пигментный и биохимический состав клеток не изменяется ($\pi = const$, $F_0 = const$). Зависимость ассимиляционного числа хлорофилла a от облучённости I_e описывается линейными сплайнами:

$$A = \begin{cases} \frac{I}{\pi} \left(\frac{\varphi^0 \zeta \varphi_e}{\theta^0} I_e - P_r \right), & I_e < I_{sat} \\ \frac{I}{\pi} \left(\frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \mu^e F_0 - P_r \right), & I_e \geq I_{sat} \end{cases} \quad (30)$$

где A – ассимиляционное число хлорофилла a , I , I_{sat} – интенсивность и насыщающая интенсивность света, P_r – скорость темнового дыхания.

Для верификации (30) рассмотрим фотосинтетические кривые морской диатомовой водоросли *Skeletonema costatum*, адаптированной к высокой (1200 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) и низкой (50 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) облучённости (рис. 8 А) (Anning et al., 2000).

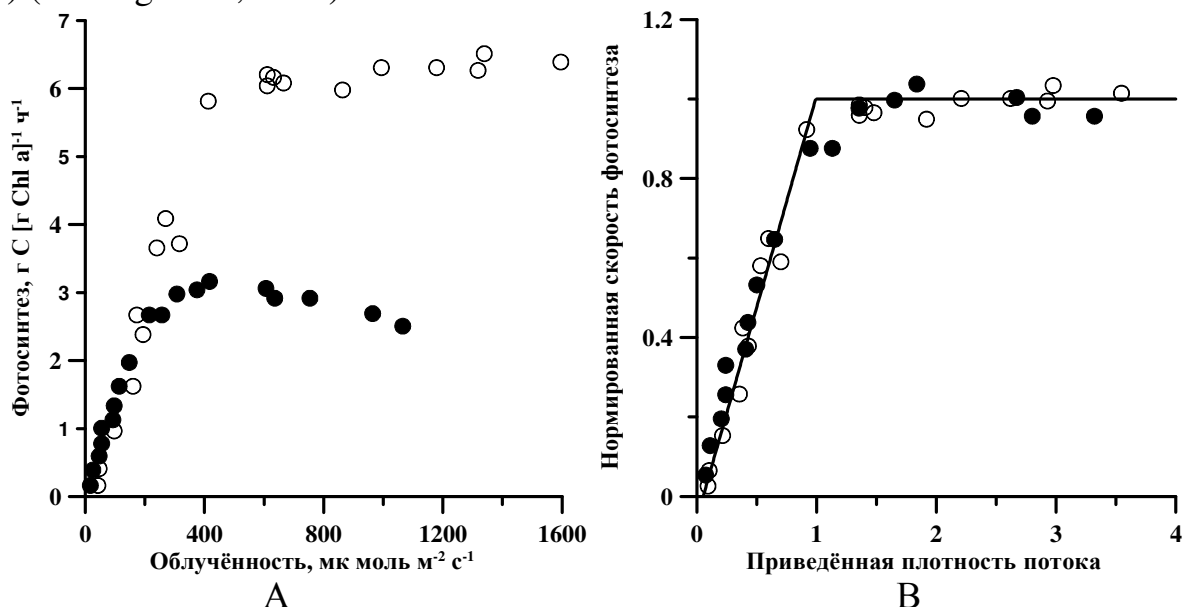


Рисунок 8 А – кривые фотосинтеза культуры *S. costatum*, адаптированной к высокой (белые маркеры) и низкой (чёрные маркеры) облучённости (Anning et al., 2000). В – нормированные данные (см. пояснения в тексте), аппроксимация экспериментальных данных линейными сплайнами (30) ($R^2 = 0,96$)

В нормированном виде (скорость фотосинтеза разделим на максимальную, величину облучённости на соответствующую насыщающую), параметры адаптации клеток – количество ключевого мультиферментного комплекса F_0 , его активность μ^e и эффективность φ^0 , сокращаются. Поэтому все значения для высокой и низкой освещённости ложатся на одну кривую и описываются линейными сплайнами (рис. 8 Б).

4.6. Заключение к главе 4

В данной главе сформулированы принципы, которые позволяют количественно описать рост интенсивной культуры микроводорослей в строго контролируемых условиях:

1. Зависимость скорости фотобиосинтеза от приведённой плотности потока энергетического или пластического субстрата описывается линейными сплайнами. Температурная кинетика удельной скорости роста в области физиологической нормы также описывается линейными сплайнами;
2. При моделировании роста культуры биомассу микроводорослей необходимо разделить на две макромолекулярные составляющие: резервные и структурные;
3. Существует ключевой мультиферментный комплекс, на котором происходит сопряжение энергообменных реакций фотобиосинтеза. Максимальная скорость синтеза биомассы в целом или её макромолекулярной составляющей определяется количеством (концентрацией), активностью и структурной организацией комплекса;
4. В области лимитирования скорость образования резервной части биомассы прямо пропорциональна приведённой плотности потока внешнего субстрата, в то время как продукция структуры определяется внутриклеточным потоком резервов на ключевой мультиферментный комплекс;
5. Внутриклеточные потоки могут быть выражены через соотношение резервной и структурной частей биомассы, которое является ключевым измеряемым параметром, определяющим скорость образования структуры.

Глава 5. Светозависимый рост микроводорослей в культурах невысокой плотности

5.1. Моделирование содержания хлорофилла *a* в плотностате

В основе моделирования светозависимого содержания пигментов положена гипотеза об их обратимом фотодеструктивном окислении (Nelson, 1993; Geider, MacIntyre, Kana, 1996; Krasnovsky, 1998). При разработке моделей, авторы считают скорость фотодеструкции прямо пропорциональной количеству поглощённой световой энергии (Геворгиз, Тренкеншу, 1998). Однако в некоторых работах экспериментально обнаружено, что скорость распада хлорофилла *a* не зависит от внешней интенсивности света, при этом доля хлорофиллида и других продуктов распада постоянна и не превышает 2 % клеточного содержания хлорофилла *a* (Goerick, Welschmeyer, 1992). Предлагаемая двухкомпонентная модель (29) позволяет объяснить изменение доли хлорофилла *a* биотрансформацией структурной и резервной форм

биомассы, при этом удельная скорость фотодеструкции выражается постоянным параметром μ_r . Согласно (29) скорость синтеза хлорофилла определяется не внешней облучённостью, а количеством резервной биомассы и активностью ключевого ферментного комплекса μ_{rs} , который преобразует резервную биомассу в структурную. Конечно, такие заключения справедливы, если считать хлорофилл частью структурной биомассы, что подтверждается и теоретически, и экспериментально. У микроводорослей хлорофилл *a* образует с белками комплекс, который представляет собой структурный компонент хлоропластов (Ризниченко, Рубин, 2020). На рисунке 9 представлена линейная зависимость концентрации хлорофилла *a* от общего белка для культур *Arthrospira platensis*, *Porphyridium purpureum*, *Tetraselmis viridis*, которые относятся к различным систематическим группам и выращивались в разных условиях. Таким образом, зная концентрацию хлорофилла, мы можем рассчитать белок или любой другой структурный компонент биомассы.

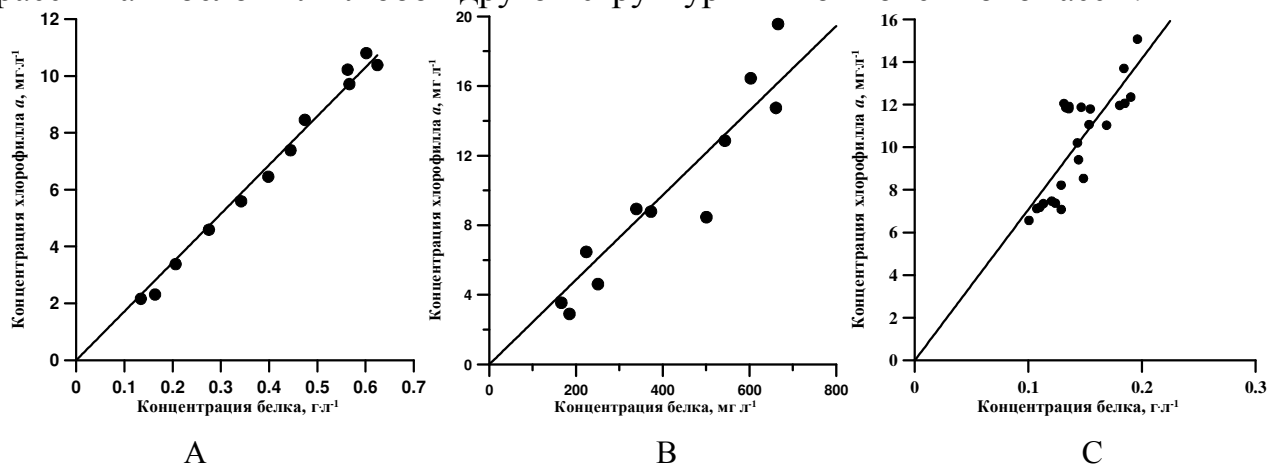


Рисунок 9 – Линейная зависимость между концентрацией общего белка и хлорофилла *a* для: А – *A. platensis* по данным (Минюк и др., 2002), В – *P. purpureum* (Borovkov, Gudvilovich, Lelekov et al., 2023), С – *T. viridis* (Тренкеншу, Лелеков, Новикова, 2018)

Обозначим содержание хлорофилла *a* в биомассе через β , а долю хлорофилла *a* в структурной форме биомассы через β_{str} :

$$\beta_{str} = \frac{\pi}{B_{str}}.$$

Отсюда:

$$\beta = \frac{\beta_{str} B_{str}}{B} = \frac{\beta_{str} B_{str}}{B_{str} + B_{res}} = \frac{\beta_{str}}{1 + \epsilon}.$$

Для непрерывной культуры невысокой плотности (плотностат), система уравнений (29), описывающая динамику трансформации структурных и ресурсных форм биомассы микроводорослей может быть представлена в виде:

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu = \frac{q_{rs}\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} \left| \begin{array}{l} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{array} \right. - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m}{\varepsilon} \left| \begin{array}{l} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{array} \right. - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} \left| \begin{array}{l} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{array} \right. \end{array} \right. , \quad (32)$$

где μ – удельная скорость роста; i_0 – нормированная интенсивность света.

