

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ ИМЕНИ А. О. КОВАЛЕВСКОГО РАН»

На правах рукописи



ЛЕЛЕКОВ АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ

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

1.5.2. Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
академик РАН, профессор,
доктор биологических наук,
Егоров Виктор Николаевич

Севастополь – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. Кинетические модели роста культуры микроводорослей	
(Обзор литературы)	15
1.1. Кинетические параметры роста культуры микроводорослей.....	15
1.2. Рост культур микроводорослей в закрытых и открытых системах.....	18
1.2.1. Способы культивирования микроводорослей.....	18
1.2.2. Фазы роста накопительной культуры микроводорослей.....	19
1.2.3. Рост культуры микроводорослей в открытых системах.....	22
1.3. Поглощение света микроводорослями.....	25
1.3.1. Модели светозависимого роста культуры микроводорослей.....	26
1.4. Поглощение клетками микроводорослей основных биогенных элементов...	29
1.4.1. Особенности поглощения углерода клетками микроводорослей.....	32
1.4.2. Ассимиляция азота клетками микроводорослей.....	35
1.4.3. Ассимиляция фосфора клетками микроводорослей.....	36
1.4.4. Моделирование кинетики поглощения биогенных элементов.....	37
1.5. Изменение содержания биохимических компонентов в культуре микроводорослей.....	44
1.5.1. Моделирование зависимости относительного содержания пигментов от облучённости.....	46
1.6. Моделирование влияния температуры на скорость роста микроводорослей	48
1.7. Постановка цели и задач исследования.....	50
ГЛАВА 2. Материал и методы исследований	52
2.1 Унифицированная установка для исследования роста микроводорослей.....	52
2.2 Альгобиотехнологический модуль.....	55
2.3 Приборы и измеряемые величины.....	56
ГЛАВА 3. Динамические модели роста накопительной культуры микроводорослей	58
3.1. Моделирование динамики плотности накопительной культуры.....	58
3.1.1. Логистическая функция.....	60
3.2. Динамическая модель накопительной культуры с учётом потерь биомассы	64
3.3. Динамика плотности культуры микроводорослей в стационарной фазе	

роста.....	71
3.4. Моделирование динамики роста <i>Arthrospira platensis</i> и pH среды в закрытой по углероду системе.....	75
3.5. Модель динамики пигментов в накопительной культуре микроводорослей	81
3.5.1. Моделирование процессов синтеза, фотодеструкции и восстановления пигментов при экспоненциальном росте культуры микроводорослей.....	82
3.5.2. Анализ модели.....	88
3.5.3. Описание экспериментальных данных.....	90
3.5.4. Моделирование динамики содержания пигментов в клетках <i>Dunaliella salina</i> на стадии каротиногенеза	95
3.6. Заключение к главе 3.....	101
ГЛАВА 4. Моделирование энергообмена микроводорослей на макромолекулярном уровне организации	103
4.1. Разделение процессов массо- и энергообмена.....	103
4.2. Предельная скорость энергообмена.....	105
4.3. Зависимость скорости синтеза биомассы микроводорослей от внешних потоков субстрата.....	107
4.3.1. Кинетика светозависимого роста.....	107
4.3.2. Лимитирование роста биогенными элементами.....	109
4.3.3. Линейные сплайны как способ описания смены лимитирующих факторов.....	110
4.4. Ограничение роста микроводорослей внутриклеточными потоками субстрата.....	112
4.5. Моделирование скорости фотобиосинтеза линейными сплайнами.....	116
4.5.1. Мгновенные световые кривые.....	116
4.5.2. Поглощение нитратов микроводорослями.....	124
4.5.3. Зависимость максимальной удельной скорости роста от температуры.....	125
4.6. Заключение к главе 4.....	129
ГЛАВА 5. Светозависимый рост микроводорослей в культурах невысокой плотности	132
5.1. Моделирование содержания хлорофилла <i>a</i> в плотностате.....	132
5.2. Удельная скорость роста микроводорослей в плотностате.....	143
5.3. Заключение к главе 5.....	152

ГЛАВА 6. Моделирование динамики азотистых соединений в культурах микроводорослей	153
6.1. Кинетика поглощения азота клеткой.....	153
6.2. Кинетика трансформации форм азота внутри клетки.....	155
6.3. Моделирование динамики азотистых соединений в накопительной культуре.....	157
6.3.1. Экспоненциальный рост ($\epsilon_{r/s} \geq \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} \geq \epsilon_{N/s}^{sat}$).....	159
6.3.2. Анализ модели нелимитированного азотом роста.....	162
6.3.3. Лимитированный рост культуры, концентрация азота в среде меньше насыщающей ($\epsilon_{r/s} \geq \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} < \epsilon_{N/s}^{sat}$).....	166
6.3.4. Лимитированный рост культуры, концентрация резервного азота меньше насыщающей ($\epsilon_{r/s} < \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} < \epsilon_{N/s}^{sat}$).....	167
6.3.5. Лимитированный рост культуры, концентрация азота в среде равна нулю ($\epsilon_{r/s} < \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} = 0$).....	168
6.4. Моделирование динамики азотистых соединений в хемостате.....	170
6.4.1. Общая модель динамики азотистых соединений в хемостате.....	171
6.4.2. Предельные характеристики непрерывной культуры.....	172
6.4.3. Внутриклеточное содержание азота.....	173
6.4.4. Лимитирование роста азотом.....	174
6.4.5. Внутриклеточное содержание азота лимитированной культуры.....	175
6.4.6. Зависимость удельной скорости роста от внутриклеточного содержания азота культуры.....	176
6.4.7. Зависимость удельной скорости роста от внешней концентрации азота.....	177
6.5. Заключение к главе 6.....	179
ГЛАВА 7. Рост микроводорослей в оптически плотных культурах	181
7.1. Модель зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей.....	181
7.2. Линейный рост микроводорослей в плотных культурах.....	181
7.3. Расчёт максимальной продуктивности культуры микроводорослей в условиях естественного освещения.....	186
7.4. Моделирование динамики макромолекулярного состава биомассы микроводорослей в условиях естественного освещения.....	197
7.5. Предельная оценка скорости роста культур микроводорослей в условиях	

лимита по углероду.....	201
7.6. Заключение к главе 7.....	204
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	205
ВЫВОДЫ	210
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	211

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

B – плотность культуры микроводорослей (биомасса)
 P – скорость роста культуры (продуктивность)
 P_0 – скорость синтеза биомассы
 μ – удельная скорость роста
 μ_r – удельная скорость распада биомассы
 ω – удельная скорость протока питательной среды
 μ_0 – удельная скорость синтеза биомассы
 B_{str} – структурная часть биомассы
 B_{res} – резервная часть биомассы
 N_{str} – структурная часть внутриклеточного азота
 N_{res} – резервная часть внутриклеточного азота
 ε – соотношение резервная / структурная биомасса
 θ – доля структурных форм азота в общеклеточном содержании
 λ – приведённая плотность потока субстрата
 S – концентрация субстрата
 I_0 – поверхностная облучённость
 I_{sat} – насыщающая облучённость
 i_0 – нормированная интенсивность света
 F – концентрация ключевого ферментного комплекса
 μ_e – активность ключевого ферментного комплекса
 β – доля биохимического компонента в биомассе
 π – концентрация хлорофилла a
 η – КПД фотобиосинтеза
ФАР – фотосинтетически активная радиация
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
РБФК – рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа
CO₂-КМ – CO₂-концентрирующий механизм

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Низшие фотоавтотрофные организмы – одни из древнейших обитателей Земли. Они появились гораздо раньше высших растений, их значимость для нормального протекания энергетических процессов в биосфере огромна [11]. В современной систематике к категории низших фотоавтотрофов относят одноклеточные водоросли и цианопрокариоты, которые способны к оксигенному фотосинтезу, характеризуются разделением фотохимических и ферментативных процессов. В противоположность фотосинтезирующим бактериям, данные микроскопические организмы являются облигатными фотоавтотрофами и практически не способны (за исключением некоторых видов) усваивать экзогенные органические соединения. Помимо синтеза углеводов из неорганического углерода, некоторые цианобактерии являются азотфиксаторами, что позволяет считать их абсолютными первичными продуцентами органического вещества на планете [51].

На сегодняшний день спектр культивируемых гидробионтов обусловлен как требованиями практики, например, аквакультуры, так и фундаментальными научными проблемами. В последнем случае исследования проводят с объектами, удобными для решения конкретных научных задач. Наиболее успешным примером в этом отношении можно назвать микроводоросли (цианобактерии). Культуры микроводорослей используются в качестве модельных объектов при исследовании закономерностей влияния экологических факторов среды на скорость роста и продукцию биохимических компонентов клеток. Кроме того, работы с культурами незаменимы при оценке первичной продукции водоёмов. Широкое распространение культуры микроводорослей получили ещё в начале двадцатого века при исследовании фотосинтеза. Основным достоинством использования культур микроводорослей является возможность получения воспроизводимых результатов. Это позволяет с заданной точностью дать количественную оценку влияния того или иного фактора среды на скорость фотобиосинтеза. К достоинствам культур микроводорослей также следует отнести малые, часто правильные геометрические размеры клеток и высокую скорость размножения. Удельная скорость роста как пресноводных, так и морских одноклеточных водорослей может достигать $0,3 - 0,4 \text{ ч}^{-1}$ [10], а микроскопические размеры клеток позволяют работать с популяциями численностью намного выше 10 млн./мл. Эксперименты с такими объектами можно провести в течение нескольких дней, что невозможно с крупными особями, время генерации которых составляет годы. 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 [5, 100, 279]. Ассимилируя углекислоту и выделяя кислород при фотосинтезе, микроводоросли являются незаменимыми компонентами искусственных замкнутых экосистем, включающих человека [31, 37].

Одним из наиболее эффективных методов исследования роста и биосинтеза культур микроводорослей является математическое моделирование. Метаболизм живой клетки представляет собой сложную систему с многочисленными кинетическими и регуляторными связями [80]. На сегодняшний день для некоторых участков цепи метаболизма гетеротрофов разработаны системы дифференциальных уравнений, которые численно решены для заданных условий [81, 85]. 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 по сравнению с имеющейся экспериментальной информацией [4, 134]. Особенно наглядно это проявляется в альгологической практике. Например, при определении концентрации клеток или содержания пигментов количество экспериментальных точек часто не превышает 5 – 10, в то время как самые простейшие модели роста накопительной культуры микроводорослей [93, 115] содержат сопоставимое число коэффициентов. Кроме того, при переходе с клеточного на популяционный уровень описания процессов роста возникает необходимость введения новых обобщённых параметров, которые с требуемой точностью характеризуют исследуемый процесс. Для уменьшения количества неизвестных можно редуцировать систему нелинейных дифференциальных уравнений, используя балансовые представления об энерго- и массообмене гидробионтов [48, 50] и общепринятые аксиомы биологии [21]. Одним из главных принципов, на котором базируются теоретические основы роста микроводорослей, является положение о том, что синтез органического вещества происходит за счёт биохимических реакций с участием ферментов, каждый из которых контролируется отдельным геном [21]. Другой основной принцип, широко используемый в биофизике, принцип простоты. Применительно к ферментативной кинетике этот принцип формулируется как определяющее звено в цепи ферментативных реакций [101]. По отношению к субстратзависимому росту организмов принцип простоты эквивалентен принципу лимитирующих факторов (принцип Либиха) [221]. В микробиологии Моно [233] ввел понятие "узкого места" метаболизма, что позволяет выделить главный фактор, определяющий рост микроводорослей в целом. Вместе с дополнительным принципом смены лимитирующих факторов [152, 221], принцип "узкого места" даёт возможность не только формально описать рост микроводорослей (в тех или иных внешних условиях среды), но и позволяет использовать редукцию системы уравнений, т. е. сделать это с помощью минимального числа относительно простых уравнений. В дальнейшем были

разработаны представления о метаболонах – функциональных образованиях, в которых осуществляется целый комплекс ферментативных реакций [64], а также структурной организации «узкого места» метаболизма [114]. Здесь на основе вероятностного подхода получены зависимости скорости синтеза лимитирующей составляющей биомассы от величины потока элементов питания, поступающего в клетку из внешней среды. Основные успехи в области изучения закономерностей роста микроводорослей достигнуты при работе с непрерывными культурами [107], 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 фотобиосинтезе микроводорослей, моделирование роста культуры 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. Гиперболическая зависимость часто подтверждается экспериментально при исследовании ассимиляции биогенных элементов среды фитопланктоном [84]. 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 при анализе мгновенных кривых фотосинтеза, которые во многих случаях ближе к ломаной [152], 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 [189, 238]. Скорости синтеза того или иного компонента задаются согласно классическим подходам, основываясь на формализме ферментативной кинетики. 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 встречается.

Таким образом, на сегодняшний день не существует общепризнанного универсального подхода, который бы позволил объяснить рост и биосинтез культур 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.

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 факторы, 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.

Теоретическая и 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.

Методология и методы исследования.

В работе применяются теоретические и экспериментальные методы исследования роста культур микроводорослей. Благодаря предлагаемым принципам моделирования, системы дифференциальных уравнений имеют аналитические решения, причём все коэффициенты несут чёткий биологический смысл. Это в значительной степени упрощает применение предлагаемого подхода при обработке экспериментальных данных с последующим расчётом видоспецифических параметров и составления прогноза роста культуры микроводорослей в заданных условиях. Применяемые унифицированные способы выращивания микроводорослей в условии культуры обеспечивают воспроизводимость результатов и возможность сравнения экспериментальных данных о росте микроводорослей различных систематических групп.

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 микроводорослей 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 анализе литературных данных, постановке цели и задач исследования, в предложении нового универсального подхода в моделировании роста культур микроводорослей, разработке динамических моделей лимитированного роста накопительной и непрерывной культуры микроводорослей, проведении экспериментальных исследований динамики биомассы и её биохимического состава, верификации моделей на собственных и литературных экспериментальных данных, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы.

Степень достоверности и апробация результатов.

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, обсуждения результатов, выводов, списка литературы, включающего 281 наименование, из которых 141 – иностранный источник. Общий объём рукописи составляет 232 страницы. В работе представлено 68 рисунков и 6 таблиц.

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность своему неизменному наставнику Рудольфу Павловичу Тренкеншу за неоценимую помощь в подготовке данной работы.

Автор искренне благодарит научного консультанта академика РАН Виктора Николаевича Егорова за ценные советы в процессе подготовки работы.

Автор благодарит всех сотрудников отдела биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ, кафедры биофизики Биологического факультета МГУ, Института Биофизики СО РАН, Сибирского федерального университета, кафедры "Физика" и Института перспективных исследований Севастопольского государственного университета, которые участвовали в научных семинарах, высказывали замечания и рекомендации по содержанию и оформлению материалов диссертации.

ГЛАВА 1

КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РОСТА КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

(Обзор литературы)

1.1. Кинетические параметры роста культуры микроводорослей

Количественная оценка экспериментальных результатов подразумевает расчёт или определение конкретных параметров роста микроводорослей. К кинетическим параметрам относят продуктивность культуры или скорость роста (валовая, средняя, максимальная), темп деления или удельная скорость роста, максимальная биомасса при накопительном культивировании, удельная скорость поддержания (эндогенного расхода), экономический коэффициент или потребность клеток в субстрате. Среди встречающихся в литературе биохимических параметров отметим концентрацию, содержание, продукцию (скорость синтеза) какого-либо компонента биомассы. К энергетическим параметрам отнесём эффективность преобразования световой энергии клетками (КПД фотобиосинтеза), интегральный коэффициент поглощения энергии и пр. Под фотобиосинтезом будем понимать согласованный синтез всех клеточных компонентов, т. е. биологический синтез живой структуры [10]. В свою очередь КПД фотобиосинтеза – отношение запасённой в биомассе к поглощённой фотосинтетическими пигментами световой энергии. Величина запасённой в биомассе энергии является только частью преобразованной световой энергии. Другая часть теряется в процессах фотосинтеза (фотодыхание, флуоресценция, диссипация и др.), расходуется на синтез экзометаболитов, а также клеточных структур, которые теряются при делении (оболочки, жгутики) и т. д. Отношение величины преобразованной энергии к поглощённой есть максимально возможный КПД фотобиосинтеза. Величина КПД фотобиосинтеза – ключевой энергетический параметр роста культуры микроводорослей, который зависит от спектральных характеристик культуры микроводорослей, а также скорости роста биомассы и её калорийности. Несмотря на то, что исследования зависимости КПД фотобиосинтеза от облучённости начаты ещё во второй половине прошлого века, для плотных культур микроводорослей до сих пор нет чёткого ответа на вопрос, где конкретно теряется большая часть запасённой при фотосинтезе энергии. Согласно [110], КПД достигает 15 % и имеет сложный характер зависимости от поверхностной облучённости культуры.

Основной кинетической характеристикой роста микроводорослей является продуктивность (скорость роста) культуры. Она определяется всеми процессами фотобиосинтеза и зависит от скорости синтеза и распада (эндогенного расхода) биомассы [48,

50]. Известно, что при низких интенсивностях света в клетках явно наблюдается так называемое «темновое» дыхание, сопровождающееся поглощением кислорода и уменьшением биомассы клеток [200, 250]. Выделение кислорода и рост микроводорослей начинается только после увеличения интенсивности света выше некоторой величины (соответствующей компенсационному пункту фотосинтеза), при которой скорости выделения и поглощения кислорода равны. В общем случае, рост и биосинтез компонентов клетки можно считать алгебраической суммой двух процессов: собственно фотосинтеза и дыхания. Расходы на дыхание, связанные с ростом (фотодыхание) пропорциональны «чистому» фотосинтезу, их трудно вычленишь из общего процесса. Обычно при моделировании подразумевается, что «чистый» фотосинтез уже включает этот процесс, что учитывается через КПД фотобиосинтеза.

Синтезированная в процессе роста биомасса (B) микроводорослей может быть представлена как сумма её биохимических составляющих:

$$B = \sum_i B_i \quad (1.1)$$

где B_i – масса i -го компонента.

Биомасса микроводорослей или цианобактерий (от гр. *bios* – жизнь, *massa* – слиток, глыба, кусок) (син. плотность культуры) – количественная характеристика совокупности живых клеток низших фотоавтотрофов в культуре в момент наблюдения [12]. Обычно в альгологической практике биомассу выражают в единицах массы, длины или объёма, отнесённых к объёму или к площади освещаемой поверхности. Например, грамм абсолютно сухой биомассы на литр культуры, число клеток на миллилитр культуры, объём сырой биомассы на миллилитр культуры. Единицы измерения выбирают сообразно цели исследований. Кроме того, на выбор единиц измерения существенное влияние оказывают методы, используемые для определения биомассы. В свою очередь выбор метода для определения биомассы зависит от следующих факторов: 1) свойства биомассы, 2) свойства культуральной жидкости, 3) требуемая точность, 4) требуемая чувствительность, 5) требуемая скорость измерений. В контексте данной работы для краткости вместо термина биомасса микроводорослей или цианобактерий будет употребляться его укороченный вариант биомасса или плотность культуры.

Содержание какого-либо биохимического компонента в биомассе может быть выражено в относительных единицах:

$$\beta = \frac{B_i}{\sum_i B_i} \quad (1.2)$$

Скорость синтеза биомассы (P_0) будет равна сумме скоростей синтеза всех биохимических составляющих (P_0^i):

$$P_0 = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 = \sum_i \frac{dB_i}{dt}. \quad (1.3)$$

Скорость темнового дыхания (P_r), связанного с расходами на поддержание структуры, обычно считают пропорциональным биомассе [35, 93]:

$$P_r = \mu_r \cdot B, \quad (1.4)$$

где μ_r – удельная скорость темнового дыхания (или расхода биомассы на поддержание структуры).

Скорость роста (или наблюдаемая продуктивность P), будет равна разности скоростей «чистого» фотобиосинтеза и потерь на дыхание:

$$P = P_0 - P_r, \quad (1.5)$$

$$P = \frac{dB}{dt} = \left(\frac{dB}{dt} \right)_0 - \mu_r \cdot B.$$

Аналогично, с учётом расхода на дыхание, можно наблюдаемую скорость синтеза любого компонента биомассы (P_i) представить как разность скорости синтеза (P_i^0) и скорости потерь данного компонента при дыхании (P_i^r):

$$P_i = P_i^0 - P_i^r. \quad (1.6)$$

Величина скорости, как характеристика роста, не всегда удобна для сравнительных оценок, т. к. её значение зависит от количества растущей биомассы. Этого недостатка лишена другая характеристика роста – удельная скорость роста (μ). Удельная скорость роста растений по Блэкману [153] представляет собой величину скорости роста, нормированную относительно биомассы. Т. е. удельная скорость роста показывает, сколько единиц биомассы синтезирует каждая единица биомассы в единицу времени:

$$\mu = \frac{dB}{B \cdot dt}, \quad (1.7)$$

$$\mu = \frac{P}{B} = \frac{P_0}{B} - \frac{P_r}{B} = \frac{1}{B} \cdot \sum_i \frac{dB_i}{dt} - \mu_r \cdot B.$$

Для удельной скорости роста можно записать аналогичное (1.5) выражение, отображающее балансовые представления о росте популяции гидробионтов [46, 66]. Обозначим удельную скорость синтеза биомассы через (μ_0):

$$\mu_0 = \frac{1}{B} \cdot \left(\frac{dB}{dt} \right)_0,$$

тогда

$$\mu = \mu_0 - \mu_r. \quad (1.8)$$

Таким образом, к основным кинетическим характеристикам роста культуры микроводорослей следует отнести скорость роста, синтеза, распада биомассы, а также соответствующие удельные скорости. При выращивании микроводорослей в любой системе культивирования, влияние того или иного экологического фактора выражается через изменение данных параметров культуры.

1.2. Рост культур микроводорослей в закрытых и открытых системах

Рост культуры микроводорослей всегда ограничен либо внешними условиями среды, либо индивидуальными особенностями организма, которые определяются генетикой вида [80]. На скорость роста культуры оказывают влияние многие факторы: световые условия, температура, pH среды, концентрация продуктов жизнедеятельности клеток и т. д. [93, 99, 130]. Среди множества факторов среды, лимитирующих рост культуры, в соответствии с конструктивным принципом Либиха [221], можно выделить три основных: 1) свет как энергетический субстрат, 2) поток CO₂ как основной источник углерода при фотосинтезе, 3) концентрация минеральных компонентов питательной среды. Взаимное влияние и смена упомянутых факторов определяет величину продукционных характеристик культуры, а также форму кривой роста в данных условиях. Верно и обратное утверждение – по форме кривой можно судить о факторах, лимитирующих рост, и последовательности их действия.

1.2.1. Способы культивирования микроводорослей

Существует два основных способа культивирования микроводорослей: накопительная (периодическая) и непрерывная (проточная) культура, которые являются крайними случаями всех возможных режимов выращивания микроводорослей. Если динамика роста культуры повторяется после замены части объёма суспензии клеток питательной средой для заданных внешних условий, то такая культура называется периодической [59, 115]. Если в процессе роста культура после достижения максимальной плотности не разбавляется питательной средой, переходя в фазу отмирания, то такая культура называется накопительной. Обычно накопительная культура проходит несколько фаз роста, которые обусловлены сменой лимитирующих факторов. Следует отметить, что в процессе роста культуры происходит исчерпание биогенных элементов питательной среды, поэтому термин «накопительная культура» подразумевает отсутствие протока (добавления) лимитирующего биогенного элемента, т. е. является термодинамически закрытой [7, 50]. Например, при культивировании микроводорослей в качестве источника углерода используют CO₂, который непрерывно подаётся в культиватор в виде газовой смеси. В таких условиях, исходя из определения,

культура по углероду является не накопительной, а непропорционально проточной (термодинамически открытой системой) [59]. Аналогичная ситуация наблюдается для культур азотфиксирующих фототрофов, когда в качестве источника азота используется атмосферный азот. Как правило, динамика плотности накопительной культуры имеет S-образную форму. Именно форма накопительной кривой является характеристикой заданных условий культивирования [93]. Следует отметить, что при культивировании микроводорослей в качестве энергетического субстрата особую роль играет свет, который подаётся в культуру непрерывно, поэтому в этом случае культура фототрофов также является непропорционально проточной. Для фотоавтотрофов в отличие от любого биогенного элемента по свету невозможно организовать накопительную культуру.

Если в культуру непрерывно подается питательная среда, а также отводится суспензия клеток, причем объём культуры сохраняется постоянным, то такая культура называется непрерывной (проточной) [116]. В том случае, когда замена части объёма суспензии клеток питательной средой производится через некоторые промежутки времени, то такая культура называется квазинепрерывной (полупроточной, полунепрерывной). Периодическая культура является частным случаем квазинепрерывной, т. е. периодическая культура – это культура между двумя последующими разбавлениями. Если интервалы между разбавлениями и объём заменяемой суспензии малы (стремятся к нулю), то квазинепрерывная культура стремится к непрерывной.

1.2.2. Фазы роста накопительной культуры микроводорослей

Особенно наглядно лимитирование роста культуры проявляется при накопительном способе культивирования. В целом, динамика роста накопительной культуры микроводорослей аналогична накопительным кривым любых других микробиологических культур [86, 233]. Графически динамика плотности культуры при накопительном культивировании изображается S-образной кривой. Принято считать, что накопительную кривую можно разделить на следующие фазы роста: лаг-фаза (индукционный период, фаза задержки роста), экспоненциальная (логарифмическая или ускорения роста), линейная фазы, фаза замедления роста (отрицательного ускорения роста), стационарная фаза и фаза отмирания [93, 115]. Для установления границ различных фаз роста не существует общепризнанных формальных приёмов, поэтому вся ответственность данной процедуры принадлежит исследователю. Осложняет ситуацию и тот факт, что на накопительной кривой, в связи с нерегулярностью потока лимитирующего субстрата, не всегда возможно точно указать область смены лимитирующего фактора и, как следствие, установить чёткие границы фаз роста.

Количество фаз накопительной кривой может варьировать. При неизменных внешних условиях наличие тех или иных фаз роста определяется начальной плотностью и предысторией культуры. Если величина засева (инокулята) мала, то кривая роста будет иметь S-образную форму, у накопительной кривой будет присутствовать лаг-фаза, и культура пройдёт все фазы роста. Если величина засева не мала, то лаг-фаза, лог-фаза или линейная фаза могут быть не продолжительными или вовсе отсутствовать, что будет определяться текущим лимитирующим фактором.

Лаг-фаза – это переходный период, в течение которого удельная скорость роста культуры достигает своего максимального значения для заданных внешних условий [35, 115]. В общем случае лаг-фазу можно разделить на два периода: 1. Период отрицательной удельной скорости роста культуры. В некоторых случаях лаг-период связан с тем, что часть клеток микроводорослей, попадая в новые условия, гибнет, в то время как другая часть – не теряет способность к росту [136]. В результате величина средней наблюдаемой скорости роста клеток может быть близка к нулю или иметь отрицательные значения; 2. Период задержки роста – характеризуется нулевыми или положительными значениями скоростей роста, т. е. наблюдается преобладание процессов анаболизма над процессами катаболизма. В конце данного периода удельная скорость роста культуры достигает своего максимального значения. Длительность лаг-фазы определяется множеством причин, связанных с биологическими особенностями клеток, способностью их акклиматизации и адаптации к новым условиям. Обычно к причинам, вызывающим лаг-фазу, относят следующие: 1. Изменение окружающих физических условий. Например, изменение pH среды, температуры среды или количества и качества энергетического и пластического субстрата. Задержку роста может вызвать как резкое изменение интенсивности света, его спектрального состава, так и изменение в среде концентрации биогенных элементов; 2. Изменение в питании, например, источников биогенных элементов; 3. Присутствие ингибиторов роста. В качестве ингибитора роста могут выступать и высокие концентрации биогенных элементов, и высокие интенсивности света, как энергетического субстрата (фотоингибирование); 4. Предыстория культуры, т. е. её состояние и способность к фенотипическим изменениям при переходе к новым условиям культивирования. Важным является внутриклеточный ресурс, за счёт которого происходят фенотипические изменения; 4. Прорастание спор, выход клеток из состояния анабиоза и пр.

Рост культуры микроводорослей в лаг-фазе неустойчив. Случайное изменения какого-либо параметра внешней среды может привести к гибели клеток или к переходу в состояние анабиоза. На данной фазе происходит биохимическая адаптация культуры микроводорослей к постоянному освещению после длительного содержания клеток в темноте. Начало лаг-фазы характеризуется отсутствием резервных форм биомассы, при этом клеточное вещество

представлено только структурными компонентами клеток. Соотношение резервных и структурных форм биомассы изменяется вплоть до перехода культуры к экспоненциальному росту, характеризующемуся их постоянством [119].

По завершении переходного периода лаг-фазы и достижении максимального значения удельной скорости роста культура переходит в стадию так называемого неограниченного (нелимитируемого) роста клеток. Устоявшийся в литературе термин «нелимитируемый рост» понимается как независимость скорости роста от концентрации биогенных элементов в питательной среде [35, 107, 227]. В лог-фазе единственным фактором, ограничивающим рост, являются световые условия, поэтому лог-фаза для конкретных световых условий характеризуется постоянством удельной скорости роста [115]. Кроме того, для каждой новой световой культуры в экспоненциальной фазе роста будет характеризоваться своей величиной максимальной удельной скорости роста. Таким образом, удельная скорость роста является функцией действующей интенсивности света. При некоторой предельной облучённости будет наблюдаться максимально возможная удельная скорость роста культуры, которая предопределяется внутренними видоспецифическими особенностями клеток. Кроме того, интенсивность света определяет биохимический состав биомассы микроводорослей [117].

По завершении лог-фазы удельная скорость роста уменьшается в связи с ограничением роста культуры каким-либо лимитирующим субстратом. В качестве лимитирующего субстрата может выступать свет, обеспеченность CO_2 или минеральные компоненты питательной среды. После окончания экспоненциального роста происходит смена лимитирующего фактора. В большинстве случаев для культур низших фотоавтотрофов на накопительной кривой наблюдается фаза линейного роста, которая характеризуется постоянством продуктивности культуры [2, 27, 40, 46]. Например, у микроводорослей в качестве лимитирующего рост субстрата может выступать поток CO_2 . Углекислый газ поглощается при фотосинтезе и выделяется при темновом дыхании, поэтому может повторно использоваться в цикле Кальвина, т. к. время возврата углерода в биосинтетические процессы минимально [65]. На сегодняшний день механизм явления линейного роста неизвестен, хотя этот участок имеет относительно большую протяженность во времени, а плотность культуры иногда увеличивается, в десятки раз. В качестве примеров можно привести накопительные кривые роста зелёной галофильной микроводоросли *Dunaliella salina* [154], морской диатомеи *Phaeodactylum tricornutum* (см. раздел 3.3), красной одноклеточной *Porphyridium purpureum* [33] и многих других видов [235]. Вероятно, линейный участок роста является результирующей относительно большого количества воздействующих факторов, которые приводят к кажущемуся постоянству скорости роста.

Окончание линейной фазы свидетельствует о смене лимитирующего фактора – культура переходит в фазу замедления роста. Здесь ограничивать рост могут и свет, и минеральные компоненты питательной среды.

Стационарная фаза характеризуется тем, что процессы анаболизма компенсируются процессами катаболизма, т. е. продуктивность культуры снижается до нуля. При этом плотность культуры достигает максимального значения, величина которого зависит от световых условий, первоначальной концентрации биогенных элементов и других физико-химических условий. Следует отметить, что стационарность по биомассе может не совпадать со стационарностью по концентрации клеток и их биохимическому составу. Кроме того, в стационарной фазе роста возможны периодические колебания значения биомассы (близкой к максимальной), которые определяются временем вторичного использования лимитирующего субстрата. Длительность стационарной фазы различна и может достигать нескольких суток.

В фазе отмирания наблюдается превалирование процессов дыхания над процессами синтеза. Скорости роста будут отрицательные. В фазе отмирания происходят глубокие физиологические изменения клеток, вплоть до их гибели.

1.2.3. Рост культуры микроводорослей в открытых системах

Разбавление культуры микроводорослей питательной средой представляет собой основу управления ростом [59, 116]. Выбирая относительный объём разбавления, можно уменьшать плотность культуры до необходимой величины, а, изменяя промежуток времени между разбавлениями, можно повышать плотность до необходимой за счёт роста культуры. Очевидно, что регулирование имеет пределы, определяемые внешними условиями и предельными видоспецифическими характеристиками роста микроводорослей.

Управление культурой может осуществляться различными способами: либо скорость протока регулируется в зависимости от скорости роста культуры (плотностат), либо удельная скорость протока задается постоянной (хемостат). В любом случае, удельная скорость протока определяется двумя характеристиками: коэффициентом разбавления и периодом времени между разбавлениями. При этом возникает вопрос о выборе конкретных значений величины удельной скорости протока, которые должны быть в пределах значений удельной скорости роста микроводорослей. Наилучший способ оценки характеристик роста – снятие накопительной кривой роста в конкретном культиваторе, что позволит выбрать пределы, в которых возможно задавать величину плотности и удельной скорости протока.

Рассмотрим рост популяции в открытой системе на примере непрерывной культуры микроводорослей. Непрерывный рост микроводорослей обеспечивается подачей питательной среды в систему культивирования с некоторой удельной скоростью ω при одновременном

отборе равноценного объёма культуры с такой же скоростью. Для условий хемостата общепринятое балансовое уравнение для динамики плотности непрерывной проточной культуры в дифференциальной форме имеет вид [13, 86, 99]:

$$\frac{dB}{dt} = \mu \cdot B - \omega \cdot B = (\mu - \omega) \cdot B. \quad (1.9)$$

Как видно из (1.9), динамика биомассы определяется удельной скоростью роста μ , удельной скорости протока ω и плотностью культуры B . При логарифмическом росте удельная скорость постоянна и равна μ_m [93]. Следовательно, дифференциальное уравнение для динамики плотности культуры можно проинтегрировать [116]:

$$\begin{aligned} \frac{dB}{dt} &= (\mu_m - \omega) \cdot B, \quad \frac{dB}{B} = (\mu_m - \omega) \cdot dt, \\ \int_{B_0}^B \frac{dB}{B} &= (\mu_m - \omega) \cdot \int_{t_0}^t dt, \\ \ln \frac{B}{B_0} &= (\mu_m - \omega) \cdot (t - t_0), \\ B &= B_0 e^{(\mu_m - \omega)(t - t_0)}, \end{aligned} \quad (1.10)$$

где t_0 и B_0 – время и плотность культуры в момент включения протока соответственно.

Максимальная удельная скорость роста является предельной для удельной скорости протока, т. е. область работы хемостата ограничена:

$$\omega \leq \mu_m.$$

Это видно из выражения (1.10): при $\omega > \mu_m$, показатель экспоненты будет отрицательным, и плотность культуры будет со временем уменьшаться до нуля, произойдёт вымывание культуры. Причем скорость вымывания культуры будет тем выше, чем выше скорость протока.

Допустим, удельная скорость протока задаётся в пределах удельных скоростей для линейного роста, тогда в дифференциальном уравнении динамики плотности удельную скорость роста можно выразить через плотность культуры, что приведёт к другому уравнению динамики плотности [115]:

$$\begin{aligned} \mu &= \frac{P_m}{B}, \\ \frac{dB}{dt} &= (\mu - \omega) \cdot B, \\ \frac{dB}{dt} &= \left(\frac{P_m}{B} - \omega \right) \cdot B = P_m - \omega \cdot B = \mu_m \cdot B_l - \omega \cdot B. \end{aligned}$$

Разделив переменные и задавая начальные условия, можно найти интегральное выражение для динамики плотности культуры в хемостате (в рамках линейного роста) [116]:

$$B = \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0 \right) e^{-\omega(t-t_0)}, \quad (1.11)$$

где B_0 – плотность культуры в момент времени включения протока t_0 .

Важнейшим свойством полученной функции является то, что она имеет предел при $t \rightarrow \infty$. На практике это означает, что плотность культуры со временем не будет изменяться и иметь стационарное значение:

$$B_{st} = \frac{P_m}{\omega}. \quad (1.12)$$

Из уравнения (1.12) следует, что конечное стационарное состояние не зависит от предыстории культуры (t_0 , B_0), и определяется только максимальной продуктивностью P_m и удельной скоростью протока среды ω .