Анализ базовой системы (32) показывает, что возможны два варианта лимитирования скорости роста микроводорослей: внешнее (световое), обусловленное недостаточным притоком энергии ФАР, или внутреннее (метаболическое), связанное с преобразованием ресурсных форм биомассы в структурные.

Модель 1. Ограничение роста культуры интенсивностью света

Решая (32) для условий $\varepsilon_{min} \leq \varepsilon \leq \varepsilon_{sat}, i_{cp} \leq i_0 \leq i_{sat}$, получим зависимость соотношения ресурсных и структурных макромолекулярных форм в биомассе микроводорослей от интенсивности света:

$$\varepsilon = -\frac{1 - q_{rs}\varepsilon_{min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs}\varepsilon_{min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\mu_m\varepsilon_{min}}{\mu_r}i_0}, \quad (33)$$

Выражение (33) применимо при условии отсутствия самозатенения клеток микроводорослей, т. е. при невысоких плотностях культуры. При некоторой облучённости i_{cp} – "компенсационный пункт" фотосинтеза, величина ε достигает минимального значения ε_{min} . С ростом интенсивности света ε увеличивается, достигая максимума при i_{sat} . С учётом (33) содержание хлорофилла a в биомассе микроводорослей имеет вид:

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{1 - \frac{1 - q_{rs}\varepsilon_{min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs}\varepsilon_{min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{min}}{q_{rs}}\frac{i_0}{i_{cp}}}}. \quad (34)$$

Модель 2. Метаболическое ограничение роста культуры

Рассмотрим второй случай $\varepsilon_{sat} \leq \varepsilon \leq \varepsilon_{max}, i_{sat} \leq i_0 \leq i_{max} = 1$, когда лимитирующим фактором является не внешняя облучённость, а скорость трансформации резервных веществ в структурные формы биомассы. Это означает, что удельная скорость роста микроводорослей достигнет максимума при некоторой ненасыщающей интенсивности света i_{sat} , а соотношение ε в клетках будет изменяться с ростом интенсивности света вплоть до светового насыщения i_{max} . Зависимость относительного содержания хлорофилла a от интенсивности света принимает вид:

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{1 + \varepsilon_{max}i_0}. \quad (35)$$

Модель 3. Превращение части структурной биомассы в резервную

Дополним базовую систему уравнений слагаемым, учитывающим то, что часть структурной биомассы может превращаться в резервную. Этот процесс осуществляется в ходе эндогенного катаболизма ("темнового дыхания") микроводорослей. Расход части структурной биомассы обеспечивает процессы

фотобиосинтеза дополнительным количеством энергии в форме макроэргов, а также "углеродными скелетами" – интермедиатами цикла Кребса (Физиология растений, 2005). Пусть удельная скорость распада структур – μ_r , эффективность – q_{sr} . Зависимость относительного содержания хлорофилла a от интенсивности света будет описываться выражением:

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{1 - \frac{1 - q_{rs}\epsilon_{min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs}\epsilon_{min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\epsilon_{min}}{q_{sr}} + \frac{\epsilon_{min}\mu_m}{\mu_r}(i_0 - i_{cp})}}. \quad (36)$$

Таким образом, получены три математические модели, которые позволяют описать изменение величины относительного содержания хлорофилла a от облучённости для культур невысокой плотности. Для верификации рассмотрим экспериментальные данные зависимости относительного содержания хлорофилла a в биомассе *A. platensis* (Заворуева и др., 2011) при её культивировании на различных источниках света (см. рисунок 10 А).

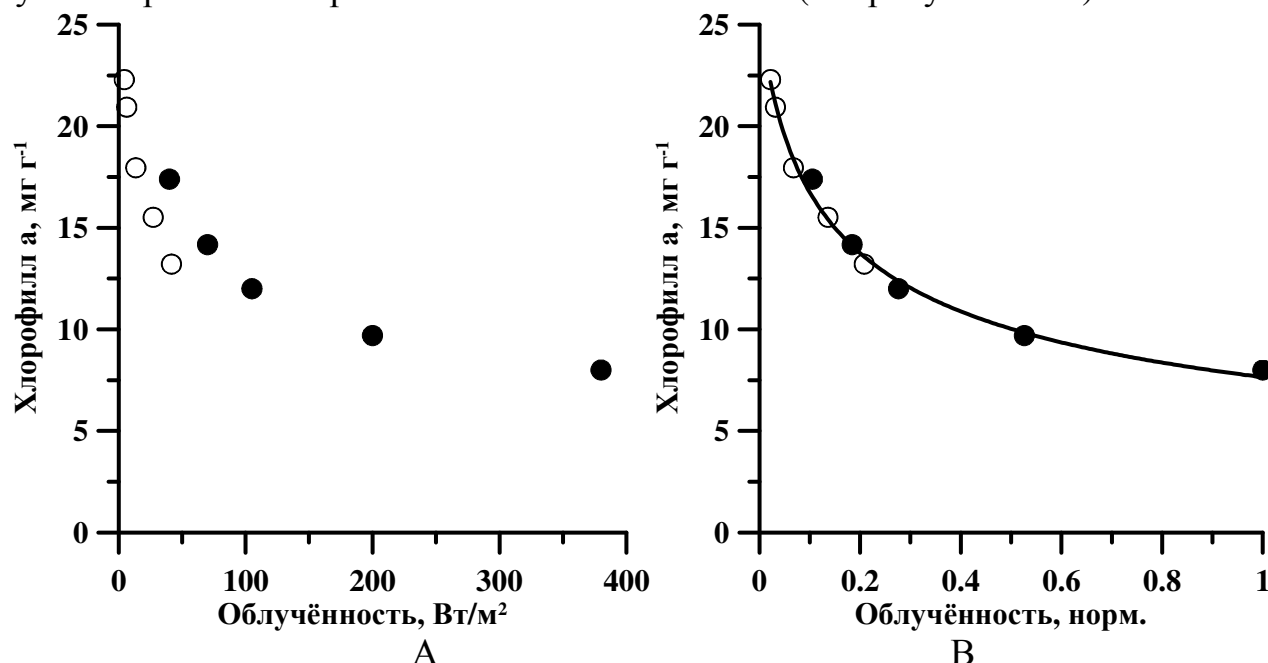


Рисунок 10 А – Зависимость относительного содержания хлорофилла a культуры *A. platensis* от облучённости: $\circ$ – люминесцентные лампы ЛЦ-40, $\bullet$ – галогенная лампа КГ 220-1000-3 (Заворуева и др., 2011). В – нормированные данные (пояснения в тексте), линия – аппроксимация моделью (34) и (36)

Отметим более высокую скорость уменьшения количества хлорофилла a в биомассе спироуины на люминесцентных лампах. Согласно предлагаемому подходу, видоспецифические коэффициенты предложенных уравнений, а именно, ϵ_{min} , q_{rs} , μ_m , μ_r , не могут изменяться при освещении клеток культуры различными лампами. Единственный параметр, который может определяться спектральными характеристиками источника света является насыщающая облучённость I_{sat} , при которой скорость образования резервных форм биомассы (скорость фотосинтеза) достигает максимума. При рассмотрении экспериментальных данных зависимости содержания хлорофилла a от

облучённости в нормированном виде (нормировка выполняется на I_{sat}), кинетические кривые, полученные на различных источниках света для конкретного вида микроводорослей, должны совпадать. Действительно, при нормировке интенсивности света для лампы КГ 220-1000-3 на максимальное значение 380 Вт/м^2 , а для люминесцентных ламп – 200 Вт/м^2 , все точки легли на одну кривую (см. рисунок 10 В).

На текущий момент количество накопленного экспериментального материала для плотностатных культур микроводорослей невелико и представлено единичными работами. Это обстоятельство затрудняет возможность точного расчёта коэффициентов моделей для различных видов. Учитывая, что форма зависимости содержания хлорофилла от света одинакова практически для всех морских микроводорослей (MacIntyre et al., 2002), на основе проведённых расчётов запишем приближённое уравнение светозависимого содержания хлорофилла a от облучённости:

$$\beta = \frac{\beta_{\text{str}}}{0,49 + \sqrt{0,57 + 6,24(i_0 - 0,06)}}. \quad (37)$$

Аппроксимация экспериментальных данных приближённым уравнением (37) для зелёных морских микроводорослей *Dunaliella tertiolecta* (Falkowski, Owens, 1980) и *Tetraselmis (Platymonas) viridis* (Терсков и др., 1979) показало высокую точность описания по критерию R^2 (92 и 98 % соответственно). Доля хлорофилла a в структурной форме биомассы для *T. viridis* составила 2,55 %. Таким образом, доля хлорофилла a в структурной биомассе, вероятно, является видоспецифическим коэффициентом, точная оценка которого требует большого объёма экспериментального материала.

5.2. Удельная скорость роста микроводорослей в плотностате

Из базовой системы уравнений (29) следует, что зависимость удельной скорости роста микроводорослей от интенсивности света для культур невысокой оптической плотности имеет вид:

$$\mu = \mu_m \frac{B_{\text{str}}}{B} \begin{vmatrix} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{vmatrix} - (1 - q_{rs}) \frac{B_{\text{str}}}{B} \frac{\mu_{\text{mrs}}}{\varepsilon_{\text{sat}}} \begin{vmatrix} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{\text{sat}} \\ \varepsilon_{\text{sat}}, \varepsilon \geq \varepsilon_{\text{sat}} \end{vmatrix} - \mu_r \frac{B_{\text{str}}}{B}, \quad (38)$$

Выражение (38) показывает, что удельная скорость роста определяется действующей интенсивностью света I_0 , соотношением резервной и структурной биомассы ε , а также долей структурной биомассы B_{str}/B .