Выражения (1.10) и (1.11) позволяют описать динамику плотности культуры микроводорослей в открытой системе культивирования, при этом в них напрямую не отображено влияние лимитирующего биогена на скорость роста культуры. Современное моделирование субстратзависимого роста культур микроводорослей в открытых системах основано на балансовых уравнениях, учитывающих приток, поглощение, затраты на рост, выведение биогенных элементов, а также их вынос из системы культивирования с протоком [1, 36, 43, 93, 107]. Интенсивность поглощения задаётся на основе кинетики Михаэлиса-Ментен [230], зависимость удельной скорости роста микроводорослей от концентрации внутриклеточного субстрата описывается уравнением Друпа [173]. В процессе роста клетка непрерывно выделяет метаболиты в среду [84]. Распад биомассы за счёт расходов на поддержание структуры приводит к снижению скорости роста и увеличению потребности. При этом распавшаяся биомасса, посредством её минерализации, может служить источником биогенных элементов [65]. Минеральные элементы могут либо повторно использоваться в биосинтезе, либо безвозвратно теряться, переходя в нерастворимые соединения, которые не могут быть задействованы биосинтетическим аппаратом клетки. Также возможен вариант, когда только часть минерализованного субстрата повторно вовлекается в биосинтез. Обозначив через α – безразмерный коэффициент возврата субстрата из распавшейся биомассы [65], запишем балансовую модель минерального обмена [43] с учётом наличия протока:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = (\mu_0 - \mu_r) \cdot B - \omega \cdot B, \\ \frac{dS}{dt} = \omega \cdot (S_0 - S) - V_0^{\max} \frac{S}{K + S} + \mu_r \cdot \alpha \cdot S_{cell}, \\ \frac{dS_{cell}}{dt} = V_0^{\max} \frac{S}{K + S} - (\mu_0 + \mu_r + \omega) \cdot S_{cell}, \end{cases} \quad (1.13)$$

где $V_0^{\max}$ – коэффициент максимальной скорости ассимиляции субстрата; μ_r – удельная скорость расхода биомассы на поддержание структуры, μ_0 – удельная скорость синтеза биомассы, зависящая от концентрации внутриклеточного лимитирующего субстрата:

$$\mu_0 = \mu_0^{\max} \left(1 - \frac{S_{cell}^{\min}}{S_{cell}} \right), \quad (1.14)$$

Система (1.13) с учётом (1.14) описывает изменение биомассы микроводорослей B , концентрации субстрата в среде S и внутриклеточного субстрата S_{cell} . При отсутствии протока, т. е. для условий закрытой по лимитирующему субстрату системы ($\omega = 0$), модель упрощается:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = (\mu_0 - \mu_r) \cdot B, \\ \frac{dS}{dt} = -V_0^{\max} \frac{S}{K + S} + \mu_r \cdot \alpha \cdot S_{cell}, \\ \frac{dS_{cell}}{dt} = V_0^{\max} \frac{S}{K + S} - (\mu_0 + \mu_r) \cdot S_{cell}, \end{cases} \quad (1.15)$$

При моделировании субстратзависимого роста культуры микроводорослей в открытой системе необходимо учитывать постоянно изменяющиеся световые условия, в которых находятся клетки. Даже для небольших плотностей, когда клетки не затеняют друг друга, а количество биогенных элементов в среде позволяет обеспечить нелимитированный рост, происходит адаптация культуры микроводорослей к заданному освещению, которая выражается в изменении биохимического состава биомассы. Соответственно, коэффициенты системы (1.15) (максимальной скорости ассимиляции, синтеза, распада биомассы) нельзя считать постоянными. Выходом из сложившейся ситуации является использование проточных систем культивирования, например хемостата, когда появляется возможность стабилизации всех внешних и внутренних факторов. При этом системы дифференциальных уравнений сводятся к алгебраическим: при стационарном динамическом равновесии, когда удельная скорость роста равна удельной скорости протока питательной среды, не будут изменяться биохимический состав клеток микроводорослей и размерная структура популяции [1, 36, 92]. Однако, даже в таком случае, полученные частные решения верны для конкретного стационарного состояния, что приводит к необходимости введение дополнительных параметров, учитывающих изменение биохимического состава биомассы, активности ферментов и пр.

1.3. Поглощение света микроводорослями

Световые условия, в которых находятся микроводоросли, влияют на все процессы фотобиосинтеза, так как свет является единственным источником энергии для роста и

биосинтеза фотоавтотрофов. В процессе фотосинтеза поглощённая энергия ФАР запасается клетками микроводорослей в виде АТФ и НАДФ·Н и в дальнейшем используется при синтезе первичных углеводов в цикле Кальвина и последующих реакциях биосинтеза. Современные представления о фотосинтезе в самой простейшей интерпретации сводятся к общепринятой Z-схеме [83, 100, 137]. Квант света, поглощённый реакционным центром ФС1 хлорофиллом *a* P700 передается по цепи переносчиков на ФД, который восстанавливает НАДФ⁺ до НАДФ·Н при участии фермента ферредоксин-НАДФ редуктазы. Восстановление реакционного центра ФС1 происходит благодаря работе ФС2. Реакционный центр ФС2 хлорофилл *a* P680 поглощает квант света и передает энергию возбуждения по цепи переносчиков электрона на пластохинон, который помимо переноса электронов осуществляет трансмембранный транспорт протонов из стромы в люмен. Электрон, в конечном итоге, через цитохромный комплекс и пластоцианин восстанавливает P700⁺. Благодаря протонированию люмена, создаётся протон-движущая сила, которая используется ферментом АТФ-синтетазой для фосфорилирования АДФ [5]. P680⁺ восстанавливается благодаря MnZ кластеру, на котором происходит фотолиз воды с образованием кислорода. Помимо описанного нециклического транспорта возможен циклический транспорт электрона, при котором не происходит образования НАДФ·Н, образуется только АТФ. Вопрос о механизмах переключения нециклического транспорта электрона на циклический на сегодняшний день активно разрабатывается [184]. Однако бесспорным является тот факт, что циклический транспорт обеспечивает "добавочное" количество АТФ, которая необходима для нормального протекания цикла Кальвина.

Приведённые последовательности световых реакций фотосинтеза сильно упрощены и могут быть представлены в виде схемы (см. рис. 1.1). Однако такая простая схема позволяет получить общие представления о механизмах работы первичных процессов, направленных на запасание клетками микроводорослей световой энергии.

1.3.1. Модели светозависимого роста культуры микроводорослей

Основные успехи при исследовании как световых, так и темновых процессов фотосинтеза достигнуты на культурах микроводорослей ещё в начале 20 века. Скорость фотосинтеза возможно регистрировать различными методами. К наиболее простым следует отнести измерения количества выделенного кислорода, либо определение поглощённого углекислого газа за определённый промежуток времени. Зависимость скорости фотосинтеза *P* от облучённости *I* называется фотосинтетической кривой. Форма кривой фотосинтеза отражает основные биофизические, биохимические и метаболические процессы, которые регулируют фотосинтез [183]. Моделированию фотосинтетической кривой посвящено огромное количество

работ. Так первой моделью, которая описывает линейное увеличение скорости фотосинтеза с ростом облучённости, является ломаная Блэкмана [152].

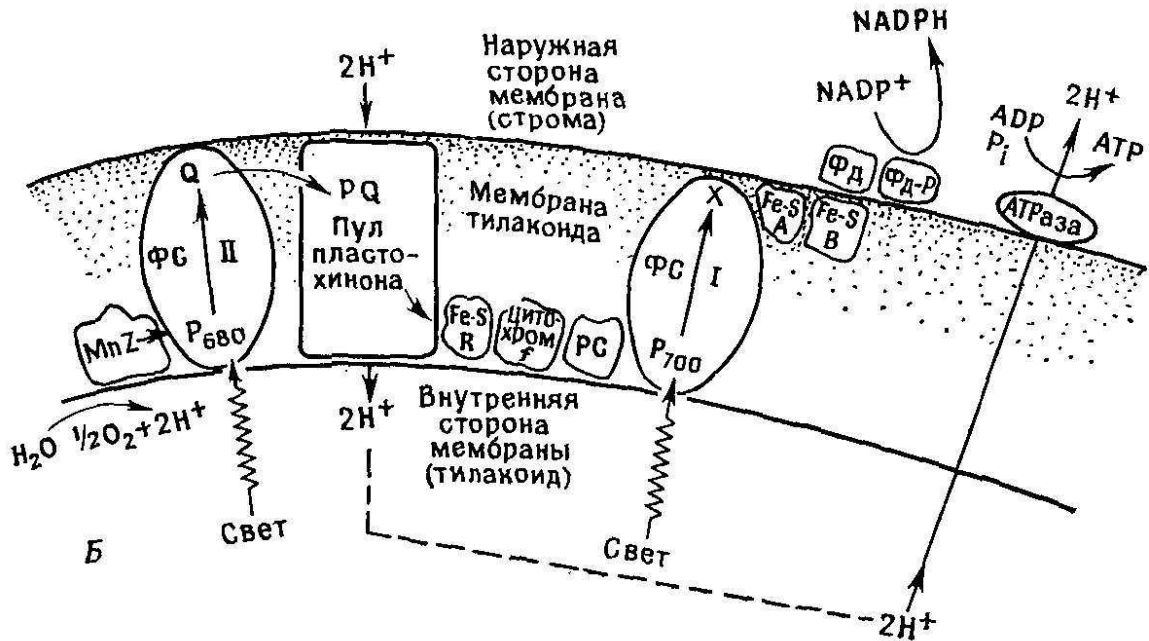


Рисунок 1.1 Схема световых реакций фотосинтеза [137]

При достижении некоторого насыщающего значения I_{sat} , скорость фотосинтеза достигает максимальной величины:

$$\begin{cases} P = P_m \frac{I}{I_{sat}}, I \leq I_{sat} \\ P = P_m, I \geq I_{sat} \end{cases} \quad (1.16)$$

Отношение констант уравнения (1.16) есть угол наклона фотосинтетической кривой на участке лимитирования, который в литературе обозначается как α . Физический смысл α – квантовая эффективность фотосинтеза при облучённостях меньших насыщающей величины. Модель Блэкмана в некоторых случаях описывает экспериментальные данные, однако, являясь высшей степенью идеализации, в целом не соответствует накопленному фактическому материалу [111, 152]. Поэтому в дальнейшем была предложена группа моделей [146], построенных по аналогии с ферментативной кинетикой Михаэлис-Ментен [230], которые отображают гиперболическую зависимость фотосинтетической кривой:

$$P = P_m \frac{I}{K + I}, \quad (1.17)$$

где K – константа полунасыщения, при которой скорость фотосинтеза равна половине максимального значения.

В связи с тем, что уравнение (1.17) во многих случаях также не описывает экспериментальные данные [143, 164, 266], различными авторами предложены поправки, которые учитывают уменьшение интенсивности света с ростом плотности культуры [264], снижение скорости фотосинтеза за счёт потерь на дыхание [9, 147] или фотоингибирования [274].

Считая, что поток квантов ФАР, приходящих на реакционный центр фотосинтеза, является неравномерным и подчиняется распределению Пуассона, Горским [199] была получена экспоненциальная зависимость скорости фотосинтеза от облучённости:

$$P = P_m (1 - e^{-b \cdot I}), \quad (1.18)$$

где b – константа, учитывающая среднее число фотонов, поглощённых одним реакционным центром за время его оборота.

Широкое распространение получило эмпирическое уравнение Стила [262], которое позднее было обосновано в работе [170]:

$$P = P_m \frac{I}{I_{sat}} e^{1 - \frac{I}{I_{sat}}}. \quad (1.19)$$

В работе [209] проведено сравнение наиболее часто встречающихся моделей, которые описывают фотосинтетическую кривую. Авторами показано, что наилучшее соответствие теоретических и экспериментальных результатов наблюдается при использовании полуэмпирической зависимости скорости фотосинтеза от облучённости в форме гиперболического тангенса:

$$P = P_m \tanh\left(\frac{I}{I_{sat}}\right). \quad (1.20)$$

Позднее в [141] резюмировано, что параметр I_{sat} , который входит практически в любую модель, не зависит от биомассы микроводорослей, является основной количественной характеристикой фотоакклиматизации водорослей. Данная величина также используется при расчётах первичной продукции, моделировании эвтрофикации водоёмов. К текущему моменту, благодаря появлению новых знаний о протекании первичных световых реакций и образованию углеводов в цикле Кальвина, разрабатываются модели, показывающие, что величина I_{sat} является некоторым обобщённым коэффициентом, который определяется вероятностями протекания продуктивных фотохимических реакций, диссипацией световой энергии в виде тепла, флуоресценции и др [279].

Развитие вероятностного подхода при описании фотосинтетических кривых представлено в работах Р. П. Тренкеншу [114]. Автором рассмотрены наиболее простые представления об организации узкого места метаболизма и влиянии этой организации на кинетику реакций с

учётом временной организации потока субстрата. Задачи биокинетики сформулированы в терминах теории массового обслуживания, в которой достаточно хорошо развит математический аппарат, описывающий взаимодействие потоков с системами, аналогичными таким, как узкое место метаболизма. Введены количественные характеристики организации узкого места: количество реакционных центров, время их оборота, ёмкость субстратного депо. Показано, что структурная организация узкого места так же, как и временная, существенно влияет на характер фотосинтетических кривых. При уницентральной организации, когда только один переносчик в ЭТЦ ограничивает общую скорость фотосинтеза, время жизни электрона, ожидающего освобождения последующего переносчика, большое и эффективность переноса возбуждения по пигментной матрице близка к 100 %. Уравнение зависимости скорости фотосинтеза от интенсивности падающего света может быть представлено в виде:

$$P = P_m \frac{I^{Q+2} - I}{I^{Q+2} - 1}, \quad (1.21)$$

где Q – ёмкость субстратного депо.

Благодаря предложенному подходу [114] появилась возможность по характеру кинетических кривых оценивать организацию области реакции (узкого моста) по экспериментальным данным. Отклонение экспериментальных кривых от гиперболы Михаэлиса-Ментен будет указывать на то, что у данного фермента области реакции каталитических центров перекрываются или есть субстратное депо. По экспериментальным кинетическим кривым можно также сделать оценку мультицентральнойности и ёмкости депо. Точность этой оценки определяется точностью экспериментов.

В заключение отметим, что огромное количество подходов (моделей) к описанию фотосинтетических кривых свидетельствует об отсутствии единой общепринятой теории роста микроводорослей.

1.4. Поглощение клетками микроводорослей основных биогенных элементов

Все биогенные элементы, необходимые для роста культуры микроводорослей, можно разделить на макро- и микроэлементы. К макроэлементам следует отнести углерод (C), азот (N), фосфор (P). Для фитопланктона нормальное соотношение данных элементов в структуре клеток является 1 P : 7 N : 40 C [44]. Источниками углерода, который составляет около 50 % сухого вещества (СВ) клеток микроводорослей [57], является углекислый газ, который, взаимодействуя с водой, в зависимости от величины рН, может находиться в форме CO_2 , гидрокарбонатов HCO_3^- или карбонат ионов CO_3^{2-} . В некоторых случаях микроводоросли способны к миксотрофному или даже гетеротрофному росту, поглощая органический углерод

[32, 108]. Однако для ассимиляции органических источников углерода на клеточной мембране должны сформироваться транспортные симпорт-системы, что требует определённого времени, которое может достигать нескольких суток [122].

Необходимость обеспечения клеток азотом связана с жизненно важной ролью белков, ферментов, нуклеиновых кислот, фотосинтетических пигментов и других N-содержащих компонентов. Источниками азота для микроводорослей могут быть нитраты (NO_3^-), нитриты (NO_2^-), соли аммония (NH_4^+), мочевины, а также многие другие органические соединения – амиды, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, пептоны, пурины, пиримидины и продукты их обмена [39]. Многие виды цианопрокариот способны фиксировать молекулярный азот [51].

Фосфор (P) входит в состав мембран, нуклеиновых кислот, коферментов, АТФ и др. Он играет определяющую роль в обмене веществ, будучи одним из компонентов нуклеиновых кислот. Кроме того, сахара и жирные кислоты не могут быть использованы клетками в качестве источников энергии, если они не будут для начала фосфорилированы. Фосфор необходим для образования АТФ в процессе световых реакций фотосинтеза. Микроводоросли потребляют P в форме H_2PO_4^- и HPO_4^{2-} .

Кроме основных биогенных элементов для роста микроводорослей в макроколичествах в среде должны присутствовать Fe, S, Ca, Mg, K, Na, Cl, для диатомовых водорослей – Si. Железо (Fe) является важным питательным веществом для существования любых организмов. У микроводорослей железо является компонентом многих переносчиков в ЭТЦ. Дефицит железа может привести к снижению фотосинтетической активности и, как следствие, скорости роста культуры [275]. Железо потребляется микроводорослями в различных формах (сульфат, хлорид, лимонно-кислый) обычно в комплексе с трилоном Б. Сера необходима для образования некоторых аминокислот, элементов ЭТЦ световых реакций фотосинтеза, сульфолипидов. Также она необходима для синтеза вторичных и последующих структур белка, образуя дисульфидные "мостики" между аминокислотными цепями [21]. Ионы Na^+ , K^+ участвуют в поддержании гомеостаза внутриклеточной среды, благодаря работе натрий-калиевого насоса, тургорной и буферной систем, трансмембранному симпорту или антипорту транспорту биогенных элементов. Магний входит в состав хлорофиллов, участвует в агрегации рибосом в функциональные единицы, реакциях переноса макроэргических фосфатов, является аллостерическим эффектором ряда ферментов [51].

Содержание биогенов в клетках микроводорослей может сильно варьировать. Например, скорость поглощения того или иного элемента определяется не только его внешней концентрацией, но и активностью, количеством транспортных систем, которые участвуют в ассимиляции. Причём перенос биогенных элементов через мембрану обычно требует затрат энергии в виде АТФ [46, 250]. Величина внешней концентрации, строго говоря, не может

рассматриваться как основной параметр, от которого зависит поглощение элемента. При низких температурах среды даже в условиях питательно насыщенного раствора, скорость поглощения элементов микроводорослями будет мала либо равна нулю вследствие низкой активности транспортных систем. Кроме того, их активность зависит от pH среды, солёности. Исключением могут являться незаряженные молекулы, например, углекислый газ, который может диффундировать через мембрану клетки без затрат энергии.