В качестве примера приведём экспериментальные данные роста *Tetraselmis (Platymonas) viridis* в хлорофиллостате при различной интенсивности света (Терсков и др., 1979). С ростом облучённости происходит увеличение удельной скорости роста и биомассы в целом, при этом доля хлорофилла a снижается (рис. 11), стабилизируясь при насыщающей интенсивности света $155 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$. Однако насыщение по удельной скорости роста происходит при значительно более низкой облучённости – $50 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ (см. рисунок 11 А). Это свидетельствует о том, что насыщение по μ и насыщение по β определяются различными лимитирующими звеньями в цепи фотобиосинтеза, которые условно можно назвать световое и метаболическое лимитирование. В контексте предлагаемого

в данной работе двухкомпонентного подхода (32), ограничение скорости роста культуры связано с лимитированием скорости фотосинтеза или скоростью ферментативного преобразования резервных форм биомассы в структурные компоненты. Для диапазона малых облучённостей удельная скорость роста возрастает с увеличением ε . Далее μ снижается в связи с уменьшением эффективности преобразования световой энергии ϕ^0 , которое сопровождается активацией механизмов нефотохимического тушения [Niyogi et al., 2001; Horton, Ruban, 2005]. Физиологические механизмы снижения эффективности фотосинтеза могут быть различными, и их выяснение требует детального рассмотрения и не вписывается в рамки данной работы.

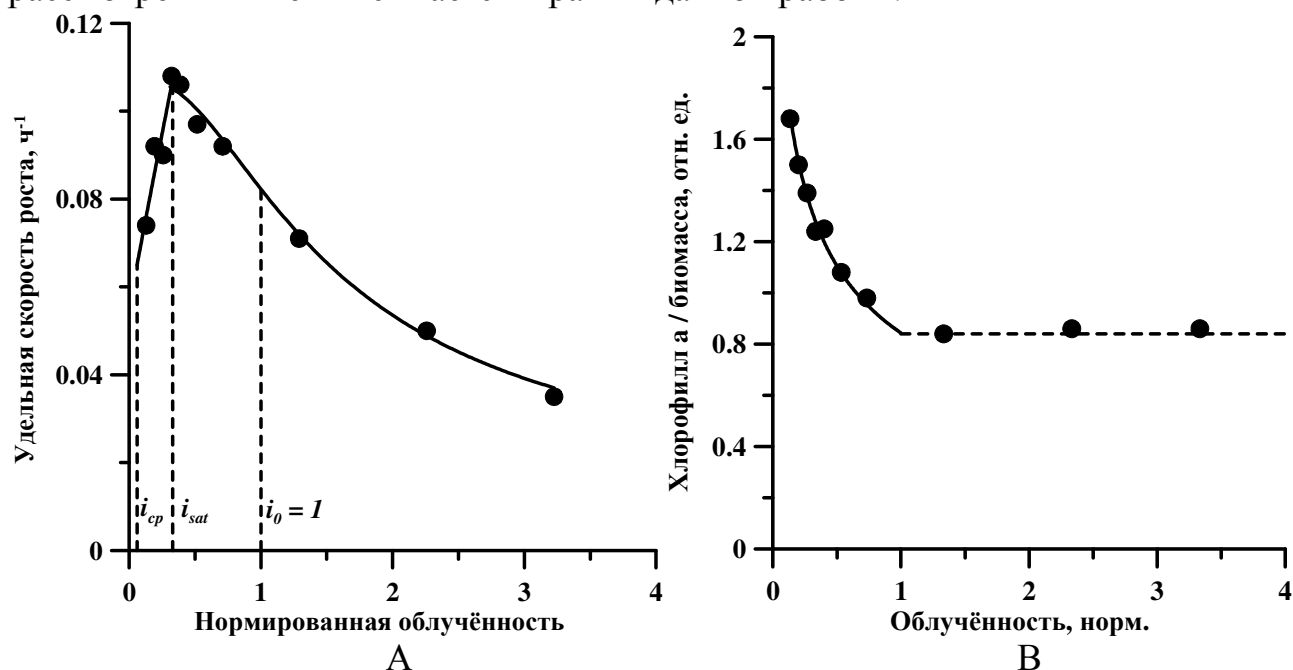


Рисунок 11 Зависимость удельной скорости роста культуры *T. viridis* (А) и содержания хлорофилла *a* от облучённости (В) (Терсков и др., 1979). Линия – аппроксимация экспериментальных данных. Пунктирные линии показывают точки переключения лимитирующего фактора

5.3. Заключение к главе 5

Используя общепринятые положения о разделении световой и темновой стадий фотобиосинтеза, предложены уравнения, позволяющие описывать зависимости удельной скорости роста микроводорослей, соотношения резервная / структурная биомасса и плотности культуры, содержания хлорофилла *a* от интенсивности света. Ключевым аспектом предлагаемого подхода является то, что световую кривую нельзя рассматривать как единое целое и необходимо разделять на участки (области). С ростом облучённости происходит смена лимитирующего фактора, что выражается в изменении функциональной зависимости μ от интенсивности света. В соответствии с предлагаемой двухкомпонентной моделью на кривой можно выделить не менее трёх участков: световое лимитирование, метаболическое лимитирование, а также область насыщения. Максимальные удельные скорости фото- и биосинтеза можно считать постоянными только в области невысокой

интенсивности света, при которой эффективность преобразования световой энергии максимальна.

Глава 6. Моделирование динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей

6.1. Кинетика поглощения азота клеткой

Рассмотрим скорость поступления растворённого в питательной среде азота (концентрация N в среде) в клетки микроводорослей. Она будет определяться количеством транспортных систем (F), их активностью (μ_N) и приведённой плотностью потока молекул (λ) из внешней среды. Приведённая плотность потока молекул субстрата, попадающих в клетки за счёт диффузии или транспортной системы клеток, в простейшем случае пропорциональна концентрации данного вещества во внеклеточной среде. При некоторой концентрации азота N_I в среде, поток становится единичным, и величину приведённой плотности потока азота в клетку можно выразить через отношение N/N_I . Учитывая, что транспортные системы относятся к структурным компонентам клетки, их количество можно выразить через концентрацию структурных форм азота ($f_N = F/N_{str}$). Величина $\mu_N f_N = \mu_{Nm}$ представляет собой максимальную удельную скорость поступления азота в клетки.

6.2. Кинетика трансформации форм азота внутри клетки

В соответствие с предложенным в главе 4 двухкомпонентным подходом, азот, находящийся в клетках, можно представить в виде двух основных форм: структурной и резервной. Скорости ассимиляции и включения азота в структурную часть зададим в виде линейных сплайнов. К структурной части относим азот, входящий в структуру клеточной массы (N_{str}). Эта часть биомассы в основном представлена белками. Резервная часть азота в клетках (N_{res}) представлена той частью, которая еще не вошла в структурные формы и рассматривается как субстрат в последовательности метаболических реакций (включая интермедиаты) (Perez-Garcia et al., 2011). Такое представление полностью согласуется с концепцией Дроупа о том, что скорость роста микроорганизмов зависит от внутриклеточной концентрации лимитирующего субстрата (Droop, 1983; Flynn et al., 1997). Запишем систему уравнений, описывающую динамику внутриклеточных переходов одних форм азота в другие:

$$\begin{cases} \frac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str} \frac{1}{N_{res1}} \begin{cases} N_{res}, N_{res} \leq N_{res1} \\ N_{res1}, N_{res} \geq N_{res1} \end{cases} \\ \frac{dN_{res}}{dt} = \mu_{Nm} N_{str} \frac{1}{N_1} \begin{cases} N, N \leq N_1; \\ N_1, N \geq N_1; \end{cases} - \mu_m N_{str} \frac{1}{N_{res1}} \begin{cases} N_{res}, N_{res} \leq N_{res1} \\ N_{res1}, N_{res} \geq N_{res1} \end{cases} \end{cases}, \quad (39)$$

где μ_m – максимальная удельная скорость включения азота в структуру клетки, μ_{Nm} – максимальная удельная скорость поступления азота в клетки, N_{res1} , N_1 – насыщающие концентрации резервного и азота в среде, при которых скорость достигает максимального значения.

Решение системы (39) при заданных условиях позволит получить интегральные зависимости концентрации различных форм азота от времени.

6.3. Моделирование динамики азотистых соединений в накопительной культуре

Обозначим через $\epsilon_{r/s}$ и $\epsilon_{N/s}$ отношение концентрации резервного азота и концентрации внеклеточного азота к структурному:

$$\epsilon_{r/s} = \frac{N_{\text{res}}}{N_{\text{str}}}, \epsilon_{N/s} = \frac{N}{N_{\text{str}}}. \quad (40)$$

С учётом (40) систему (39) можно переписать в виде:

$$\begin{cases} \frac{dN_{\text{str}}}{dt} = \mu_m N_{\text{str}} \frac{1}{\epsilon_{r/s}^{\text{sat}}} \begin{cases} \epsilon_{r/s}, \epsilon_{r/s} \leq \epsilon_{r/s}^{\text{sat}}; \\ \epsilon_{r/s}^{\text{sat}}, \epsilon_{r/s} \geq \epsilon_{r/s}^{\text{sat}}; \end{cases} \\ \frac{dN_{\text{res}}}{dt} = \mu_{Nm} N_{\text{str}} \frac{1}{\epsilon_{N/s}^{\text{sat}}} \begin{cases} \epsilon_{N/s}, \epsilon_{N/s} \leq \epsilon_{N/s}^{\text{sat}}; \\ \epsilon_{N/s}^{\text{sat}}, \epsilon_{N/s} \geq \epsilon_{N/s}^{\text{sat}}; \end{cases} - \mu_m N_{\text{str}} \frac{1}{\epsilon_{r/s}^{\text{sat}}} \begin{cases} \epsilon_{r/s}, \epsilon_{r/s} \leq \epsilon_{r/s}^{\text{sat}}; \\ \epsilon_{r/s}^{\text{sat}}, \epsilon_{r/s} \geq \epsilon_{r/s}^{\text{sat}}; \end{cases} \end{cases} \quad (41)$$

где $\epsilon_{r/s}^{\text{sat}}, \epsilon_{N/s}^{\text{sat}}$ – насыщающие значения соотношений, при которых скорости определяются внутренней структурой клеток микроводорослей.