В литературе встречаются несколько параметров, которые отображают потребление биогенных элементов культурами микроводорослей. Это внутриклеточное содержание элемента или квота Q , а также экономический коэффициент или потребность клеток микроводорослей в том или ином субстрате Y_S . Понятие квоты, впервые предложенное Друпом [173], позволяет охарактеризовать границу обеспеченности субстратом, ниже которой клетки неспособны к росту. Квота для конкретных условий стационарного динамического равновесия есть статическая величина. Квота характеризует текущее состояние культуры клеток, но не позволяет объяснить причины перехода культуры в данное состояние. Обобщающим понятием квоты является истинная потребность Y_S^0 , которая рассматривает движущие силы, приводящие культуру в то или иное состояние. По определению истинная потребность является отношением скоростей потребления субстрата из среды и синтеза органического вещества:

$$Y_S^0 = -\frac{dS}{dB_S} = -\frac{dS}{dt} \bigg/ \frac{dB_S}{dt}, \quad (1.22)$$

где dS – элементарно малое количество субстрата, которое необходимо для синтеза биомассы dB_S .

Изменение скоростей биосинтеза и ассимиляции субстрата из среды есть движущие силы, поэтому истинная потребность является величиной динамической, посредством которой можно объяснить переходные процессы из одного стационарного состояния культуры в другое.

Выше было отмечено, что в литературе используется понятие экономического коэффициента или обратное ему величина потребности клеток в субстрате:

$$Y_S^0 = -\frac{dS}{dB} = -\frac{dS}{dt} \bigg/ \frac{dB}{dt}. \quad (1.23)$$

По сути, эта величина является наблюдаемой потребностью, поскольку потреблённый субстрат отнесён к приросту биомассы. В реальности из-за потерь биомассы (на поддержание структуры, в результате темнового дыхания и пр.) величина прироста будет меньше, чем количество синтезированной биомассы. Следовательно, наблюдаемая потребность будет всегда больше истинной потребности. Теоретически значения истинной и наблюдаемой потребности могут быть равны. Равенство будет только в том случае, когда эндогенный расход биомассы стремиться к нулю или происходит полное возвращение субстрата в процессы биосинтеза.

Жизненные циклы клеток микроводорослей обычно сопровождаются потерей некоторых клеточных структур. Например, потеря жгутиков, клеточных оболочек при делении, гибель клеток и т. д. [22]. Важно отметить, что в таком случае величина "потерянного" субстрата является физиологической необходимостью и учтена в определении истинной потребности. Когда рассматриваемый субстрат не расходуется в процессе темнового дыхания, тогда истинная и наблюдаемая потребности будут равны. Если субстрат переходит в недоступную форму для повторного использования, то в таком случае он выносится за пределы клетки как экзометаболит во внешнюю среду. Также в результате гибели клеток в среду попадают органические соединения, которые могут служить источником питания для бактерий. В нестерильных условиях культивирование водорослей всегда сопровождается присутствием бактерий. Хотя биомасса бактерий в активно растущей культуре водорослей много меньше биомассы водорослей [23], скорости преобразования субстрата у бактерий могут быть много больше, чем у водорослей [86]. За счёт метаболизма бактерий происходит минерализация органических соединений, т. е. образовавшиеся вещества в неорганической форме снова становятся доступны для водорослей. В данной ситуации, минеральные элементы могут либо повторно использоваться в биосинтезе, либо безвозвратно теряться при образовании неорганических соединений, которые не могут быть задействованы биосинтетическим аппаратом клетки. А также возможен случай неполного возврата, когда только часть минерализованного субстрата повторно вовлекается в биосинтез.

1.4.1. Особенности поглощения углерода клетками микроводорослей

Клетки микроводорослей и цианобактерий способны поглощать неорганический углерод в форме гидрокарбонат-иона и углекислого газа. Кроме того, экспериментально показано, что цианобактерии в качестве источника углерода способны использовать карбонат-ионы [105]. Соотношение разных форм неорганического углерода определяется величиной pH культуральной среды. Ключевой фермент, обеспечивающий связывание неорганического углерода с последующим образованием фосфолирированных сахаров, является рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза (РБФК). РБФК локализована в строме хлоропластов у микроводорослей или в карбоксисомах цианобактерий. Количество данного белка может составлять до половины всех белков клетки [96]. В планетарном масштабе РБФК обеспечивает практически всю первичную продукцию [223, 253]. РБФК катализирует присоединение CO_2 к первичному акцептору углерода в цикле Кальвина рибулозо-1,5-бисфосфату, при этом образуется две C_3 молекулы ФГК. Также фермент катализирует оксигенацию рибулозо-1,5-бисфосфата с образованием одной C_3 ФГК и C_2 молекулы гликолата, который преобразуется в цепи метаболических реакций при участии АТФ до ФГК. В некоторых случаях происходит

экскреция гликолата, что приводит к значительным энергетическим потерям и снижению скорости и эффективности фиксации углерода [254, 255]. Карбоксилазная и оксигеназная активность РБФК определяются соотношением концентраций углекислоты и кислорода в окрестностях реакционного центра фермента. Поэтому адаптация клеток микроводорослей к недостатку CO_2 может проявляться в увеличении внутриклеточного количества CO_2 либо в увеличении количества самого РБФК [96]. На сегодняшний день достаточно подробно исследован CO_2 -концентрирующий механизм в клетках микроводорослей и цианобактерий, благодаря которому максимальные скорости фотосинтетического выделения кислорода при низких и высоких концентрациях CO_2 одинаковые [96]. Эффективность использования внутриклеточного углерода C_i повышается за счёт наличия внутриклеточного пула, в котором C_i представлено в форме гидрокарбонатов, и снижения потерь CO_2 из-за диффузионных процессов. В литературе приводятся описания CO_2 -концентрирующего механизма для разных видов микроводорослей. Большая часть исследований CO_2 -КМ выполнено на эукариотических клетках, у которых внутриклеточный пул C_i может находиться и в цитоплазме и в строме хлоропласта [105]. Также описан CO_2 -КМ для цианопрокариот [208], у которых, согласно [249], в цитоплазме КА не обнаружена, в то время как многочисленные исследования хлоропластов показали присутствие КА как в мембранах, так и в строме. C_i из внутриклеточного пула поступает в карбоксисому, где за счёт работы КА в зоне активного центра РБФК преобразуется в CO_2 . При этом образуются гидроксил-ионы, избыток которых поступает в цитоплазму или удаляется за пределы клетки [96, 208].

Рассмотрим пример работы CO_2 -КМ у цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* Gomont. На рисунке 1.2 представлена схема ассимиляции неорганического углерода. При культивировании спироулины на стандартной среде Заррук в составе среды преобладают гидрокарбонат-ионы [281]. Поэтому в качестве источника углерода клетки спироулины используют именно гидрокарбонаты. Согласно современным представлениям [249] существует три основных переносчика, которые обеспечивают транспорт гидрокарбоната в клетку, причём активность переносчиков при разных концентрациях HCO_3^- в среде различная. При высоких концентрациях HCO_3^- работает переносчик BicA, который характеризуется низким сродством к иону HCO_3^- . Этот переносчик не требует затрат энергии, осуществляет, по сути, облегчённый транспорт (симпорт с Na^+). Также низкое сродство препятствует избыточному поступлению гидрокарбонатов в клетку. Избыток натрия удаляется из клетки посредством специального канала (антипорт с H^+), который играет важную роль в регуляции внутриклеточного pH и транспорта многих ионов [96].

При снижении потока углерода в клетку включается дополнительный канал SbtA, который характеризуется большим сродством к HCO_3^- . SbtA, также как BicA, осуществляет

облегчённый транспорт при участии катиона Na^+ без затрат энергии АТФ. В условиях недостатка углерода для реализации максимально возможного потока включается активный транспорт за счёт энергии АТФ посредством работы переносчика ВСТ1, который характеризуется высоким сродством к HCO_3^- . Отметим, что на начальных этапах накопительного культивирования величина pH стандартной питательной среды Заррук [281] около 8,5 единиц. Следовательно, доля неорганического углерода в форме CO_2 составляет около 20 % от суммарного углерода в среде. Поэтому поток углерода в клетку может быть представлен не только ионами HCO_3^- , но и углекислым газом. Молекулы CO_2 проникают в клетку либо за счёт диффузии, либо за счёт облегчённого транспорта с участием переносчиков NDH-1₃ и NDH-1₄ [249].

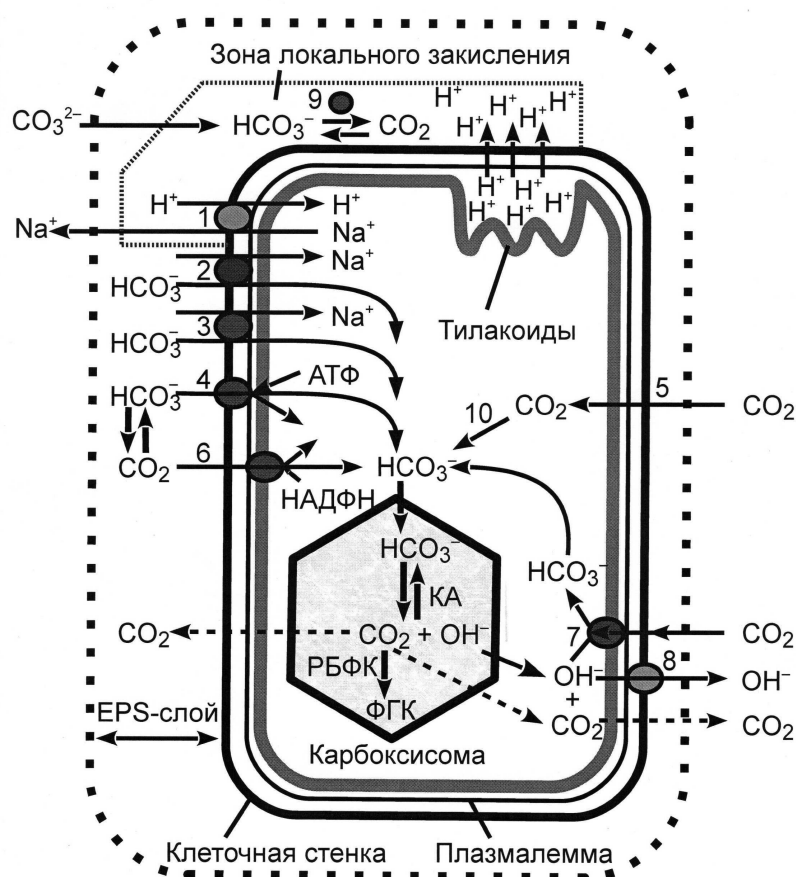


Рисунок 1.2 Схема ассимиляции неорганического углерода клетками цианобактерий. Пояснения в тексте

В современной литературе вопросам ассимиляции углерода клетками цианопрокариот уделено достаточно большое внимание. Однако практически нет упоминаний об ассимиляции карбонат-ионов. Хотя, экспериментально показано [105], что в качестве источника углерода для спиролины могут использоваться ионы CO_3^{2-} . Возможно, карбонат-ион при участии экстрацеллюлярной КА, находящейся в слое экзополисахаридов [96] в локальных зонах

закисления [208], преобразуется в гидрокарбонат-ион и CO_2 , которые согласно вышеуказанному механизму поступают в клетку. Отметим, что ключевую роль в поддержании низких значений pH в зоне локального закисления играет транспорт протонов из полости тилакоидов.

1.4.2. Ассимиляция азота клетками микроводорослей

Азот является третьим по значимости фактором среды (после света и углерода), определяющим скорость и эффективность фотобиосинтетических процессов в клетках микроводорослей. Микроводоросли представляют собой группу полифилетических организмов, которые в ходе эволюции развивали различные клеточные структуры и пути метаболизма. Наиболее простой метаболизм азота встречается у представителей первичного эндосимбиоза (Glaucocystophytes, Rhodophytes, Chlorophytes) [258]. Микроводоросли способны поглощать азот в различных формах. Нитраты являются основным источником азота для фитопланктона [201]. Ассимиляция нитратов осуществляется в несколько этапов: 1. Транспорт в клетку; 2. Восстановление нитрата до нитрита при участии фермента нитрат-редуктазы; 3. Транспорт нитритов в хлоропласт, в котором происходит катализируемое нитрит-редуктазой восстановление до аммония; 4. Аммоний при участии нескольких ферментов, углеродных скелетов и АТФ может служить субстратом для глутаминсинтетазного/глутаматсинтетазного цикла (GS / GOGAT цикла) или для цикла мочевины [46].

Существует 3 группы белков, осуществляющие транспорт нитратов через мембрану. Первая группа – NRT1-переносчики, встречающиеся у многих растений. Они обладают низким сродством к нитратам, однако некоторые представители этой группы могут обладать и высоким сродством к нитратам при фосфорилировании [269]. Вторая – NRT2-переносчики, широко распространены у растений, микроводорослей, грибов и бактерий. NRT2 могут участвовать в транспорте, как нитратов, так и нитритов [191]. Третья группа – NAR1-переносчики, способны к транспорту нитритов, имеются сведения об участии в переносе гидрокарбонат-ионов, являясь элементом CO_2 -КМ [229].

Фермент нитрат-редуктаза восстанавливает нитраты до нитритов с использованием НАДФ·Н. Восстановление нитритов до аммония происходит в строме хлоропласта при участии ферредоксина, который выступает донором электронов. В темноте, когда цепь переноса электронов не функционирует, процесс может происходить при участии НАДФ·Н. Окончательно неорганический азот преобразуется в глутамат в GS / GOGAT цикле. Ферменты глутамин- и глутамат-синтетаза катализируют процесс цикла при участии АТФ либо восстановленной формы ферредоксина.

Резюмируя приведённые сведения, можно сделать вывод, что на любой стадии метаболизма азота необходима энергия, которая может использоваться в виде запасённых в световых реакциях фотосинтеза или других процессах макроэргов АТФ и НАДФ·Н, либо поступать напрямую из ЭТЦ через ферредоксин. Таким образом, даже при лимитировании роста микроводорослей азотом, световые условия, в которых находятся клетки, напрямую влияют на скорость роста культуры.

1.4.3. Ассимиляция фосфора клетками микроводорослей

Фосфор (Р) – третий важнейший после углерода и азота биогенный элемент, который необходим для биосинтеза и энергообмена. Он входит в состав многих клеточных структур всех цианопрокариот и микроводорослей. Концентрация Р является одним из ключевых параметров, которые определяют первичную продукцию фитопланктона, причём в некоторых случаях минеральный фосфор является ведущим фактором наряду с длительностью светового дня и температурой воды [44]. Исследования фитопланктона показали, что примерно половина поглощённого фосфора вовлекается в синтез РНК, около 20 % на фосфолипиды, оставшиеся 30 % поступают на ДНК и АТФ [272]. В клетках микроводорослей Р находится исключительно в связанной форме фосфонатов, фосфоэфиров или полифосфатов [162].

Клеточные полифосфаты могут быть в различных химических формах, таких как конденсированные гранулы, нуклеотиды и неорганические цепочки. Функции полифосфатов в клетках разнообразны, варьируют у различных видов. Количество полифосфатов также зависит от многочисленных факторов: обеспеченность клеток фосфором, фаза роста культуры, рН, температура и др. [213]. Одно из важнейших свойств полифосфатов обусловлено их способностью накапливаться в клетках микроводорослей в условиях избыточного количества фосфора во внешней среде. Это явление получило название "luxury uptake" или явление избыточного поглощения. Оно отмечено и в условиях культур, и у фитопланктона [84, 95, 172, 276].

Фосфоэфиры в клетках микроводорослей представлены в виде моно- и диэфиров, которые входят в состав важнейших биохимических соединений: ДНК, РНК, АТФ и др. Фосфоэфирные связи являются основными в пуле клеточного органического Р. Фосфоэфирные связи также представлены в соединениях, которые можно отнести к пулу растворённого органического фосфора, который может составлять три четверти несвязанного органического фосфора [176].

Поглощение фосфора клетками микроводорослей и цианобактерий регулируется мембранносвязанными ферментами-транспортёрами, формы, активность и количество которых определяет скорость ассимиляции Р. Эукариотические водоросли, как правило, имеют несколько низко- и высокоаффинных транспортёров. У некоторых цианобактерий может

присутствовать только один переносчик pstSCAB, включающий высоко аффинный белок pstS и АТФ-зависимый транспортный комплекс. У микроводорослей РТА-транспортёр активируется при недостатке фосфора в течение нескольких часов. Микроводоросли способны усваивать как неорганические, так и органические формы фосфора благодаря наличию специальных мембраносвязанных ферментов, которые расщепляют фосфоэфиры, фосфонаты с образованием ортофосфатов [176]. Какие бы механизмы не обеспечивали бы поглощение и внутриклеточный метаболизм фосфора, несомненным является необходимость наличия энергии для протекания данных процессов. Энергия может поступать от АТФ либо напрямую от ЭТЦ световых реакций [163]. Многочисленными экспериментальными данными показано, что на свету скорость поглощения Р выше, нежели в темноте, хотя для некоторых видов такая закономерность не подтверждается [207]. Резюмируя вышесказанное, скорость поглощения Р – энергозависимый процесс, определяется внешней концентрацией Р и обратно пропорциональна его внутриклеточному содержанию.

1.4.4. Моделирование кинетики поглощения биогенных элементов

Пропорциональность скорости роста культуры микроводорослей количеству (концентрации) субстрата подтверждена многочисленными экспериментальными работами. Однако увеличение скорости при увеличении количества субстрата не безгранично: при достижении некоторого уровня обеспеченности субстратом величина скорости роста остаётся неизменной. Впервые этот факт экспериментально изучен Блэкманом [152], который ввёл понятие "принципа минимума": скорость субстратзависимой реакции контролируется одной, самой медленной скоростью в цепи биологических реакций. Впоследствии, такая реакция была названа "узким местом" метаболизма [233]. Математической записью данного положения является "ломанная" Блэкмана:

$$\begin{cases} \mu = \mu_m, S \geq S_K; \\ \mu = \frac{\mu_m}{S_K} \cdot S, S < S_K, \end{cases} \quad (1.24)$$

где μ – удельная скорость роста; μ_m – максимальная удельная скорость роста; S – концентрация лимитирующего субстрата; S_K – константа насыщения, т. е. концентрация лимитирующего субстрата, при которой удельная скорость роста достигает своего максимального значения (происходит смена лимитирующего фактора).

Данная модель является некоторой идеализацией биологических процессов, поскольку не рассматривает сути субстратзависимых реакций в клетках. Поэтому она не всегда пригодна для описания экспериментальных данных роста микроводорослей в культуре. Следовательно, возникает необходимость построения моделей на основе механизмов преобразования энергии и

вещества в клетках. Такие механизмы очень сложны и на сегодняшний день недостаточно изучены, поэтому при моделировании процессов субстратзависимого роста исследователи обычно опираются на простейшие представления. Например, в соответствии с общепринятыми обобщениями биологических наук [21] все биологические реакции должны быть подчинены закону химической кинетики, точнее, закону действующих масс [19]. В соответствии с законом действующих масс при взаимодействии двух компонентов A и S скорость образования продукта C прямо пропорциональна произведению их концентраций:

$$A + S \xrightarrow{k} C,$$

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot [A] \cdot [C]. \quad (1.25)$$

Также общепринятым считается, что все биологические реакции происходят с участием ферментов [21]. Это обобщение автоматически приводит к возможности применения понятийного аппарата и формализма ферментативной кинетики для описания метаболических реакций. Особенностью ферментативных реакций является то, что молекула фермента, реагируя с молекулами нескольких типов субстрата, образует фермент-субстратный комплекс. И далее возможны два варианта: 1. Из субстрата происходит образование продукта, при этом молекула фермента остаётся неизменной. 2. Фермент-субстратный комплекс распадается без образования продукта [18, 19]. При этом молекулы и фермента, и субстрата остаются неизменными. Если в реакцию с молекулой фермента вступают два и более типа субстрата, в соответствии с конструктивным принципом Либиха [221], скорость образования продукта будет определяться концентрацией одного лимитирующего субстрата. Такие рассуждения приводят к следующей схеме:



где $[E]$ – концентрация фермента в растворе; $[S]$ – концентрация лимитирующего субстрата в растворе; $[ES]$ – концентрация фермент-субстратного комплекса; $[P]$ – концентрация продукта; k_1 – константа скорости образования фермент-субстратного комплекса; k_{-1} – константа скорости распада фермент-субстратного комплекса; k_2 – константа скорости образования продукта.

Для стационарного состояния, когда концентрация комплекса ES не изменяется, скорость V образования продукта зависит от концентрации субстрата S согласно уравнению, впервые полученному Михаэлисом и Ментен [230]:

$$V = V_m \cdot \frac{S}{K_s + S}, \quad (1.26)$$

где K_s – константа полунасыщения.

Данная модель была предложена для описания ферментативных реакций в начале прошлого столетия, основана на законе действующих масс, поэтому применима только для идеальных гомогенных растворов. С другой стороны, уравнение Михаэлис-Ментен с высокой точностью описывает экспериментальные данные поглощения различных биогенных элементов (азота, фосфора и др.) культурами микроводорослей и фитопланктоном [84, 175, 177]. Например, на рисунке 1.3 представлены типовые экспериментальные зависимости скорости поглощения азота от его концентрации в питательной среде для двух видов диатомовых водорослей [177, 178]. Отметим, что поглощение азота происходит как на свету, так и в темноте, но с разными скоростями. Рассчитанные величины максимальной скорости поглощения и константы полунасыщения на свету выше соответственно в 3 и 1,5 раза.

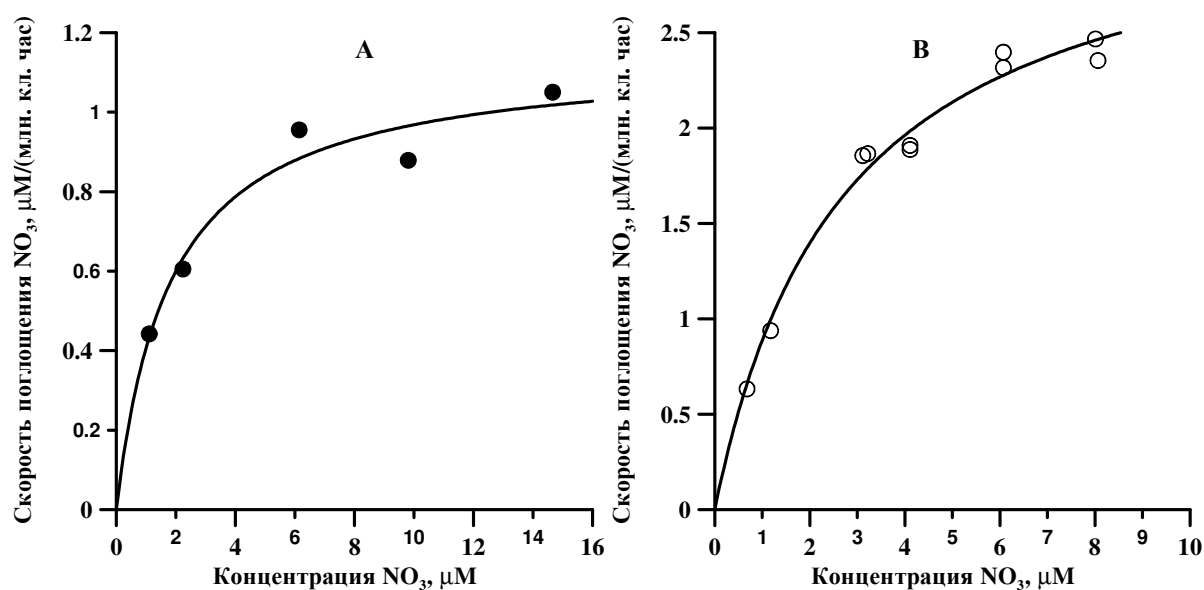


Рисунок 1.3 Зависимость скорости поглощения нитратов от их концентрации для *Ditylum brightwelli* в темноте (А) и *Coscinodiscus lineatus* на свету (В) [177, 178]. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1.26). Значения коэффициентов: а – $V_m = 1.14$, $K_S = 1.81$; б – $V_m = 3.29$, $K_S = 2.71$

В литературе приводятся многочисленные данные, что параметры уравнения Михаэлис-Ментен зависят от облучённости, спектра падающего света, температуры, концентрации биогенных элементов в среде, внутриклеточной квоты, солёности и др. факторов [44, 145, 256, 271]. Это объясняется тем, что ассимиляция азота и его дальнейший внутриклеточный метаболизм происходят с участием нескольких ферментов. Их количество и активность можно считать постоянными только в условиях стационарного динамического равновесия хемостата. Например, активность нитрат-редуктазы определяется внутриклеточным содержанием азота [179], а также энергетической обеспечённостью в виде НАДФ·Н [150, 258].

Метаболические реакции в клетках микроводорослей представляют собой последовательность множества отдельных ферментативных и фотохимических реакций. Общеизвестная гипотеза Бидла и Татума [21] конкретизирует это обобщение в виде схемы "один ген – один фермент – одна биохимическая реакция". Скорость протекания всего процесса (роста), в соответствии с принципом Блэкмана, будет равна скорости самой медленной из всей цепи реакций. Следовательно, если такая реакция является ферментативной, то по аналогии с формулой Михаэлиса-Ментен можно записать аналогичную формулу зависимости скорости роста культуры (продуктивности) P от концентрации лимитирующего субстрата S :

$$P = P_m \cdot \frac{S}{K + S}, \quad (1.27)$$

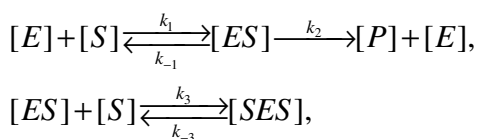
где P_m – максимальное значение продуктивности. Разделив обе части равенства на величину биомассы B , получим известное уравнение Моно [233] зависимости удельной скорости роста μ от концентрации субстрата:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K + S}, \quad (1.28)$$

где μ_m – максимальное значение удельной скорости роста.

Модель Моно широко используется в микробиологии и основана на предположении о существовании "узкого места" метаболизма в цепи биосинтетических реакций, которые протекают с участием ферментов. Скорость роста биомассы в целом будет определяться скоростью самой медленной стадии, которая ограничена концентрацией лимитирующего субстрата S . Постоянство констант уравнения Моно предполагает инвариантность во времени соотношения элементов в клетке, так как только при постоянстве клеточного состава скорости ферментативных реакций могут оставаться постоянными [134]. Кроме того, многочисленными экспериментальными данными показано, что рост культуры микроводорослей и ассимиляция биогенных элементов являются независимыми процессами [84, 176].

Для высоких концентраций субстрата может наблюдаться субстратное ингибирование роста [38]. Торможение скорости реакции объясняется присоединением второй молекулы субстрата к уже образовавшемуся фермент-субстратному комплексу $[ES]$, в результате чего образуется комплекс двух молекул субстрата с одной молекулой фермента $[SES]$, не производящий продукт:



где k_3 – константа скорости образования комплекса $[SES]$; k_{-3} – константа скорости распада $[SES]$. При такой схеме, скорость образования продукта V определяется уравнением [18]:

$$V = V_m \cdot \frac{S}{K + S + \frac{S^2}{K_i}}, \quad (1.29)$$

где K_i – константа ингибирования.

В ферментативной кинетике предложен ряд моделей, основанный на различных предполагаемых механизмах реакции. Однако ни одна из них не выделялась по точности описания экспериментальных данных [13]. Поэтому статистически достоверный вывод о механизме ингибирования высокими концентрациями субстрата сделать трудно.

Другим типом ингибирования роста клеток является угнетение роста из-за какого-либо продукта собственного метаболизма. Типичными примерами является накопление токсинов в околочклеточной среде у сине-зелёных водорослей [104], накопление продуктов жизнедеятельности в плотной культуре. В таком случае описание механизма ингибирования сводится к схеме конкурентного или неконкурентного ингибирования. В микробиологических исследованиях экспериментально показано, что обычно проявляется неконкурентное ингибирование [19]. Следовательно, в схему Михаэлис-Ментен вводятся добавочные коэффициенты: изменения сродства фермента к субстрату под действием ингибитора, изменение скорости распада фермент-субстратного комплекса. С введением этих коэффициентов уравнение Моно преобразуется к широко известной зависимости Моно-Иерусалимского [86, 93]:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{K_p \cdot S}{(K_p + P) \cdot (K + S)}, \quad (1.30)$$

где K_p – константа ингибирования продуктом; P – концентрация продукта.

Кроме указанных типов ингибирования, экспериментально отмечается ингибирование токсическими веществами, не являющимися продуктами метаболизма, например, тяжёлые металлы (ртуть, свинец и пр.), гербициды, ПАВ и т. д. [84]. Для многих ингибиторов роста такого типа механизм действия количественно малоизучен, поэтому моделирование ингибирования роста представляет отдельную проблему в биокинетике.

Все предложенные модели на основе понятийного аппарата, разработанного в работах Михаэлиса-Ментен и Моно, используют концентрацию субстрата в околочклеточной среде. В реальности скорость роста определяется не концентрацией субстрата в околочклеточной среде, а наличием внутриклеточного свободного субстрата S_f . Экспериментально показано [173], что скорость поглощения субстрата клеткой зависит от концентрации субстрата в околочклеточной среде, что вытекает из теории абсорбции газов Ленгмюра [19]. В клетке, кроме свободного субстрата, есть связанный S_a , который входит в структурные образования клетки. Для культуры клеток, состоящей из i особей сумма всех S_{ia} численно равна истинной потребности Y_S^0 , т. е.

минимальному количеству субстрата необходимого для построения единицы биомассы (i особей). Суммарная концентрация субстрата в клетке $S_{\text{кл}} = S_f + S_a$. На практике удобно использовать относительные значения концентрации субстрата, поэтому суммарную концентрацию субстрата в клетке можно записать $Q = q_f + q_a$, где Q – доля суммарного субстрата в клетке, q_f – доля свободного и q_a связанного субстрата в клетке.

Уравнение, связывающее величину удельной скорости роста с внутриклеточным содержанием субстрата, предложено Друпом [173]:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{Q - q_{\min}}{Q}, \quad (1.31)$$

где $q_{\min}$ – минимальная квота, минимальная доля субстрата в клетке.

Можно показать, что модель Друпа по форме является гиперболической зависимостью, которая близка гиперболе Моно (1.28):

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{q_f}{q_a + q_f}.$$

Модель Друпа достаточно точно описывает экспериментальные данные субстратзависимого роста разных видов микроводорослей в условиях стационарного динамического равновесия. Анализ (1.31) показывает, что при уменьшении концентрации свободного субстрата S_f до нуля, суммарная доля внутриклеточного субстрата стремиться к доле субстрата, входящего в клеточные структуры, т. е. $Q = q_a = q_{\min}$. При этом удельная скорость роста клеток также стремиться к нулю. По сути, величина $q_{\min}$ есть некоторый физиологический минимум для конкретного вида, при котором клетка способна выживать.

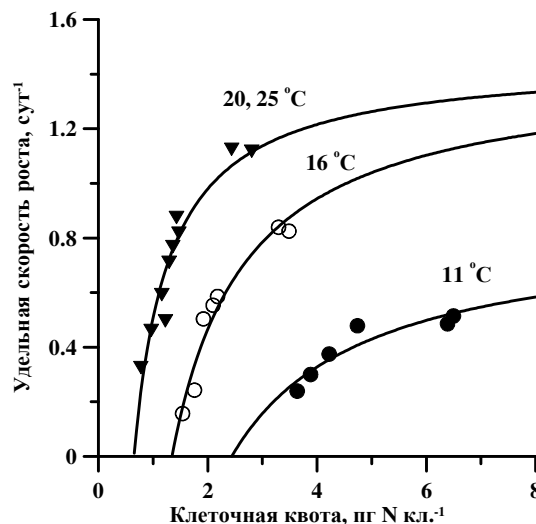


Рисунок 1.4 Зависимость удельной скорости роста *Scenedesmus* sp. от клеточной квоты азота при различных температурах [189]. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1.31). Значения коэффициентов: 11 °C – $\mu_m = 0.84$, $q_{\min} = 2.44$; 16 °C – $\mu_m = 1.42$, $q_{\min} = 1.34$; 20, 25 °C – $\mu_m = 1.45$, $q_{\min} = 0.65$

На сегодняшний день моделирование субстратзависимого роста микроводорослей базируется большей частью на положениях модели Друпа, при этом скорость поглощения биогенных элементов из внешней среды описывается уравнением (1.26). Так, например, на рисунке 1.4 представлены экспериментальные данные зависимости удельной скорости роста *Scenedesmus* sp. от клеточной квоты азота при различных температурах [189].

Развитие идеи Друпа о лимитировании роста микроводорослей внутриклеточным содержанием субстрата получило в работах Флинна [178, 188]. Автором разработаны математические модели, которые основываются на механизмах поглощения и внутриклеточного метаболизма различных биогенных элементов: азота в разных формах, фосфора, железа, кремния и пр. В качестве альтернативы классическому подходу Михаэлис-Ментен предложена эмпирическая функция, которая позволяет описать зависимость скоростей тех или иных внутриклеточных процессов от концентрации:

$$V = V_m \cdot \frac{S^n}{K_s + S^n}, \quad (1.32)$$

где S – относительный размер пула элемента (нормировка на максимальное значение), n – константа, принимающая различные значения: при $n = 1$ – имеем уравнение Михаэлис-Ментен (1.12). При моделировании кинетики ассимиляции и внутриклеточного метаболизма аммония, нитратов, фосфатов использовалось уравнение, в котором $n = 4$:

$$V = V_m \cdot \frac{S^4}{K_s + S^4}. \quad (1.33)$$

Для морского фитопланктона в стационарных условиях получены численные решения системы дифференциальных уравнений, которая при описании кинетики азота содержит около 30 констант [187]. При описании переходных процессов роста культур микроводорослей использование такого подхода затруднено из-за большого количества переменных. В такой ситуации необходимо упрощение модели, выделения наиболее важных составляющих, отбрасывания функциональных связей со второстепенным значением, определения быстрых и медленных переменных и замены части из них постоянными величинами или параметрическими зависимостями [134].

Современные модели субстратзависимого роста культур микроводорослей основаны на рассмотрении биомассы как суммы двух или более составляющих [189]. Например, в работе [129] представлена трёхкомпонентная модель, описывающая динамику белков, липидов и углеводов при лимитировании роста световым или минеральным потоком субстрата. Широкое распространение получили двухкомпонентные модели роста, которые в англоязычной литературе получили название DEB-model (Dynamic Energy Budget). DEB-модели базируются на положении, что поглощённая клеткой энергия преобразуется в резервные углеводы [232,

238]. В дальнейшем их пул расходуется на процессы биосинтеза клеточных структур и "темнового" дыхания. Стехиометрические соотношения, как для резервной, так и структурной составляющей считаются постоянными, что согласуется с предложенной ранее концепцией для гетеротрофов [80]. Изменения биохимического состава клетки обусловлены лишь различными количествами резервной и структурной части. В общем, DEB-модели в качестве параметров состояния организма используют возраст, размер и количество резервов, а параметров окружающей среды – плотность популяции, температуру, наличие пищи и пр. По сравнению даже с трёхкомпонентным подходом [129], двухкомпонентные модели обладают существенно меньшим набором неизвестных параметров, что позволяет каждый коэффициент наделять биологическим смыслом. Кроме того, при стационарных условиях решения системы дифференциальных уравнений может быть выражено в простых аналитических функциях, что избавляет от необходимости применения численных методов и связанных с ними проблем [4].

1.5. Изменение содержания биохимических компонентов в культуре микроводорослей

Микроводоросли обладают уникальным биохимическим составом, причём особую ценность представляют морские виды. Морские эукариотические микроводоросли обладают большим генетическим и биохимическим разнообразием [8]. Некоторые виды морских микроводорослей могут являться продуцентами биотехнологически ценных клеточных компонентов, таких как пигменты, жирные кислоты, углеводороды, витамины и т. д. Также многочисленные исследования показали, что клеточные экстракты из морских водорослей являются первичным компонентом противовирусных, антигрибковых и антибактериальных препаратов [158, 222]. Например, *Thalassiosira pseudonana* и *Phaeodactylum tricornutum* могут использоваться в качестве сырья для получения биодизеля, так как они способны синтезировать и накапливать триацилглицерины (ТЦГ). Проведённые в рамках Aquatic Species Program исследования показали, что диатомовые микроводоросли при определённых условиях культивирования способны накапливать ТЦГ до 60 % их клеточной массы, которые легко могут быть преобразованы в биотопливо с помощью цепи химических реакций [280]. Максимальное накопление ТЦГ в клетках микроводорослей обычно происходит при стрессовых условиях, таких как недостаток азота или низкая температура [205]. Следует отметить, что различные стрессовые условия могут оказывать различное влияние на процессы биосинтеза ТЦГ. Например, лимитирование роста диатомовых микроводорослей азотом или кремнием: если происходит увеличение синтеза ферментов, участвующих в реакциях синтеза ТЦГ, то мы имеем дело с азотным голоданием [207].