Процесс ассимиляции азота и перехода резервных форм азота в структурные, в общем случае, является энергозависимым, что приводит к варьированию параметров μ_m и μ_{Nm} . Согласно литературным данным (Perez-Garcia et al., 2011; Sanz-Luque et al., 2015), преобразование нитратов, нитритов, аммония в глутамат происходит в хлоропластах при участии ферментов глутамат-синтетазы, нитрат-редуктазы и др. Эти реакции происходят с потреблением энергии в форме NADH или АТФ.

Рассмотрим рост культур микроводорослей в условиях избытка азота в культуральной среде. В таких условиях из (41) получим:

$$\begin{cases} B = B_0 e^{\mu_m \cdot t}, \\ N_{\text{str}} = N_{\text{str}0} e^{\mu_m \cdot t}, \\ N_{\text{res}} = N_{\text{res}0} + \frac{(\mu_{Nm} - \mu_m)}{\mu_m} N_{\text{str}0} (e^{\mu_m \cdot t} - 1), \\ N = N_0 - \frac{\mu_{Nm}}{\mu_m} N_{\text{str}0} (e^{\mu_m \cdot t} - 1). \end{cases} \quad (42)$$

Анализируя (42), можно сделать вывод, что при нелимитированном росте количество внутриклеточного азота (как структурного, так и неструктурного) растёт экспоненциально с одинаковым показателем экспоненты. Следовательно, относительное содержание внутриклеточного азота не изменяется. Для верификации выражения (42) были использованы накопительные кривые роста зелёной галофильной микроводоросли *Dunaliella salina* в плоскопараллельных фотобиореакторах толщиной 5 см при облучённости $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ (рис. 12).

При уменьшении соотношения ниже $\epsilon_{N/s}^{sat}$ будет наблюдаться ограничение скорости образования как резервных, так и структурных форм азота. В таких условиях динамика его внешней концентрации в среде запишется в виде:

$$N = N_1 \exp\left(-\frac{\mu_{Nm}}{\epsilon_{N/s}^{sat}}(t - t_1)\right), \quad (43)$$

где N_1 – концентрация азота в среде, при которой $\epsilon_{r/s} = \epsilon_{r/s}^{sat}$.

На восьмые сутки культивирования *Dunaliella salina* произошло полное исчерпание азота из среды, т. е. $N = 0$, $\epsilon_{N/s} = 0$. Однако даже в таких условиях продолжалось увеличение плотности культуры, причём за четыре дня прирост составил около 1 г ОВ/л. Предлагаемая модель позволяет количественно описать наблюдаемый прирост биомассы исходя из того, что при нулевых концентрациях азота в среде образование структурных составляющих происходит только за счёт резервного азота:

$$N_{str} = N_0 - (N_0 - N_{str2}) \cdot \exp\left(-\frac{\mu_m}{\epsilon_{r/s}^{sat}} \cdot (t - t_2)\right), \quad (44)$$

где N_{str2} – концентрация структурных форм азота к моменту окончания азота в среде t_2 .

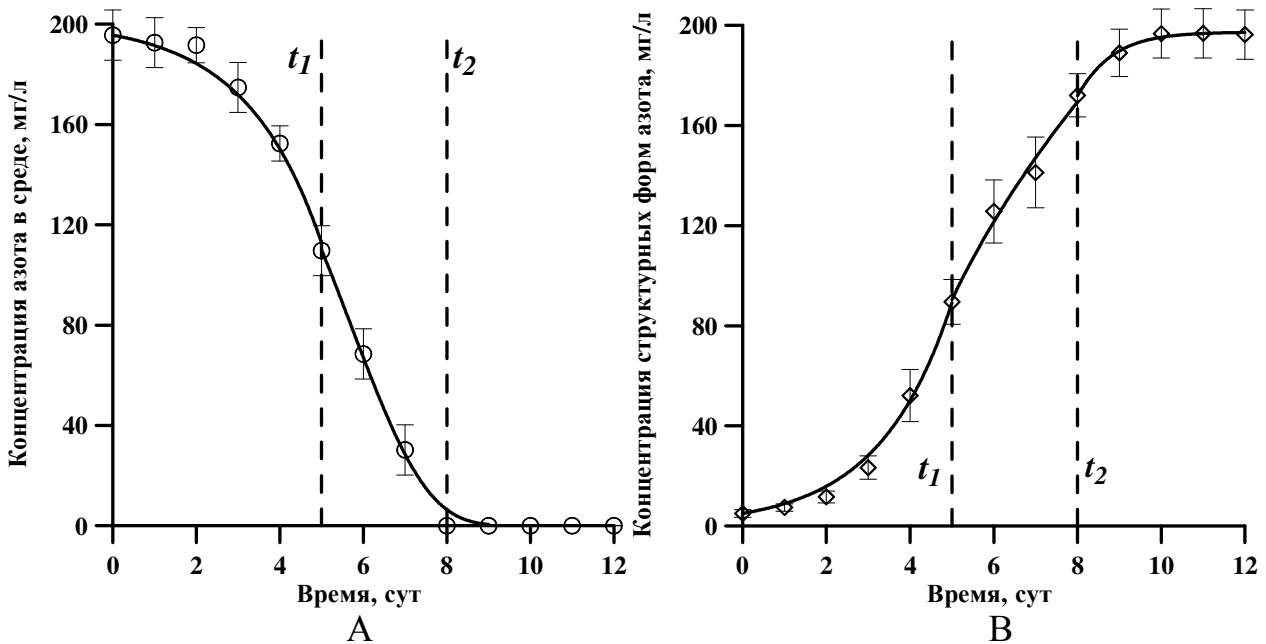


Рисунок 12 Динамика концентрации азота в среде (А) и структурного азота (В) в накопительной культуре *Dunaliella salina*. Линии – аппроксимация экспериментальных данных выражениями (42 – 44) соответственно ($R^2 = 0,98$). Пунктирные линии показывают точки переключения лимитирующего фактора

Верификация уравнения (44) представлена на рисунке 12. Отметим, что введение параметров соотношения резервных и структурных форм биомассы внутри клетки $\epsilon_{r/s}$ и $\epsilon_{N/s}$ позволило получить простые частные решений в элементарных функциях, так как интегральные решения системы (39) в элементарных функциях не выражаются. Накопительную кривую в условиях

недостатка азота необходимо разделить минимум на три области: нелимитированного, лимитированного роста и область отсутствия азота в среде. Такой подход позволяет для каждой области считать постоянными параметры μ_m и μ_{Nm} , которые, в общем случае, зависят от световых условий, в которых находятся клетки.

6.4. Моделирование динамики азотистых соединений в хемостате

Из (41) следует, что для условий хемостата, при лимитировании роста микроводорослей азотом ($\varepsilon_{r/s} < \varepsilon_{r/s}^{sat}, \varepsilon_{N/s} < \varepsilon_{N/s}^{sat}$), зависимость удельной скорости роста культуры микроводорослей от доли структурного азота, представляет собой простое аналитическое выражение:

$$\mu = \frac{\mu_m}{\varepsilon_m} \cdot \frac{1 - \theta}{\theta}. \quad (45)$$

где $\varepsilon_m = \varepsilon_{r/s}^{sat}$ – максимальное содержание резервных форм азота в клетке, θ – доля структурных форм азота в его общем внутриклеточном содержании.

На рисунке 13 (А, В, С) представлена аппроксимация уравнением (45) экспериментальных данных (Flynn, 2001). Пунктиром на графике отмечена точка переключения лимитирующего фактора. В этой точке доля структурных форм достигает минимального значения θ_{min} , а удельная скорость роста не зависит от клеточного содержания азота, максимальна и равна отношению μ_m/ε_m , которое в свою очередь определяется температурой.

Подчеркнём, что в отличие от классического подхода Друпэ (Droop, 1983) удельная скорость роста культуры зависит не от клеточного содержания азота, а только от доли структурных форм, что, по сути, является уточнением концепции Друпэ.

Найдём связь удельной скорости роста с концентрацией азота в среде. Из (39) следует:

$$\begin{cases} \mu = \mu_m \frac{N_{res}}{N_{res1}}, \\ \mu = \mu_{Nm} \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{N}{N_1} - \mu_m \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{N_{res}}{N_{res1}}. \end{cases} \quad (46)$$

Первое уравнение системы (46), показывает, что удельная скорость роста микроводорослей линейно зависит от концентрации резервных форм азота. На рисунке 13 D представлена аппроксимация экспериментальных данных (Flynn, 2001) данным уравнением. Удельная скорость роста равна нулю при исчерпании всех резервных форм азота и достигает максимального значения μ_m при некоторой насыщающей концентрации N_{res1} .