Среди большого количества производимых из водорослей веществ особое место занимают полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA). Наиболее ценной является ω -3 группа, которая необходима для развития морских организмов и является незаменимой для сбалансированного питания человека [263]. На сегодняшний день PUFA получают из рыбьего жира, однако микроводоросли могут использоваться как альтернативный источник их получения. Особое внимание заслуживает эйкозопентаеновая кислота (EPA), которая встречается во многих видах морских микроводорослей. Только несколько видов можно использовать для промышленного культивирования. В этом случае на первое место выходят те виды, которые обладают большими скоростями роста. Например, *Ph. tricornutum* показывает большие скорости роста, высокое клеточное содержание EPA при низком содержании докозгексаеновой кислоты. Клеточные экстракты из *Ph. tricornutum* обладают антибактериальным действием для многих штаммов бактерий, причём основным компонентом является эйкозопентаеновая кислота [171]. Эйкозопентаеновая кислота и докозгексаеновая кислота (DHA), относящиеся к омега-3 жирным кислотам, обладают мощным оздоровительным эффектом на человеческий организм. Современные медицинские исследования этих веществ показывают, что они могут предотвращать болезни сердца, системы кровообращения, облегчать течение воспалительных процессов. Впервые это было обнаружено у пациентов, в питании которых присутствовала рыба или рыбий жир. При этом первичными продуцентами жирных кислот являются морские микроводоросли, которые служат кормом для рыб.

Таким образом, биохимический состав клеток микроводорослей является индикатором внешних условий. При исследованиях роста культур микроводорослей необходимо уметь прогнозировать динамику содержания биохимических компонентов клеток.

Если считать, что культура не выходит за границы линейной фазы роста, тогда динамика биомассы будет подчиняться уравнению (1.11):

$$B = \frac{P_m}{\omega} - \left(\frac{P_m}{\omega} - B_0 \right) \cdot e^{-\omega(t-t_0)},$$

где B_0 – плотность культуры в момент времени включения протока t_0 .

С учётом того, что любой биохимический компонент является частью биомассы и может быть выражен через величину относительного содержания β , динамика концентрации данного компонента в среде будет также подчиняться уравнению (1.11) [65]. Например, для концентрации белка $\mathcal{P}$ получим:

$$\mathcal{P} = \frac{\rho_m}{\omega} - \left(\frac{\rho_m}{\omega} - \mathcal{P}_0 \right) \cdot e^{-\omega(t-t_0)}, \quad (1.34)$$

где ρ_m – максимальная продукция белка, $\mathcal{P}_0$ – концентрация белка в момент включения протока t_0 .

Учитывая (1.11) и (1.34), теоретическую кривую динамики относительного содержания белка в биомассе можно записать в виде:

$$\beta = \frac{\frac{\rho_m}{\omega} - (\frac{\rho_m}{\omega} - \rho_0) \cdot e^{-\omega(t-t_0)}}{\frac{P_m}{\omega} - (\frac{P_m}{\omega} - B_0) \cdot e^{-\omega(t-t_0)}} \cdot 100\%. \quad (1.35)$$

Полученная зависимость позволяет прогнозировать содержание белка в биомассе в произвольный момент времени на этапе квазинепрерывной культуры (расчёт кинетических характеристик белка и биомассы производится на линейной фазе роста накопительной культуры). Также уравнение (1.35) позволяет решать и обратную задачу – аппроксимация экспериментальных данных позволит определить удельную скорость потока системы или ростовые характеристики культуры.

1.5.1. Моделирование зависимости относительного содержания пигментов от облучённости

К настоящему времени накоплено большое количество экспериментальных данных о динамике роста различных видов микроводорослей в накопительной (периодической) культуре. В большинстве случаев эти материалы включают наряду с измерением плотности культуры (число клеток, биомасса, оптическая плотность) параллельные измерения содержания какого-либо пигмента в клетках микроводорослей (хлорофилла *a*, фикобилипротеинов и т. д.) [82, 91]. Анализ такого рода данных представляет собой сложную задачу. Относительное содержание пигментов в клетке или биомассе не является постоянной величиной и может изменяться в десятки раз, а также характеризуется сильной нелинейностью в процессе роста культуры. На рисунке 1.5 показаны примеры изменения содержания хлорофилла *a* и фикоцианина в биомассе микроводорослей в процессе роста спироулины [82]. Приведённые экспериментальные результаты показывают, что переходные процессы в динамике относительного содержания пигментов в биомассе микроводорослей могут характеризоваться «ложным стартом» при полном минеральном обеспечении роста, который наблюдается при смене световых условий в культуре.

К настоящему времени практически отсутствуют внятные объяснения этому феномену, хотя и существуют модельные представления о зависимости относительного содержания пигментов в клетках микроводорослей от факторов внешней среды (особенно световых условий) для стационарного роста в непрерывной культуре. И даже при использовании таких моделей возникают сложности в описании динамики переходных процессов, связанных с акклимацией клеток при изменении какого-либо фактора внешней среды. Особенно ярко акклимация (в виде изменения содержания пигментов в клетках) может проявляться на

начальных стадиях роста накопительной культуры микроводорослей. Чаще всего это происходит при значительном изменении световых условий выращивания, в частности, при резком изменении поверхностной освещенности или уменьшении плотности культуры за счёт разбавления. Это явление получило название фотоакклимации клеток микроводорослей к изменению внешней освещённости [12, 41, 97, 185].

В современной литературе приводится два вида моделей, которые описывают влияние интенсивности света на величину относительного содержания пигментов в биомассе микроводорослей β . Во-первых, это группа эмпирических моделей, которые получены при статистическом анализе реальных экспериментальных данных количественного содержания пигментов в клетках различных видов микроводорослей [167, 185]. Например, это широко известная модель Гейдера [195]: величина относительного содержания хлорофилла a увеличивается прямо пропорционально величине освещённости при постоянной температуре и экспоненциальном росте культуры микроводорослей. В дальнейшем Гейдер с соавторами [196] предложил модель, которая основывается на том, что наблюдаемая скорость роста есть разница между скоростью фотосинтеза и дыхания, а наблюдаемая скорость изменения концентрации хлорофилла a является разностью скоростей его синтеза и деструкции. На основе данных представлений получено уравнение, описывающее изменение относительного содержания хлорофилла a от внешней освещённости.

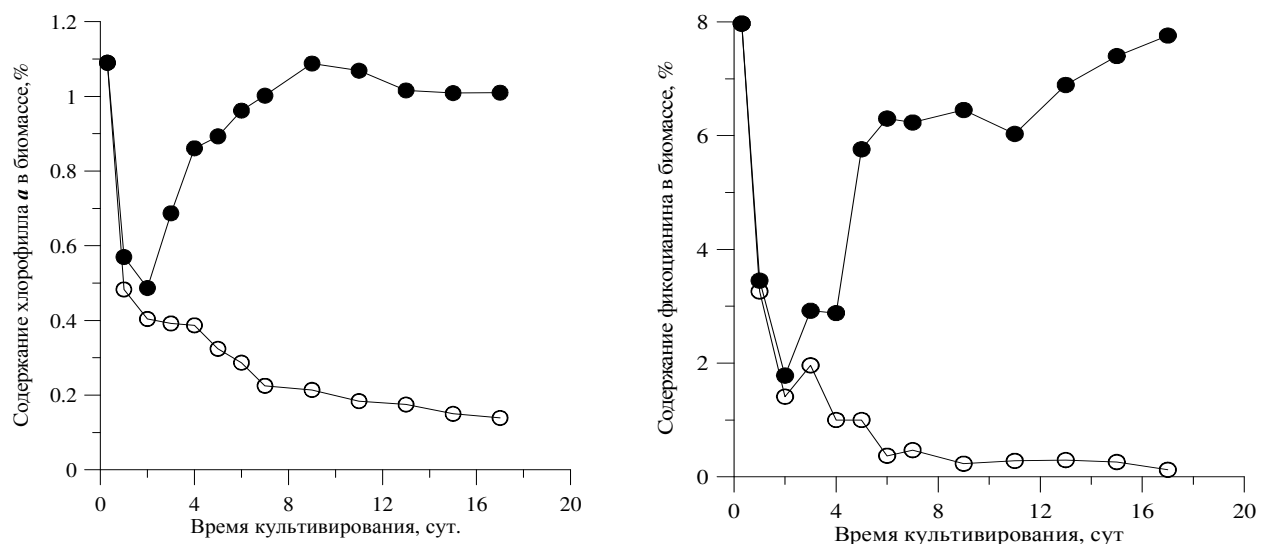


Рисунок 1.5 Динамика содержания пигментов в микроводорослях при полном минеральном обеспечении (●) и лимитировании клеток азотом (○)[82]

В основе второй группы моделей положен стохастический подход взаимодействия светового потока и пигментной системы [14, 24, 112, 113]. Здесь учитывается, что под действием света наряду с синтезом пигментов происходит их обратимое фотодеструктивное

окисление, а также частичная репарация [14]. При малых интенсивностях света величина β стремится к максимальному значению β_m , при больших интенсивностях β стремится к минимальному значению β_{min} . Данные коэффициенты являются важнейшими видоспецифичными параметрами и могут быть рассчитаны путём аппроксимации реальных экспериментальных данных содержания пигментов в биомассе микроводорослей.

Современные исследования процессов фотодеструктивного окисления пигментов показывают, что наиболее вероятен следующий механизм. Пигмент поглощает квант света и переходит в возбуждённое состояние, которое соответствует первому синглетному уровню. Далее происходит переход в триплетное состояние, при этом выделяется энергия, за счёт которой ионизируется молекула кислорода с образование атомарного кислорода, являющегося сильнейшим окислителем. Молекула пигмента, находящаяся в триплетном состоянии, может вернуться в основное состояние при участии каротиноидов с выделением тепла. В свою очередь синглетный кислород может необратимо окислять пигмент, переводя его в неактивную форму [61, 103, 236]. Все указанные выше процессы могут быть записаны в виде обобщённой схемы:



где π – текущая концентрация пигмента; π^* – концентрация пигмента в возбуждённом (синглетном) состоянии; π_d – концентрация пигмента в триплетном состоянии; π_π – концентрация окисленного пигмента; μ_i – константа перехода в синглетное возбуждённое состояние; μ_{-i} – константа перехода из синглетного в основное состояние; μ_d – константа перехода в триплетное состояние; μ_r – константа перехода из триплетного в основное состояние; μ_π – константа образования фотоокисленной формы пигмента.

1.6. Моделирование влияния температуры на скорость роста микроводорослей

Величина продуктивности культуры не может являться независимым параметром для характеристики роста, т. к. зависит от количества биомассы. Подобного недостатка лишена удельная скорость роста. Если рассматривать температурную зависимость удельной скорости, то, при стационарном динамическом равновесии проточной культуры, она определяется температурной кривой активности ключевого ферментного комплекса μ_e , который и ограничивает скорость роста культуры [101]. Активность каталитического центра зависит от различных факторов (например, положение молекулы субстрата относительно каталитического центра в начальный момент взаимодействия, скорость молекулы, локальные физико-химические условия). Для того чтобы точно описать кинетику субстратзависимой

биологической реакции, необходимо знать закон распределения активности. В некоторых случаях количественные закономерности, описывающие скорость субстратзависимых реакций, не зависят от вида распределения активности фермента, а определяются лишь математическим ожиданием этой величины.

Формально при описании зависимости активности "узкого места" метаболизма от температуры используют основополагающие законы химической кинетики. Нидерландский химик, один из основоположников биохимии и биохимической кинетики, Вант-Гофф на основании многочисленных наблюдений установил, что при повышении температуры на 10 °C скорость гомогенной химической реакции увеличивается в 2 – 4 раза [19]. Это обобщение известно, как правило, Вант-Гоффа, которое является эмпирическим:

$$\mu = \mu_{\min} \cdot Q_{10}^{\frac{T-T_{\min}}{10}}. \quad (1.37)$$

Для параметризации зависимости скорости химической реакции от температуры используют коэффициент Вант-Гоффа Q_{10} – отношение константы скорости реакции при температуре $T+10$ к константе скорости при температуре T . Правило Вант-Гоффа носит приближённый характер, является монотонно возрастающей функцией, поэтому применимо для узкого диапазона температур и служит лишь для ориентировочной оценки влияния температуры на скорость реакции [6, 19]. Более точную зависимость скорости химической (ферментативной) реакции от температуры даёт уравнение Аррениуса:

$$\mu = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}}, \quad (1.38)$$

где E_a – энергия активации; A – параметр, прямо пропорциональный числу столкновений молекул; μ – константа скорости реакции.

Согласно модели (1.21), зависимость скорости реакции от температуры можно объяснить увеличением кинетической энергии молекул. Константа скорости μ определяется двумя постоянными для данной реакции величинами – числом столкновений молекул и энергией активации E_a . Увеличение скорости реакции при повышении температуры происходит тем быстрее, чем больше энергия активации. Если процесс осуществляется конкурирующими реакциями, скорость которых по-разному зависит от температуры, при низких температурах основной выход продукта будет осуществляться за счёт реакции с малой энергией активации, а при повышении температуры будет возрастать степень важности реакции, имеющей большую энергию активации. В случае последовательных реакций скорость суммарного процесса будет определяться скоростью наиболее медленно протекающей реакции.

Применительно к культурам микроводорослей в литературе отсутствуют общепринятые подходы к моделированию температурной кинетики роста. Авторы используют выражения Вант-Гоффа, Аррениуса, их производные, либо иные зависимости. Например, в [252] показано,

что классические модели (1.37) и (1.38) не всегда хорошо описывают зависимость скорости роста микроорганизмов от температуры. В качестве альтернативы автором предложено эмпирическое выражение, которое с высокой точностью описывает экспериментальные данные для шести родов бактерий:

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_0), \quad (1.39)$$

где b – угол наклона линии регрессии; T_0 – температура остановки клеточного метаболизма.

В работах [241, 245] предложено выражение, аналогичное модели Аррениуса (1.38), которое учитывает деградацию клеточных структур при повышении температуры:

$$\mu = A_0 \cdot e^{\frac{-E_a}{RT} - \frac{T-T_0}{T_0}} - B_0 \cdot e^{\frac{-E_b}{RT} - \frac{T-T_0}{T_0}}, \quad (1.40)$$

где A_0 , B_0 – удельные скорости роста и эндогенного расхода биомассы при минимальной физиологической температуре T_0 ; E_a , E_b – энергии активации и деградации.

Таким образом, каждая из рассмотренных математических моделей, описывающих температурную кинетику удельной скорости роста, имеет область определения и основывается на тех или иных допущениях. Модель Аррениуса является наиболее точной и применяется для многих организмов. Однако для культур микроводорослей вопрос о моделировании температурной кинетики роста по-прежнему остаётся открытым.

1.7. Постановка цели и задач исследования

В главе рассмотрены основные подходы и принципы моделирования роста культуры микроводорослей. По сложившейся традиции в биокинетике используются модели, основывающиеся на формализме химической кинетики. Устоявшаяся парадигма моделирования роста культур микроводорослей подразумевает использование моделей Аррениуса для температурных зависимостей, Михаэлиса-Ментен (Моно) – для субстратзависимого роста, Бугера-Ламберта-Бера – для поглощения света и пр. Однако многочисленные данные свидетельствуют об отклонениях экспериментальных кривых от указанных моделей, что привело к множеству работ по их уточнению и модификации. За последнее время получены новые данные об организации и функционировании ферментных и транспортных систем клетки, которые определяют скорость фотосинтеза, ассимиляции биогенных элементов, биосинтеза живой структуры. Поэтому возникает необходимость в разработке новых теоретических подходов, которые позволят объединить знания о росте культур микроводорослей на молекулярном, клеточном и популяционном уровне в единое целое. Новый инструментарий позволит не только математически описать световые и темновые реакции фотобиосинтеза в культуре, но и определить видоспецифические коэффициенты

моделей, выявить ключевые закономерности их взаимосвязи с различными факторами среды, разработать алгоритмы управления ростом. Математическая строгость теории должна быть дополнена конкретными примерами возможности её упрощения для практического использования в анализе экспериментальных данных и построения прогностических моделей роста микроводорослей при заданных начальных условиях культуры и внешней среды.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная часть работы выполнялась на базе отдела Биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ. Объектами являлись культуры *Phaeodactylum tricornutum* Bohl., *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross, *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Gomont, *Dunaliella salina* Teod., полученные из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ ИнБЮМ. Культивирование *A. platensis* осуществлялось на питательной среде Заррук [281], *D. salina*, *Ph. tricornutum* и *P. purpureum* – среде для плотных культур морских микроводорослей [111]. Для дуналиеллы солёность среды поднималась до 120 г/л путём дополнительного внесения в морскую воду хлорида натрия.

2.1 Унифицированная установка для исследования роста микроводорослей

Разработке систем культивирования микроводорослей посвящено немало литературы [26, 59, 93]. Авторы предлагают разные виды конструкций, начиная от самых элементарных лабораторных культиваторов, заканчивая автоматизированными промышленными системами [180, 240, 270]. Реально в научно-исследовательских учреждениях в качестве лабораторных культиваторов традиционно используется химическая посуда. При этом, как правило, процедура измерения поверхностной радиации практически не учитывает расхождение форм освещаемых поверхностей. При перемешивании суспензии барботированием воздухом или газовоздушной смесью довольно приблизительно указывается количество воздуха на единицу объёма культуры. Указанные обстоятельства не дают возможности корректного сравнения экспериментальных данных, например, для расчета кинетических характеристик роста микроводорослей.

Таким образом, возникала необходимость в создании унифицированной установки для исследования процессов фотобиосинтеза микроводорослей [120], которая удовлетворяет следующим требованиям:

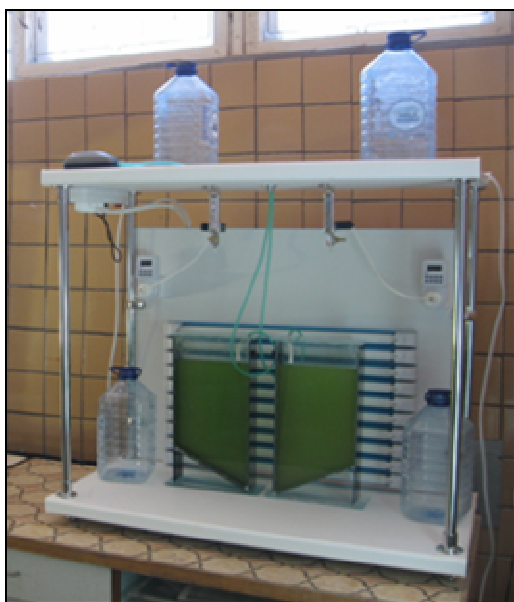
1. Все составные элементы системы разработаны на основе теоретических представлений о кинетике роста микроводорослей. Например, геометрия фотобиореактора должна быть такой, чтобы легко и довольно точно можно было рассчитывать важнейшие характеристики системы (объём, площадь освещаемой поверхности, интенсивность поверхностной радиации и др.);
2. Все составные системы культивирования должны быть стандартного фабричного производства, чтобы в случае выхода из строя какого-нибудь элемента конструкции его замена

не представляла бы трудностей; 3. Простота и надежность конструкции; 4. Контроль над основными параметрами роста культуры и возможность управления ими; 5. Минимальная стоимость всей системы культивирования.

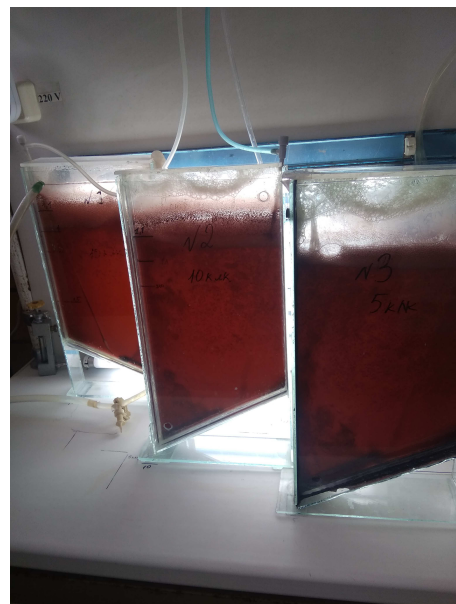
Используемая в данной работе унифицированная установка для культивирования микроводорослей состоит из установочной площадки, двух фотобиореакторов, систем освещения, термостабилизации, газообеспечения, а также системы обеспечения непрерывного режима культивирования (см. рис. 2.1).

Установочная площадка.

Установочная площадка представляет собой настольную конструкцию размерами 1000×800×500. Вертикальные стойки и их крепления выполнены из металлических никелированных трубок диаметром 25 мм, а полки – из белого пластика толщиной 20 мм. На нижней площадке расположены два фотобиореактора и сливные ёмкости системы обеспечения непрерывного режима культивирования.



А



В

Рисунок 2.1 Общий вид установки для исследования роста микроводорослей (А) и культивирование *P. purpureum* при различной освещённости фотобиореактора (В)

На верхней площадке расположены ёмкости для питательной среды, компрессор, электромагнитный клапан. В центре верхней площадки сделано отверстие для подвода шлангов с воздухом к фотобиореактору и шлангов с питательной средой к электромагнитному клапану.

Фотобиореактор.

Фотобиореактор представляет собой ёмкость из стекла размером 400×200×50 (плоскопараллельный тип) с рабочей толщиной 50 мм или 20 мм, т. е. выполняется условие перпендикулярности вектора светового потока к поверхности 400×200. Рабочий объём реактора

– 3 или 1 л. Нижняя грань сделана под углом 25 градусов с целью улучшения перемешивания суспензии. Сверху фотобиореактор закрывается крышкой из стекла, в которой имеются 2 отверстия для подачи воздуха и питательной среды. Все стеклянные элементы фотобиореактора склеены аквариумным силиконом.

Система освещения.

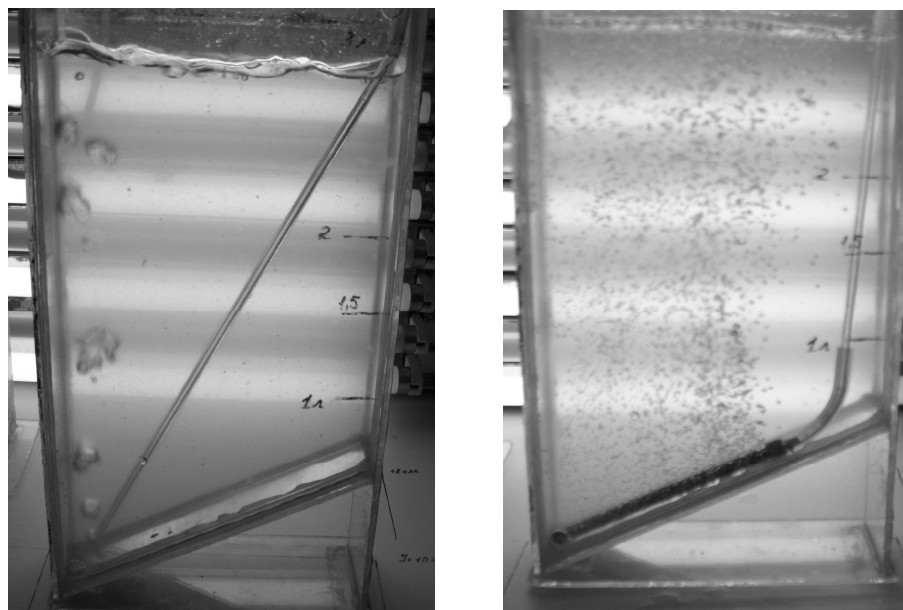
В качестве источника света используется горизонтальная световая решетка, состоящая из 10 ламп дневного света General Electric F18W/54-765. Корпуса ламп симметрично относительно краев закреплены на ламинированную ДВП размерами 900×800. Лист ДВП с помощью захватов закреплён на тыльную сторону металлического каркаса. Средняя освещённость на поверхности фотобиореакторов составляет 10 клк на расстоянии 10 см от ламп. Интенсивность поверхностной радиации можно регулировать, изменяя расстояние между лампами и реактором.

Система газообеспечения.

Данный элемент установки обеспечивает перемешивание суспензии микроводорослей внутри фотобиореактора для равномерного распределения питательных веществ между клетками, а также подачу в фотобиореактор углекислого газа и вынос кислорода. Основным элементом системы является аквариумный компрессор типа CR-40R или аналог с двумя выходами, производительностью 2 – 4 л/мин. С помощью гибкого силиконового шланга диаметром 5 мм и стеклянного капилляра воздух подается в нижнюю часть фотобиореактора. Снабжение культуры микроводорослей углеродом осуществлялось с помощью 3 % газовоздушной смеси. Повышение скорости растворения углекислоты воздуха в питательной среде в результате увеличения поверхности соприкосновения фаз "воздух - жидкая среда" позволяет выращивать микроводоросли без дополнительного внесения CO₂. Экспериментально установлено, что наиболее эффективный барботаж культуры осуществляется через аквариумный распылитель воздуха, представляющий собой пластиковую трубку длиной 15 см, диаметром 5 мм, с отверстиями размером не более 0,1 мм, выполненных в количестве 50 шт. на 1 см длины (см. рис. 2.2).

Система термостабилизации.

Фотобиореактор оснащен системой охлаждения (водяной рубашкой) размерами 400×200×10. Во избежание образования воздушных пробок и пузырей внутри рубашки водяной ток направляется снизу вверх. Увеличение либо уменьшение скорости протока воды через водяную рубашку позволяет поддерживать температуру в фотореакторе на заданном уровне.



А

Б

Рисунок 2.2 Общий вид фотобиореактора: А – барботаж с использованием стеклянного капилляра, Б – аквариумного распылителя воздуха

2.2 Альгобиотехнологический модуль

Культивирование микроводорослей в условиях естественного освещения осуществлялось в альгобиотехнологическом модуле, расположенном в г. Севастополь на территории РБК ФИЦ ИнБЮМ. Модуль выполнен на базе многоцелевой оцинкованной конструкции «Урожай-Абсолют», покрытой сотовым поликарбонатом 4 мм. Размеры модуля 4 м на 3 м, высота в верхней точке арки 2,5 м. По центру выполнен технологический проход шириной 1 м, по обеим сторонам которого находятся прямоугольные бассейны глубиной 10 см. Модуль электрифицирован 220 В, подведена морская и пресная вода. Каркас каждого бассейна изготовлен из необрезной доски шириной 150 мм, бассейны выстелены полиэтиленовой плёнкой. Перемешивание культуры микроводорослей осуществлялось аквариумной помпой Barbus pump (400 л/ч). Модуль оснащён баллоном с углекислотой (см. рис. 2.3).

Модуль оборудован автоматической системой контроля освещённости и температуры [138]. Датчик разработан на базе платформы Arduino Nano. Платформа может получать питание через USB-подключение или от регулируемого 6 – 20 В внешнего источника. В нашей схеме для стабильной работы Arduino Nano использовался импульсный понижающий регулируемый стабилизатор постоянного напряжения DC-DC LM2596. Запись данных, полученных с аналоговых входов датчика, осуществлялась в текстовый файл на 2 Gb SD-карту памяти. Основным элементом датчика являлся CdS-фоторезистор GL12516. Отметим, что максимум

поглощения световой энергии приходился в зелёную область спектра, что имеет значение при записи освещённости в области ФАР. Калибровка датчика выполнялась по люксметру Ю-116.



А

В

Рисунок 2.3 Альгобиотехнологический модуль для полупромышленного выращивания микроводорослей, расположенный на базе радиобиологического корпуса ФИЦ ИнБЮМ (А), Бассейны с культурой *D. salina* в зелёной и желтой форме (В)

2.3 Приборы и измеряемые величины

В экспериментах проводили измерение температуры, освещённости, рН, оптической плотности, хлорофилла *a*, фикоэритрина, общего белка, а также сырого и сухого веса (СВ). Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в фотобиореакторе или автоматическим датчиком при работе в альгобиотехнологическом модуле. Абсолютная погрешность измерений температуры не превышала 0,5°C. Освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116, облучённость – квантометром LI-250А. Сырой и сухой вес определяли на весах Sartirous L220S. Пробы сушили при температуре 60°C, для определения абсолютно сухого веса и доли воды в воздушно сухой биомассе – при 105°C. Отбор проб проводили из разных точек внутри фотобиореактора или бассейна. В средней пробе после перемешивания определяли оптическую плотность и рН с помощью иономера И-160М с электродом ЭСК-43-07, погрешность измерений составляла 0,01 единицы рН. Оптическую плотность измеряли в 0,5 см кюветах на фотометре UNICO-2100 (United Products & Instruments, USA) при длине волны 750 нм, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1 %. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить ошибку измерения оптической плотности культуры, связанную со светорассеянием. При пересчёте единиц оптической плотности на сухую биомассу (СВ) для *D. salina* использовали эмпирический коэффициент 0,78 [25], для *A. platensis* – 1 [27], для *Ph. tricornutum* и *P. purpureum* – 0,55 и 1,4 соответственно (см. рисунок 2.4).

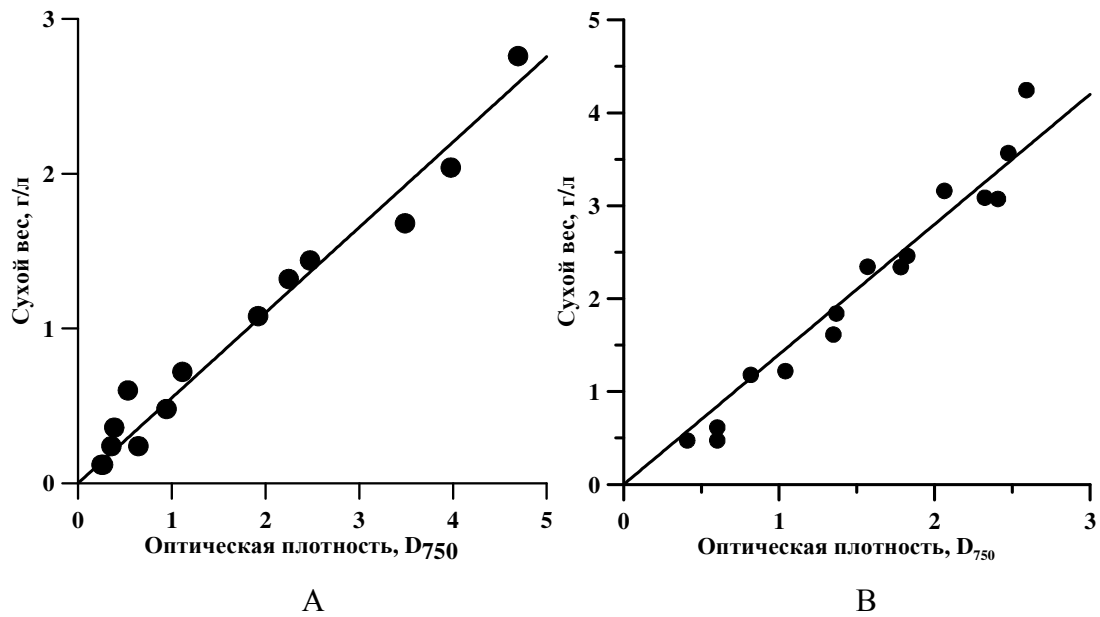


Рисунок 2.4 Линейная зависимость между сухим весом и оптической плотностью D₇₅₀ культур *Ph. tricornutum* (A) и *P. purpureum* (B)

Количественное определение содержания пигментов и белка проводили согласно стандартным методикам [212]: хлорофиллы и каротиноиды экстрагировали из клеток 100 % ацетоном, В-фикоэритрин – дистиллированной водой после пятикратной заморозки/разморозки сырой биомассы, общий белок – по методу Лоури. Спектры экстрактов регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Санкт-Петербург, Россия) в диапазоне длин волн 400-800 нм с шагом 0,1 нм. Расчёт концентраций пигментов выполняли по коэффициентам экстинкции, предложенным [33, 210]. Измерения проводили в трёх – пяти повторностях с последующей статистической обработкой результатов. Рассчитывались коэффициент вариации, доверительный интервал для среднего и относительная погрешность для надёжности 95 %.

Спектры поглощения нативной культуры регистрировались в 1 см кюветах в диапазоне от 400 до 800 нм с шагом 0,5 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 (Perkin Elmer, Индия), оснащённый интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO₄), кювета располагалась непосредственно перед ИС.

Обработку полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Libre Office. Верификацию моделей и расчёт параметров выполняли в программе SciDavis и Grapher.

ГЛАВА 3

ДИНАМИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РОСТА НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В главе рассмотрена группа динамических 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 [29]. 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 кривой. С другой стороны, при моделировании накопительной кривой необходимо учитывать возможную смену лимитирующего фактора, что вынуждает к делению кривой на большее количество фаз роста. Поэтому применение ломаных для каждой фазы позволяет снизить неточности при описании данных и значительно упростить математический аппарат [1].

3.1 Моделирование динамики плотности накопительной культуры

Рассмотрим простейшие модели динамики плотности культуры микроводорослей. В литературе термин "накопительная кривая" является общепринятым. Обычно под этим термином понимается графическое отображение динамики плотности накопительной культуры. Термин "накопительная культура" также широко используется в современной биологической литературе. Но, несмотря на широкое употребление этого термина, на сегодняшний день у него нет чёткого определения. Обычно под накопительной культурой понимается накопление биомассы микроорганизмов в отсутствие потока (добавления) питательной среды, т. е. термодинамически закрытая (замкнутая) система [7, 50]. Если рост культуры лимитирован биогенным элементом, находящимся в питательной среде в ограниченном количестве, и с течением роста концентрация лимитирующего биогенного элемента в среде уменьшается (не добавляется извне), в таком случае накопительная культура является непроточной. Если рост культуры лимитирован биогенным элементом, который непрерывно подается в культуру,

например, углекислый газ, в таком случае накопительная культура является непропорционально-проточной по данному лимитирующему субстрату.

Фундаментальным свойством живых систем является способность к самовоспроизведению [21]. Живые организмы способны к увеличению своей биомассы (размножению) только при определённых физиологических и физико-химических условиях. Количественной характеристикой воспроизводства популяции микроорганизмов является скорость роста числа клеток или продуктивность. Поскольку в процессе деления живые клетки способны к производству новых клеток, величина скорости роста числа клеток будет прямо пропорциональна их количеству, а продуктивность – биомассе:

$$\frac{dN}{dt} \sim N, \quad \frac{dB}{dt} \sim B,$$

где N – число клеток, B – биомасса.

Опираясь на это положение, можно получить закон экспоненциального роста популяции, который впервые сформулировал Т. Мальтус в работе [227]. Математическая запись этого закона имеет вид:

$$B(t) = B_0 \cdot e^{\mu \cdot t}, \quad (3.1)$$

где B_0 – биомасса в начальный момент времени $t = 0$; μ – постоянный коэффициент, биологический смысл которого отражает меру самовоспроизводства популяции. Этот коэффициент является удобным критерием для сравнения скоростей роста культуры микроорганизмов разной плотности в различных условиях. В литературе этот коэффициент называется относительной или удельной скоростью роста [153].

Запись закона Мальтуса в экспоненциальной форме (3.1) является наиболее распространённой. Однако для тех случаев, когда популяцию рассматривают как совокупность отдельных клеток, которые синхронно делятся, тогда зависимость численности клеток от времени записывается в показательной форме [130]:

$$N(t) = N_0 \cdot a^t,$$

где a – число дочерних клеток, на которое делится материнская клетка.

Из выражения (3.1) следует, что при $\mu = const$ динамика плотности культуры подчинена закону экспоненциального роста. В таких случаях принято считать, что рост популяции неограничен внешними условиями, ограничение скорости роста проявляется только на уровне организации узкого места метаболизма потоком энергетического субстрата, необходимого для биосинтеза [114]. Например, у фототрофов величина потока макроэргических соединений (АТФ) обусловлена световыми условиями, у гетеротрофов – потоком окисляемого или восстанавливаемого субстрата, который используется для синтеза макроэргов. Следовательно,

при изменении внешних условий, после процессов адаптации, величина удельной скорости роста будет принимать новое значение.