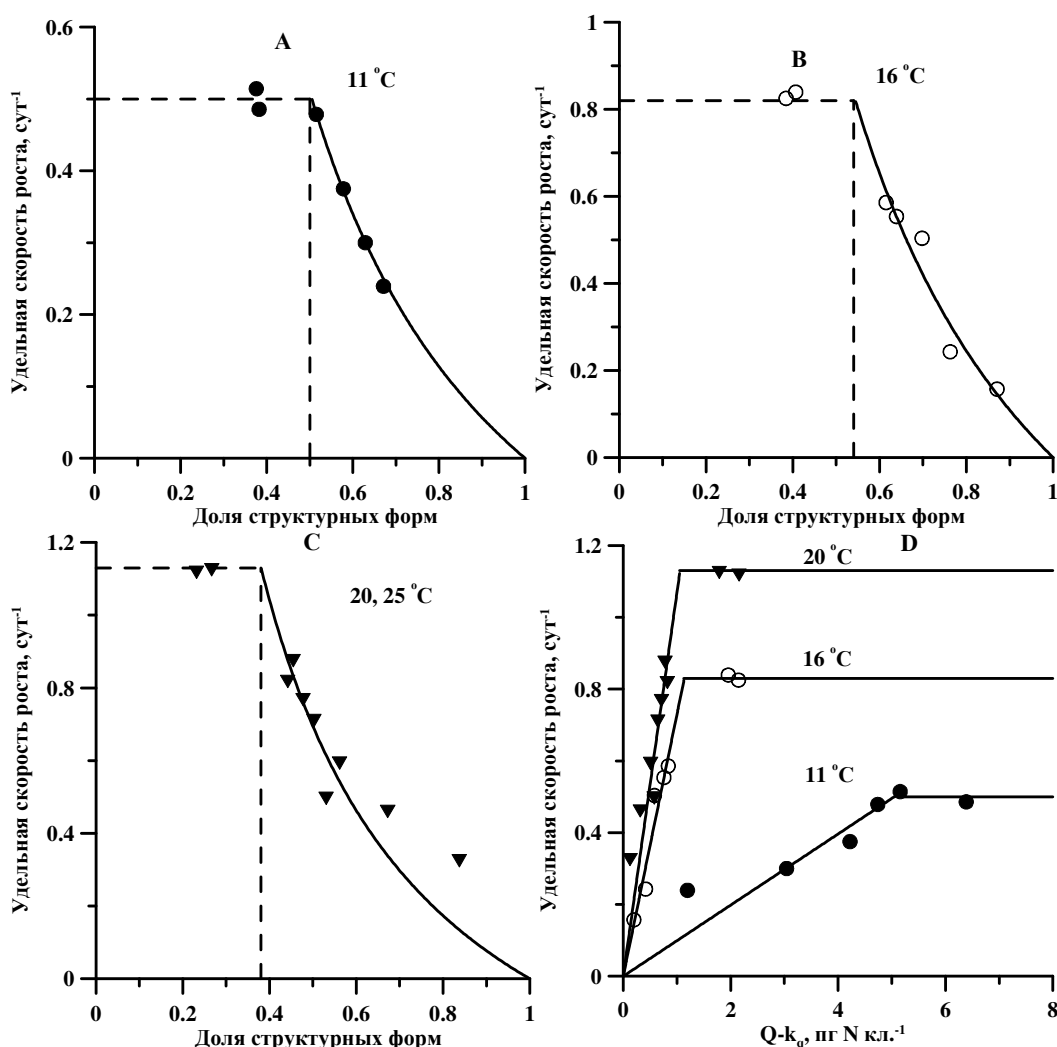


Рисунок 13 Зависимость удельной скорости роста *Scenedesmus* sp. от доли структурных форм азота при различных температурах по данным (Flynn, 2001). Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (45)

Из (46) также можно получить широко используемую зависимость удельной скорости роста от концентрации азота во внешней среде:

$$\mu^* = \frac{\mu_m N}{\frac{\mu_m}{\mu_{Nm}} N_1 + \frac{N_{res1}}{N_{cell}} N}. \quad (47)$$

Уравнение (47) отображает гиперболическую зависимость μ от N и по форме идентично модели Моно. Таким образом, уравнение Моно является частным решением двухкомпонентной модели (39). Очевидно, что выражение (47) справедливо только при постоянной клеточной концентрации N_{cell} , неизменных световых и температурных условиях, которые определяют активности ферментов, участвующих в поглощении и метаболизме азота в клетках микроводорослей.

6.5. Заключение к главе 6

В разделе рассмотрена динамика различных форм азота в накопительной культуре микроводорослей и в условиях хемостата. В соответствии с

предлагаемым принципами моделирования скорости накопления структурных и резервных форм азота заданы линейными сплайнами: в области насыщения скорости максимальны, в области лимитирования линейно зависят от соотношения резервных и структурных форм азота. Частные стационарные решения предлагаемой двухкомпонентной модели описывают зависимость удельной скорости роста культуры микроводорослей от концентрации азота во внешней среде или от доли внутриклеточного азота. Полученные выражения по форме записи близки к классическим моделям Моно (Monod, 1949) и Друпа (Droop, 1983), что, совместно с результатами количественного описания светозависимого роста микроводорослей (глава 5), свидетельствует об универсальности двухкомпонентного подхода. В отличие от модели Друпа (Droop, 1983), выражение (45) показывает, что удельная скорость роста культуры зависит от доли структурных форм азота, а не от общеклеточной квоты, что, по сути, является уточнением концепции Друпа. Для накопительной культуры микроводорослей получены простые интегральные зависимости, впервые описана динамика роста культуры при полном отсутствии азота в среде за счёт использования внутриклеточного резерва.

Глава 7. Рост микроводорослей в оптически плотных культурах

7.1. Модель зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей

Оптический метод определения биомассы микроводорослей является наиболее простым и широко распространенным, в его основе лежит основополагающий закон оптики Бугера-Ламберта-Бера. Однако, вследствие высокой гетерогенности культуры микроводорослей, а также для культур высокой плотности, наблюдаются отклонения от линейной зависимости между оптической плотностью и биомассой микроводорослей. Так как любой оптический прибор определяет именно величину пропускания света, при работе с культурами микроводорослей при определении величины оптической плотности необходимо использовать иную зависимость между оптической плотностью и пропусканием, нежели в виде десятичного логарифма.

Рассмотрим плоскопараллельную кювету, в которой находится культура микроводорослей. Допустим, что клетки представляют собой кубики с площадью боковой грани dS . По литературным данным известно, что одна клетка поглощает около 40 % падающей световой энергии (Фуряев, 1979), обозначим эту величину через α . Пусть I_0 – интенсивность пучка монохроматического света, падающего на поверхность культуры, Вт/м²; S – площадь поперечного сечения кюветы, I_{np} – интенсивность света, прошедшего сквозь культуру, Вт/м². Если в кювете находится только одна клетка, то интенсивность поглощенного (I_n) и проходящего через всю поверхность кюветы света будет определяться по формуле:

$$I_n = I_0 \cdot \alpha \cdot \frac{dS}{S}, \quad I_{np} = I_0 \left(1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S} \right).$$

Коэффициент пропускания T (или поглощения α) для k слоев, в которых находится n клеток, имеет вид:

$$\alpha = 1 - T,$$

$$\frac{I_{npk}}{I_0} = T = \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^k. \quad (48)$$

Учитывая то, что оптическая плотность есть отрицательный логарифм пропускания, предложенный подход позволяет объяснить нелинейную зависимость между оптической плотностью и биомассой микроводорослей. Уравнение (48) является довольно упрощённым, так как не учитывает изменение размеров клеток и содержания биохимических компонентов биомассы микроводорослей в процессе роста культуры. Тем не менее, предложенный подход позволяет с заданной степенью точности (см. рис 15) описывать зависимость пропускания и оптической плотности культуры микроводорослей от их биомассы.

7.2. Линейный рост микроводорослей в плотных культурах

При культивировании микроводорослей различных систематических групп в плоскопараллельных фотобиореакторах накопительная кривая характеризуется наличием продолжительного линейного участка (Naumann et al., 2013), при этом плотность культуры увеличивается в десятки раз. Например, на рисунке 14 представлены накопительные кривые *P. purpureum* и *A. platensis* при различной поверхностной облучённости в 2 см фотобиореакторах.

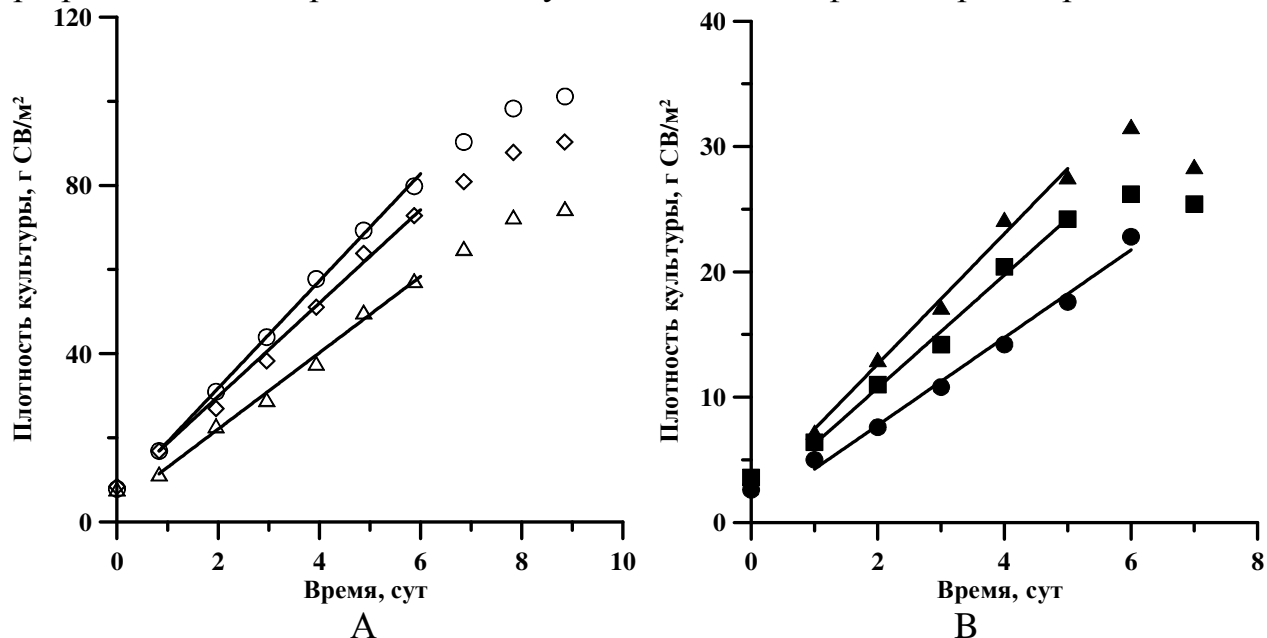


Рисунок 14 А – накопительные кривые роста *P. purpureum* при различной облучённости: $\circ$ – 15 клк; $\diamond$ – 10 клк; Δ – 5 клк. В – накопительные кривые роста *A. platensis* при различной облучённости: $\blacktriangle$ – 8,3 клк; $\blacksquare$ – 6,5 клк; $\bullet$ – 4,5 клк. Линии – аппроксимация линейной фазы роста

В приведённом примере лимитирующим скорость роста фактором не может являться минеральное питание, так как в опыте использовали

концентрированные питательные среды, культуры барботировали газовой смесью с 3 % CO₂. Единственным внешним лимитирующим фактором являются световые условия, в которых находятся клетки микроводорослей. В литературе механизмы линейного роста описаны для культуры гетеротрофов (Марьин, Харитонов, 2014).

Рассмотрим простейшую модель, приводящую к постоянству продуктивности. Ранее показано (глава 4), нормированная скорость роста культуры микроводорослей зависит от поглощённой световой энергии на единицу ключевого мультиферментного комплекса, концентрация которого может быть выражена через хлорофилл *a*, считая хлорофилл частью структурной биомассы (см. рис. 9):

$$\mu_{norm} = \frac{\varphi_e \cdot \alpha \cdot I_0}{\mu_e \cdot f \cdot \pi}, \quad (49)$$

где α – коэффициент поглощения света, I_0 – облучённость поверхности фотобиореактора, Вт·м⁻², φ_e – количество макроэргов, восстанавливающихся за счёт единицы энергии ФАР, мг·Дж⁻¹; μ_e – активность ключевого комплекса, регулирующего энергообмен в клетке, с⁻¹, f – коэффициент пропорциональности между F_0 и π , π – концентрация хлорофилла *a*, мг·м⁻².

Коэффициент поглощения света α рассчитывали по всему ФАР диапазону, используя спектр поглощения культуры. Зависимость коэффициента поглощения от концентрации хлорофилла *a* представлена на рисунке 15. Для культур *A. platensis*, *T. viridis* и *P. purpureum* данные с высокой степенью точности ($R^2 = 0,98$) описываются законом Бугера-Ламберта-Бера – $\alpha = 1 - e^{-k \cdot \pi}$, где $k = 0,017$, $0,008$ и $0,015$ м²·мг⁻¹ – коэффициент удельного поглощения для *A. platensis*, *T. viridis* и *P. purpureum* соответственно.

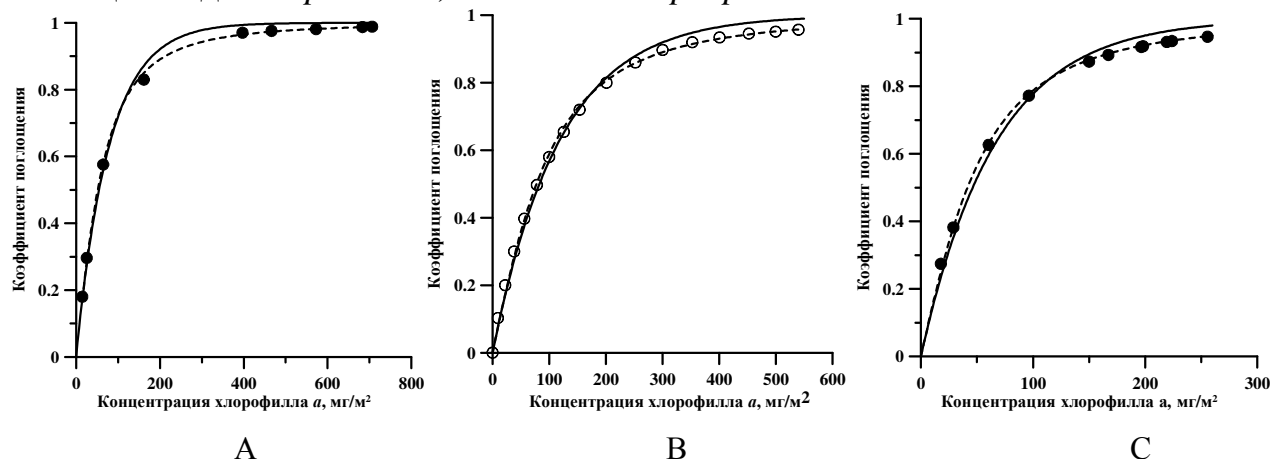


Рисунок 15 Зависимость коэффициента поглощения от концентрации хлорофилла *a* культуры *A. platensis* (А), *T. viridis* (В) по данным (Тренкеншу, 1984) и *P. purpureum* (С). Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением Бугера-Ламберта-Бера, пунктирная линия – уравнением (48) для двух слоёв ($k = 2$). Значения коэффициентов в тексте

Полученные результаты соответствуют литературным данным: данный параметр определяется спектральным составом света и варьирует от 0,005 до

0,03 м²·мг⁻¹ для различных систематических групп низших фотоавтотрофов (Ефимова, 2021). Окончательно, для линейного участка накопительной кривой зависимость удельной скорости роста культуры *A. platensis* при поверхностной освещённости 4,5 клк (см. рис. 14 В) от концентрации хлорофилла *a* имеет вид:

$$\mu = \mu_m \frac{\varphi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0,017 \cdot \pi}}{\pi} - \mu_r, \quad (50)$$

где $\mu_m = 0,8 \text{ сут}^{-1}$ – максимальная удельная скорость роста, определённая на экспоненциальной фазе роста (рис. 14 В); $I_0 = 15 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ – облучённость поверхности фотобиореактора; $\mu_r = 0,06 \text{ сут}^{-1}$ – удельная скорость эндогенного расхода биомассы.

На рисунке 16 А представлена верификация выражения (50). Результаты моделирования подтверждают ранее высказанное предположение, что удельная скорость роста культуры на линейном участке накопительной кривой определяется количеством поглощённой биомассой энергии на единицу хлорофилла. Учитывая, что, по определению, продуктивность культуры равна произведению удельной скорости роста на биомассу, из (50) получим:

$$P = \mu_m \cdot \frac{\varphi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0,015 \cdot \pi}}{\beta} - \mu_r \cdot B. \quad (51)$$

Из (51) следует, что постоянство продуктивности культуры возможно только в случае уменьшения доли хлорофилла *a* (а значит и всех структурных компонентов) в биомассе, что подтверждается экспериментальными данными (рис. 16 В). Независимо от механизмов трансформации биохимического состава можно утверждать, что эти процессы связаны со снижением количества световой энергии, приходящейся на единицу хлорофилла *a*.

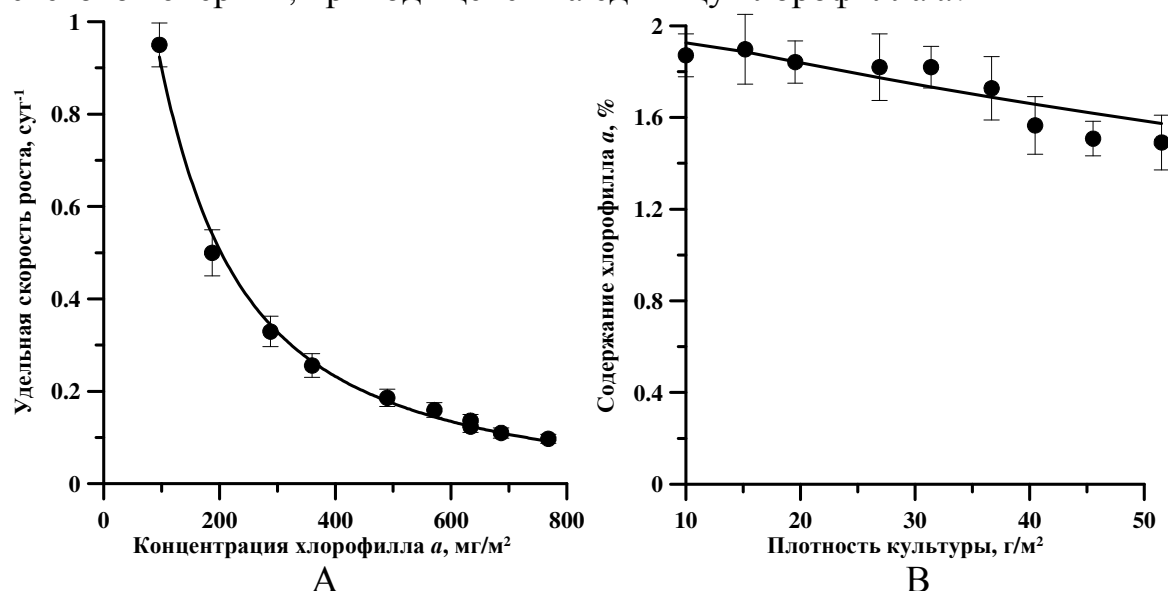


Рисунок 16 Зависимость удельной скорости роста накопительной культуры *A. platensis* от концентрации хлорофилла *a* (А). Линия – аппроксимация экспериментальных данных выражением (50). В – зависимость относительного содержания хлорофилла *a* от плотности культуры *A. platensis* на линейной фазе роста. Линия – расчётная кривая по выражению (51)

7.3. Расчёт максимальной продуктивности культуры микроводорослей в условиях естественного освещения

Оценим максимальную продуктивность культуры микроводорослей в условиях естественного освещения. В качестве примера рассмотрим один из массовых объектов альготехнологии – дуналиеллу солоноводную *Dunaliella salina*, которая культивируется в промышленных масштабах с конца прошлого века. Валовая продуктивность культуры P_0 определяется притоком энергии ФАР, коэффициентом поглощения, а также эффективностью её утилизации (КПД фотобиосинтеза). При расчёте будем рассматривать оптически плотную культуру, т. е. вся падающая солнечная энергия поглощается суспензией микроводорослей, коэффициент поглощения света равен единице. При плотности культуры более $0,5 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1}$ и глубине бассейна около 10 см такое предположение близко к истине. В простейшем случае выражение для определения P_0 имеет вид:

$$P_0 = \eta \cdot \frac{E}{R}, \quad (52)$$

где η – КПД фотобиосинтеза, E – суммарное количество энергии в области ФАР, приходящее на поверхность бассейна, R – калорийность биомассы.

Для расчёта КПД фотобиосинтеза воспользуемся данными работы (Терсков и др., 1979) для зелёной микроводоросли *T. viridis*, характеризующуюся схожим с *D. salina* набором фотосинтетических пигментов. Среднее за световой день значение КПД составило 5,58 %. Для условий г. Севастополь максимальная высота солнцестояния составляет около 68 градусов. 22 июня (день летнего солнцестояния) суммарная энергия, падающая за световой день на поверхность бассейна, составила $10,385 \text{ МДж/м}^2$. Полученное значение примерно на 15 % ниже, чем для широты Испании или Италии, где максимальный приток солнечной радиации в области ФАР составляет около 12 МДж (García-González et al., 2003). Средняя калорийность R 1 г биомассы *D. salina*, как и многих других видов микроводорослей, составляет около 5 ккал или 20,86 кДж (Белянин и др., 1980). Таким образом, валовая продуктивность *D. salina* для среднего за световой день значения КПД фотобиосинтеза, при её выращивании в бассейне альгобиотехнологического модуля, расположенного на базе ФИЦ ИнБЮМ г. Севастополя, равняется:

$$P_0 = 0,558 \cdot \frac{10385}{20,86} \cong 27,8 \text{ г СВ м}^{-2} \text{сут}^{-1}.$$

При росте микроводорослей в условиях естественного свето-темнового режима в общем балансе продукции необходимо учитывать ночную потерю биомассы (НПБ), которая происходит за счёт дыхания клеток, а также выделения экзометаболитов в среду (Авсиян, 2014). Экспериментально показано, что НПБ в среднем составила около 5 % от биомассы как на основании измерений оптической плотности культуры, так и на основании измерений сырого и сухого веса. Таким образом, максимальная наблюдаемая продуктивность *D. salina* составит около $26 \text{ г СВ м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$. Реализация максимально возможной скорости роста *D. salina* осуществима только в

искусственных условиях биотехнологических комплексов с высоким уровнем обеспеченности минеральным питанием. Рассчитанное максимальное значение продуктивности необходимо для оценки потенциально возможного сезонного урожая микроводорослей при их промышленном выращивании на юге Крыма.

7.4. Моделирование динамики макромолекулярного состава биомассы микроводорослей в условиях естественного освещения

Рассмотрим оптически плотную культуру микроводорослей, находящуюся в открытом плоскопараллельном бассейне при естественном освещении. Предположим, что культура находится в условиях лимитирования по свету, при этом минеральное обеспечение и температурные условия не являются лимитирующими факторами. С учётом обозначенных ограничений базовая двухкомпонентная модель (29) имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dB_{str}}{dt} = q_{rs} \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{res} - \mu_r B_{str}, \\ \frac{dB_{res}}{dt} = \frac{\mu_m}{I_{sat}} B_{str} I - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{res}, \end{cases} \quad (53)$$

Для летнего солнцестояния в интервал времени от восхода солнца (около 5:00) до 6:30 значения интенсивности света на широте г. Севастополь были ниже компенсационного пункта фотосинтеза. Далее, с 6,5 до 10 часов, облучённость возрастает практически линейно и с высокой точностью ($R^2 = 0,98$) описывается уравнением:

$$I_{sun} = 10 + 100 \cdot (t - 6,5), 6,5 \leq t \leq 10.$$

Окончательно выражение для средней пространственной освещённости имеет вид:

$$I = \frac{10 + 100 \cdot (t - 6,5)}{k \cdot B_{str}}, \quad (54)$$

где k – коэффициент согласования единиц размерности.

Подставляя (54) в (53), с учётом ранее определённых видоспецифических коэффициентов, получим систему уравнений, описывающую рост культуры микроводорослей в утренние часы:

$$\begin{cases} B_{res} = 1,2 e^{-2t} + 3t - 1,2, \\ B_{str} = 251 e^{-0,1t} - 0,5 e^{-2t} + 24t - 250. \end{cases} \quad (55)$$

На рисунке 17 представлена динамика резервной и структурной биомассы микроводорослей. Анализ полученных результатов показывает, что рост плотности культуры микроводорослей в первые часы после восхода солнца происходит только из-за накопления резервной части биомассы, значения структурной части биомассы за 6 часов практически не изменяются. Подобные выводы подтверждаются литературными данными (Chauton et al., 2013; Jalet et al., 2016), когда за несколько часов после включения света концентрация белка в культуре *Ph. tricornutum* не изменялась.

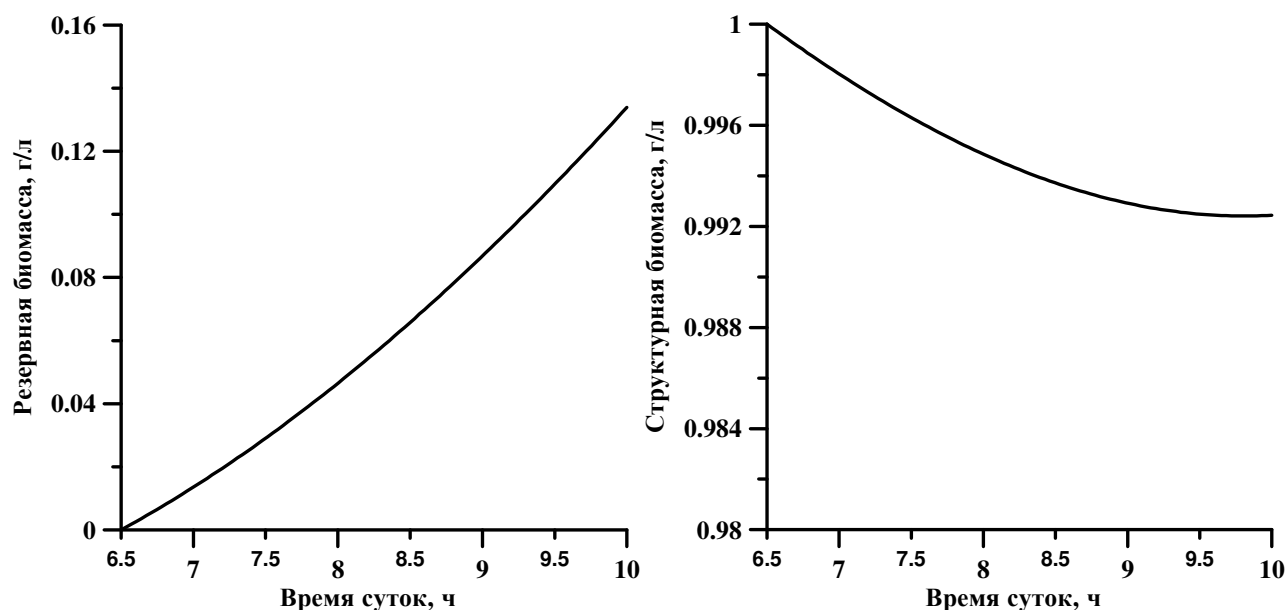


Рисунок 17 Динамика резервных и структурных составляющих биомассы микроводорослей в утренние часы после восхода солнца

7.5. Предельная оценка скорости роста культур микроводорослей в условиях лимита по углероду

Линейный рост накопительной культуры микроводорослей наблюдается не только при световом лимитировании, но и в случае лимитирования потоком углекислого газа. Эффективность фиксации углерода является одним из важнейших видоспецифических характеристик микроводорослей. Оценка предельной продуктивности культур микроводорослей при их выращивании на атмосферном воздухе со скоростью подачи 1 л/мин воздуха на 1 л культуры показала, что эта величина достигает 0,46 г СВ с 1 л культуры в сутки. Доля углерода в биомассе принята равной 50 % (Кожемяка, 2014). Аналогичные расчёты можно провести для определения минимального количества воздуха, необходимого для выращивания 1 грамма биомассы микроводорослей – 3111 л.

Полученные теоретические значения максимальной продуктивности культур микроводорослей верны только для условий ограничения скорости роста количеством подаваемого углекислого газа воздуха, в то время как световые условия и минеральное обеспечение не является лимитирующими факторами. Для верификации приведены накопительные кривые роста красной морской микроводоросли *P. purpureum* в 2 см фотобиореакторах и поверхностной освещённости 13 клк (рис. 18). Аппроксимация линейной фазы роста в обоих вариантах позволила определить величину максимальной продуктивности, которая при барботаже через капилляр составила $0,1 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, а при использовании аквариумного распылителя – $0,4 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$. С учётом заданной скорости подачи воздуха (1,25 л/мин) эффективность поглощения углекислого газа в эксперименте составила 17 и 69 % соответственно. Увеличение удельной поверхности соприкосновения фаз "воздух-жидкая среда" позволило значительно повысить максимальную продуктивность культуры *P. purpureum*.

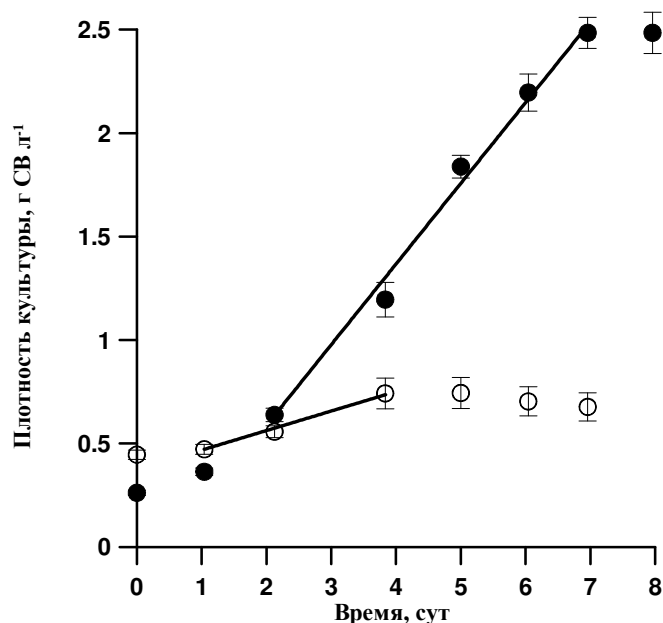


Рисунок 18 Накопительные кривые роста *P. purpureum* при различных способах подачи воздуха в фотобиореактор. ○ – барботаж через капилляр, ● – барботаж через аквариумный распылитель воздуха. Линия – аппроксимация линейной фазы роста

7.6. Заключение к главе 7

В данной главе рассмотрен рост оптически плотных культур микроводорослей в условиях лимитирования по свету и газовому обеспечению. Несмотря на то, что в таких условиях происходит изменение биохимического состава биомассы, на продолжительном отрезке времени наблюдаемая скорость роста культуры остаётся постоянной. Основные параметры, которые могут быть положены в основу управления ростом культуры микроводорослей, это максимальная продуктивность, КПД фотобиосинтеза, соотношение резервной и структурной биомассы, а также доля структурной биомассы. Данные величины следует рассматривать как некоторые обобщённые коэффициенты физиологического состояния культуры, включающие всю совокупность биосинтетических и биоконверсионных процессов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Современные математические модели, которые применяются для описания метаболизма микроводорослей, можно разбить на три группы (Ризниченко, Рубин, 1993): регрессионные и другие эмпирически установленные зависимости, качественные модели, а также имитационные модели конкретных молекулярных, клеточных или экологических систем. При моделировании динамики плотности культуры микроводорослей как в отечественной, так и зарубежной литературе обычно используют качественные модели, условно разделяемые на неструктурированные и структурированные (Minkevich et al., 2013). Последние рассматривают биомассу не как единое целое, а в качестве совокупности нескольких частей. Именно такой подход представляется наиболее адекватным, так как позволяет записать рост культуры

микроводорослей небольшим числом дифференциальных уравнений, учесть изменение биохимического состава биомассы, наделить параметры модели биологическим смыслом, получить простые аналитические уравнения.

С методологической точки зрения множество вопросов вызывает предположение о пропорциональности скорости роста культуры концентрации лимитирующего субстрата, которое появилось в биокинетике из ферментативной кинетики. Известно, что ассимиляция биогенов и биосинтез – это напрямую независимые процессы, которые протекают с разными скоростями на разных ферментных комплексах. Процессы метаболизма, протекающие в клетках микроводорослей, существенно отличаются от обычных ферментативных реакций *in vitro*, биологические системы имеют организованную структуру, включающую не только ферментные, но и транспортные компоненты. В монографии (Тренкеншу, 2005) показано, что скорость метаболической реакции при субстратном лимитировании определяется не концентрацией, а *потоком* субстрата на ключевой мультиферментный комплекс с учётом его структурной организации. Рассматривая рост культуры микроводорослей как совокупность энергообменных реакций, в данной работе получены аналогичные выводы: скорость синтеза биомассы прямо пропорциональна приведённой плотности потока лимитирующего субстрата и достигает максимума при единичном потоке, т. е. описывается линейными сплайнами.

Для учёта изменения биохимического состава биомассы была предложена двухкомпонентная модель роста микроводорослей в культуре: биомасса микроводорослей представляется в виде суммы структурной и резервной составляющих. В литературе приводятся двух- и более компонентные модели роста микроорганизмов (Flynn, 2001; Минкевич, 2005; Monaco, McQuaid, 2018). Для микроводорослей, характеризующихся разделением фотохимических и ферментативных процессов, применение именно двухкомпонентного подхода совместно с использованием линейных сплайнов позволило установить простые количественные взаимосвязи скорости роста и продукции её основных биохимических компонентов с внешними условиями. Высказанное предположение о пропорциональности всех компонентов структурной биомассы, которое косвенно подтверждается высокой корреляцией хлорофилла *a* и белка для микроводорослей различных систематических групп, выращиваемых в различных условиях, значительно упростило верификацию модели, благодаря нормировке приведённой плотности потока на хлорофилл *a* или структурную биомассу в целом. Верификация предложенного подхода продемонстрирована при описании световых кривых фотосинтеза, ассимиляции нитратов, зависимости удельной скорости роста культуры от температуры. Использование линейных сплайнов позволило объяснить линейный рост биомассы микроводорослей при накопительном культивировании. Независимо от механизма, обеспечивающего линейный рост, постоянство продуктивности позволяет относительно простыми способами управлять биохимическим составом получаемой биомассы в широком диапазоне плотностей культуры.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показана возможность применения линейных сплайнов для описания зависимости скорости синтеза биомассы микроводорослей от приведённой плотности потока лимитирующего субстрата. Такой подход позволил задать точку переключения лимитирующего фактора, получить аналитические решения систем дифференциальных уравнений, определить видоспецифические коэффициенты моделей.
2. Разработана универсальная двухкомпонентная модель фотоавтотрофного роста культуры микроводорослей, которая объясняет адаптацию биохимического состава клеток к изменяющимся внешним условиям. Показано, что соотношение резервных и структурных компонентов биомассы является ключевым экспериментально измеряемым параметром, который определяет скорость синтеза структурных компонентов биомассы.
3. Впервые предложена двухкомпонентная модель, описывающая рост культуры микроводорослей при азотном голодании. Для условий хемостата получено частное решение модели, по форме совпадающее с уравнением Моно. Установлено, что удельная скорость роста определяется долей структурных форм азота.
4. Для культур микроводорослей невысокой оптической плотности получено универсальное уравнение зависимости содержания хлорофилла *a* от интенсивности света. Показано, что зависимость удельной скорости роста культуры от интенсивности света характеризуется наличием трёх функционально различных участков: световое, метаболическое лимитирование, а также область насыщения.
5. Для оптически плотной культуры микроводорослей выявлена количественная взаимосвязь удельной скорости роста и концентрации хлорофилла *a*. Показано, что постоянство продуктивности культуры обусловлено снижением доли структурных компонентов биомассы.
6. Для условий естественного освещения впервые предложены прогностические модели динамики резервных и структурных компонентов биомассы микроводорослей, на основе которых можно разрабатывать алгоритмы получения биомассы требуемого биохимического состава. Для южного берега Крыма рассчитана максимально возможная продуктивность культуры, которая составила $26 \text{ г СВ м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ (рецензируемые издания, рекомендуемые ВАК)

1. Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Lelekov A.S., Avsiyan A.L. Effect of specific irradiance on productivity and pigment and protein production of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) semi-continuous culture // Bioresource Technology. 2023. Vol. 374. doi: 10.1016/j.biortech.2023.128771.
2. Лелеков А.С., Чернышев Д.Н., Ключкова В.С. Количественные закономерности роста накопительной культуры *Arthrospira platensis* // Математическая биология и биоинформатика. 2022. Т. 17, № 1. С. 156–170.

3. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Двухкомпонентная модель роста микроводорослей в плотностате // Математическая биология и биоинформатика. 2021. Т. 16, № 1. С. 101–114.
4. Lelekov A.S., Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Memetshaeva O.A., Trenkenshu R.P. Estimation of *Dunaliella salina* Teod. maximum productivity under natural illumination // Theoretical and Applied Ecology. 2021. Vol. 2021, no 2. P. 202–207.
5. Gudvilovich I.N., Lelekov A.S., Maltsev E.I., Kulikovskii M.S., Borovkov A.B. Growth of *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) and production of b-phycoerythrin under varying illumination // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. Vol. 68, iss. 1. P. 188–196.
6. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Моделирование содержания хлорофилла *a* в культурах микроводорослей // Математическая биология и биоинформатика. 2020. Т. 15, № 2. С. 158–171.
7. Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М., Гудвиллович И.Н., Авсиян А.Л., Меметшаева О.А. Моделирование динамики содержания пигментов в клетках одноклеточной водоросли *Dunaliella salina* Teod. на стадии каротиногенеза // Математическая биология и биоинформатика. 2019. Т. 14, № 1. С. 279–289.
8. Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Avsiyan A.L., Memetshaeva O.A., Lelekov A.S., Novikova T.M. Production characteristics of *Dunaliella salina* at two-phase pilot cultivation (Crimea) // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2020. Vol. 20, no. 5. P. 401–408.
9. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Моделирование динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей. 2. Хемостат // Математическая биология и биоинформатика. 2019. Т. 14, № 2. С. 450–463.
10. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей. 1. Накопительная культура // Математическая биология и биоинформатика. 2018. Т. 13, № 2. С. 348–359.
11. Lelekov A.S., Gevorgiz R.G., Zhondareva Ya.D. Production characteristics of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin grown on medium with artificial sea water // Applied Biochemistry and Microbiology. 2016. Vol. 52, no. 3. P. 331–335.
12. Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Memetshaeva O.A., Lelekov A.S., Novikova, T.M. Morphological and morphometrical features in *Dunaliella salina* (Chlamydomonadales, Dunaliellaceae) during the two-phase cultivation mode // Ecologica Montenegrina. 2019. Vol. 22. P. 157–165.
13. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре // Морской биологический журнал. 2018. Т. 3, № 1. С. 53–60.
14. Kopytov Yu.P., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V., Novikova T.M. The method of complex determining of biochemical composition of microalgae // International Journal on Algae. 2015. Vol. 17, no 4. P. 397–402.

(Монографии)

15. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование роста микроводорослей в культуре / Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского, РАН. Севастополь: ООО "Константа", 2017. 152 с.

(Патенты)

16. Тренкеншу Р.П., Боровков А.Б., Лелеков А.С. Установка для культивирования низших фототрофов: пат. на изобр. 150345 Российская Федерация. МПК С12N 1/12 (2006.01); патентообладатель (и) Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН; № 2014150202/93; заявл. 29.10.2014; опубл. 10.02.2015, Бюл. №4.
17. Гудвилович И.Н., Лелеков А.С. Способ выращивания микроводоросли *Porphyridium purpureum*: пат. на изобр. 2675318 Российская Федерация. МПК С12N 1/00 (2006.01); патентообладатель (и) Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН; № 2016147461; заявл. 02.12.2016; опубл. 18.12.2018, Бюл. № 35.