Постоянство удельной скорости роста подразумевает постоянство всех относительных скоростей синтеза клеточных компонентов [119]. В таком случае, в экспоненциальной фазе роста биохимический состав биомассы остаётся неизменным. Следует отметить, что на начальных этапах накопительной культуры клетки адаптируются к новым условиям, т. е. происходит изменение биохимического состава. По определению, собственно экспоненциальный рост начинается с момента окончания адаптации клеток к новым условиям [119]. На практике, в связи с наличием ошибки измерения плотности культуры, может наблюдаться так называемый "кажущийся" экспоненциальный рост. При этом наблюдаемая удельная скорость роста постоянна, а биохимический состав клеток не изменяется. Экспоненциальный рост наблюдается на небольших временных интервалах, либо вообще отсутствует [98]. Во многих работах несоответствие экспериментальных данных экспоненциальному росту авторы относят к ошибкам измерений и для повышения точности описания вводят поправочные коэффициенты. Однако в большинстве случаев введение поправочных коэффициентов является чисто математическим приёмом и не отражает биологической сути процессов роста культуры [18].

Основываясь на представлениях о смене лимитирующих факторов и понятии об организации узкого места метаболизма [114], можно утверждать, что отклонение от экспоненциального роста обусловлено ограничением скорости роста внешними условиями. Если накопительная культура – это закрытая система, то лимитирующим фактором является один из биогенных элементов, концентрация которого уменьшается с накоплением биомассы. Если накопительная культура – непропорционально-проточная, открытая система, то скорость роста определятся относительной скоростью протока лимитирующего биогенного элемента, например, количество CO_2 , подаваемого в культуру на единицу биомассы в единицу времени. Для фототрофов также в качестве лимитирующего субстрата может выступать световой поток – с ростом плотности культуры величина средней пространственной облучённости будет уменьшаться [10].

3.1.1. Логистическая функция

Рассмотрим случай лимитирования роста накопительной культуры в закрытой системе одним из биогенных элементов питательной среды [29]. Известно, что для таких условий кривая роста культуры имеет S-образную форму и описывается логистической функцией [107, 244]. Логистическая функция может быть получена из предположения о пропорциональности

величины продуктивности произведению текущей плотности B культуры и концентрации лимитирующего субстрата в околочклеточной среде S [56]:

$$\frac{dB}{dt} = k \cdot B \cdot S, \quad (3.2)$$

где k – константа пропорциональности, которая по сути является произведением энергозависимого коэффициента k_i и некоторого коэффициента связи k_s текущей концентрации субстрата и скорости роста. Следует отметить, что k_i для фототрофов является светозависимой величиной, поэтому при изменении световых условий константа k также может изменяться.

Выражение (3.2) является дифференциальной формой записи динамики субстратзависимого роста популяции в закрытой системе. Чтобы его проинтегрировать необходимо ввести связь текущего значения биомассы и концентрации субстрата. В работе [221] впервые введено представление о связи биомассы и количества поглощённого субстрата, которое в последствии было сформулировано как «конструктивный принцип Либиха». Количественно эту связь выражают в виде экономического коэффициента прироста биомассы [93, 107]. Величина отношения потреблённого клетками субстрата к приросту биомассы в литературе получила название потребности Y_s биомассы в субстрате [35].

$$Y_s = -\frac{S - S_0}{B - B_0}; \quad S = S_0 - Y_s(B - B_0).$$

Экономический коэффициент является обратной величиной потребности в субстрате. С ростом плотности культуры за пределами экспоненциальной фазы роста Y_s является переменной величиной, которая зависит от потока лимитирующего субстрата в узкое место метаболизма, структурной организации клетки и пр. Для непрерывной культуры в стационарных условиях такая зависимость получена экспериментальным путём [173]. Для накопительной культуры зависимость величины потребности от концентрации лимитирующего субстрата неизвестна. Для небольших промежутков времени величину Y_s можно считать неизменной. Тогда запишем:

$$\frac{dB}{dt} = k \cdot B \cdot (S_0 + Y_s \cdot B_0 - Y_s \cdot B).$$

Решение данного уравнения с начальными условиями $t = 0, B = B_0$ имеет вид:

$$B = \frac{S_0 + Y_s \cdot B_0}{Y_s + \frac{S_0}{B_0} \cdot e^{-(S_0 + Y_s \cdot B_0) \cdot k \cdot t}}. \quad (3.3)$$

В отличие от закона экспоненциального роста, последнее выражение имеет предел: при $t \rightarrow \infty$ плотность культуры достигает своего максимального значения B_m .

$$B_m = \frac{S_0 + Y_s \cdot B_0}{Y_s} = \frac{S_0}{Y_s} + B_0.$$

Подставляя значение B_m в (3.3), получаем кривую, носящую название «логистической функции» Ферхюльста-Пирля [273].

$$B = \frac{Y_s \cdot B_m}{Y_s + \frac{S_0}{B_0} \cdot e^{-Y_s \cdot B_m \cdot k \cdot t}} = \frac{B_m}{1 + \frac{S_0}{Y_s \cdot B_0} \cdot e^{-Y_s \cdot B_m \cdot k \cdot t}}. \quad (3.4)$$

Можно показать, что логистическая функция (3.4) имеет точку перегиба, в которой продуктивность максимальна. Действительно, если продифференцировать уравнение (3.4), то значение третьей (нечётной) производной не равно нулю: $B'''(t_p) = -2k \cdot Y_s \neq 0$. Кроме того, важным является то, что в момент времени t_p в этой точке плотность культуры $B(t_p)$ достигает половины максимального значения:

$$t_p = \frac{\ln\left(\frac{S_0}{Y_s B_0}\right)}{Y_s \cdot B_m \cdot k}, \quad B(t_p) = \frac{B_m}{2}.$$

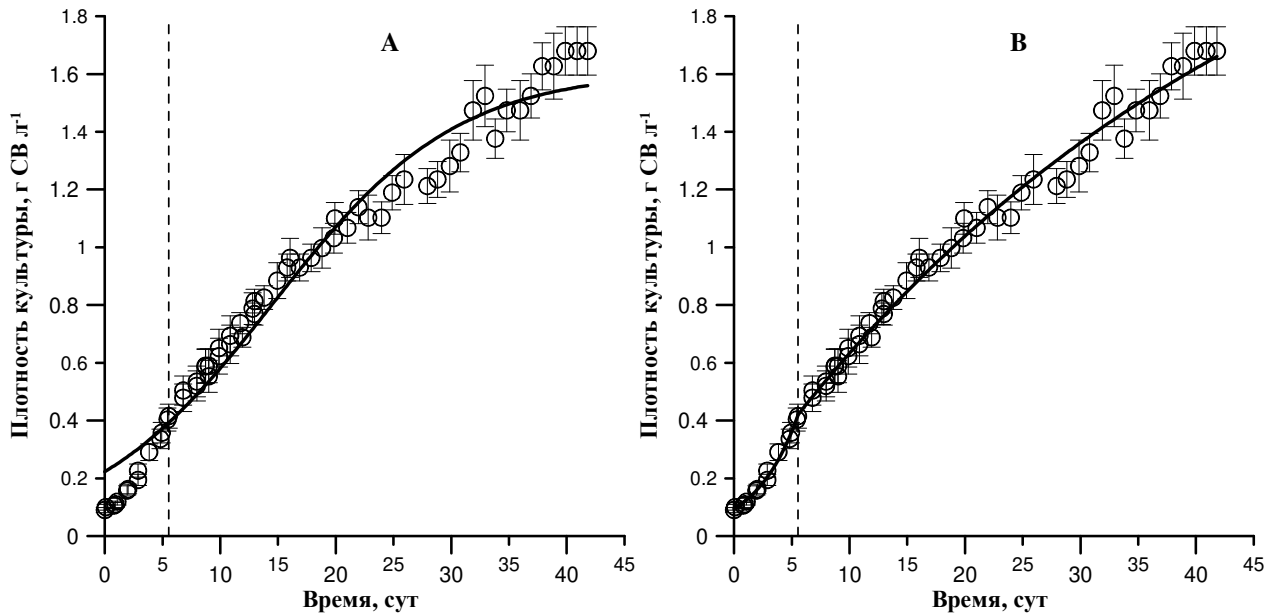


Рисунок 3.1 Ассиметричная накопительная кривая роста культуры *Ph. tricornutum*. А – аппроксимация экспериментальных данных логистической функцией (3.4). В – аппроксимация экспериментальных данных выражениями (3.1) и (3.5). Пунктирная линия указывает на точку перегиба и сопряжения экспоненты с выражением (3.5)

Функция (3.4) характеризуется симметричностью относительно точки перегиба. Однако на практике часто наблюдается несимметричность накопительной кривой (см. рис. 3.1), что в некоторых случаях можно объяснить соотношением значений начальной концентрации

субстрата и начальной плотности культуры. Например, если коэффициент, стоящий перед экспонентой в выражении (3.4), меньше единицы, то накопительная кривая не будет иметь точки перегиба. Следовательно, при таких условиях культура микроорганизмов 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:

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

$$\frac{dB}{dt} = k_s \cdot (S_n - Y_s \cdot (B - B_n)) = k_s \cdot (S_n - Y_s \cdot B + Y_s \cdot B_n),$$

где k_s – константа пропорциональности; S_n, B_n – начальные значения концентрации субстрата и биомассы в среде в момент времени, когда скорость роста становится не пропорциональна плотности культуры.

Экспериментально пропорциональность продуктивности концентрации субстрата подтверждена при исследовании фотосинтеза в работе Блэкмана [152]. Следует отметить, что в данном случае аналогично конструктивному принципу Либиха скорость определяется потоком лимитирующего субстрата, т. е. находящегося в минимуме.

Решение последнего уравнения имеет вид:

$$B = B_i + \frac{S_i}{Y_s} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot Y_s \cdot (t - t_i)}). \quad (3.5)$$

При $t \rightarrow \infty$, плотность культуры стремится к своему максимальному значению $B \rightarrow B_m$:

$$B_m = B_i + \frac{S_i}{Y_s}.$$

Выражение для B_m аналогично выражению для максимальной плотности при анализе логистической кривой. Анализ выражения (3.5) показывает, что данная функция монотонно возрастает, асимптотически приближаясь к B_m , и в отличие от логистической кривой не имеет точки перегиба.

В итоге, для описания динамики биомассы в накопительной культуре в закрытой системе может использоваться несколько моделей, которые применимы для описания только части накопительной кривой (одной из фаз роста) в закрытой системе. Даже логистическая функция, которую формально можно использовать для описания всей накопительной кривой в закрытой системе (см. рис. 3.1 А), в связи с непостоянством биохимического состава клеток, не применима для описания всей S-образной кривой, поскольку при выводе уравнения (3.4)

сделано допущение о постоянстве величины Y_s потребности клеток в субстрате, т. е. неизменности биохимического состава клеток. Но такое допущение верно только для условий нелимитированного роста.

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. В частности, потери биомассы могут происходить из-за гибели клеток, потерь клеточных структур при делении клеток, процессов темнового дыхания, выделения экзометаболитов и т. д. 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:

$$\mu(S) = \begin{cases} \mu_0 - \mu_r, S \geq K \\ \frac{\mu_0}{K} \cdot S - \mu_r, S < K \end{cases} \quad (3.6)$$

где μ_0 – максимальная удельная скорость синтеза биомассы, μ_r – удельная скорость потерь биомассы, K – константа насыщения.

Из (3.6) следует, что при постоянстве удельных скоростей синтеза и потерь, а также $S \geq K$ культура будет расти согласно экспоненциальному закону Мальтуса. Экспериментально доказано, что такой рост может продолжаться лишь ограниченный промежуток времени, который получил название «фазы экспоненциального роста». По её окончании, культура перейдёт в фазу замедления роста, при этом скорость роста будет зависеть от концентрации лимитирующего субстрата в культуральной среде. Кроме того, для малых концентраций субстрата ($S < K$), углы наклона всех классических кинетических моделей субстратзависимого роста близки [68].

Рассмотрим случай лимитирования роста культуры микроводорослей субстратом S ($S < K$):

$$\mu = \frac{\mu_0}{K} \cdot S - \mu_r. \quad (3.7)$$

В выражении (3.7) максимальную удельную скорость синтеза, удельную скорость потерь биомассы и константу насыщения будем считать постоянными видоспецифичными коэффициентами, которые можно определить экспериментально. Таким образом, при уменьшении концентрации лимитирующего субстрата в среде, удельная скорость роста линейно снижается.

Продифференцируем уравнение (3.7) по времени:

$$\frac{d\mu}{dt} = \frac{\mu_0}{K} \cdot \frac{dS}{dt}.$$

По определению, удельная скорость есть скорость роста единицы биомассы:

$$\mu = \frac{1}{B} \cdot \frac{dB}{dt}.$$

Теперь производная от удельной скорости роста по времени примет вид:

$$\frac{d\mu}{dt} = \frac{1}{B} \cdot \frac{d^2 B}{dt^2} - \frac{1}{B^2} \cdot \left(\frac{dB}{dt} \right)^2. \quad (3.8)$$

Для получения искомого решения биомассы от времени в уравнение (3.8) необходимо записать значение скорости изменения концентрации лимитирующего субстрата dS/dt . Будем считать, что скорость изменения концентрации лимитирующего субстрата в среде прямо пропорциональна скорости синтеза биомассы:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_s^0 \cdot \frac{dB_s}{dt}, \quad (3.9)$$

где Y_s^0 – истинная потребность клеток в лимитирующем субстрате – количество лимитирующего субстрата необходимое для синтеза единицы биомассы. При дальнейших расчётах будем считать значение истинной потребности величиной постоянной. Такое предположение является довольно упрощённым, так как известно, что при лимитировании роста культуры микроводорослей одним из биогенных элементов происходит изменение биохимического состава клеток [192, 194, 267]. Однако в том случае, если клетки микроводорослей адаптированы к малым концентрациям субстрата, то значительного изменения биохимического состава культуры не происходит.

По определению, скорость синтеза биомассы можно выразить через удельную скорость синтеза μ_s . В условиях поставленной задачи, удельная скорость синтеза биомассы будет изменяться, так как мы имеем дело с лимитированным ростом:

$$\frac{dB_s}{dt} = (\mu + \mu_r) \cdot B.$$

Балансовое уравнение (3.9) запишем в виде:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -Y_s^0 \cdot (\mu + \mu_r) \cdot B, \\ \frac{dS}{dt} &= -Y_s^0 \cdot \mu \cdot B - Y_s^0 \cdot \mu_r \cdot B, \\ \frac{dS}{dt} &= -Y_s^0 \cdot \frac{dB}{dt} - Y_s^0 \cdot \mu_r \cdot B. \end{aligned} \quad (3.10)$$

Подставляя выражения (3.8) и (3.10) в (3.7), получим дифференциальное уравнение зависимости плотности культуры от времени:

$$B \cdot \frac{d^2 B}{dt^2} - \left(\frac{dB}{dt} \right)^2 + \gamma \cdot \frac{dB}{dt} \cdot B^2 + \gamma \cdot \mu_r \cdot B^3 = 0, \quad (3.11)$$

где $\gamma = \frac{\mu_0 \cdot Y_s^0}{K}$.

Для решения данного уравнения необходимо произвести замену:

$$\frac{dB}{dt} = P. \quad (3.12)$$

По сути, последнее уравнение есть запись выражения для продуктивности (абсолютной скорости роста). Для нахождения второй производной по биомассе, продифференцируем (3.12) и подставим в (3.11):

$$\frac{dP}{dB} = \frac{P}{B} - \gamma \cdot B - \gamma \cdot \mu_r \cdot \frac{B^2}{P}.$$

Первое слагаемое правой части последнего выражения есть удельная скорость роста:

$$\mu = \frac{P}{B},$$

$$P = \mu \cdot B,$$

$$\frac{dP}{dB} = \mu + B \cdot \frac{d\mu}{dB}.$$

Подставим:

$$\mu + B \cdot \frac{d\mu}{dB} = \mu - \gamma \cdot B - \gamma \cdot \mu_r \cdot B \cdot \frac{1}{\mu},$$

Разделяя переменные, интегрируем при начальных условиях $\mu = \mu_m$, $B = B_k$:

$$B = B_k - \frac{\mu}{\gamma} + \frac{\mu_m}{\gamma} + \frac{\mu_r}{\gamma} \cdot \ln \left(\frac{\mu + \mu_r}{\mu_0} \right).$$

Рассмотрим граничное условие: при достижении культурой стационарной фазы роста, удельная скорость роста будет равняться нулю, а биомасса достигнет своего максимального значения $B = B_{st}$:

$$B = B_m - \frac{\mu}{\gamma} - \frac{\mu_r}{\gamma} \cdot \ln \left(1 - \frac{\mu}{\mu + \mu_r} \right). \quad (3.13)$$

Для нахождения искомого решения зависимости биомассы от времени необходимо произвести обратные замены в (3.13) с последующим интегрированием полученных выражений. Однако зависимость (3.13) является трансцендентным уравнением, решение которого нельзя выразить в аналитическом виде, поэтому разложим (3.13) в ряд Тейлора в окрестностях нуля:

$$\ln\left(1 - \frac{\mu}{\mu + \mu_r}\right) = -\frac{\mu}{\mu_r} + \frac{\mu^2}{2 \cdot \mu_r^2} - \dots$$

$$B = B_m - \frac{\mu}{\gamma} - \frac{\mu_r}{\gamma} \cdot \left(-\frac{\mu}{\mu_r} + \frac{\mu^2}{2 \cdot \mu_r^2}\right) = B_m - \frac{\mu^2}{2 \cdot \gamma \cdot \mu_r}.$$

Выразим удельную скорость роста из последнего выражения:

$$\mu = \sqrt{2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_s^0}{K} \cdot \mu_r \cdot (B_{st} - B)}. \quad (3.14)$$

Уравнение (3.14) применимо в случае лимитирования роста накопительной культуры микроводорослей одним из минеральных невозвратных компонентов питательной среды, причём диапазон изменения плотности культуры составляет от B_K до B_{st} , а удельной скорости роста – от μ_m до 0. Уравнение (3.14) показывает, что при лимитировании роста культуры удельная скорость роста уменьшается пропорционально корню квадратному от биомассы. На рисунке 3.2 представлены типовые теоретические кривые зависимости удельной скорости роста от биомассы по (3.14) при различных значениях коэффициента истинной потребности. Значения неизвестных коэффициентов получены из работы [40], считая, что фаза лимитирования роста спирулины азотом началась с момента начала эксперимента. Величину удельной скорости потерь биомассы будем считать равной $0,1 \text{ сут}^{-1}$.

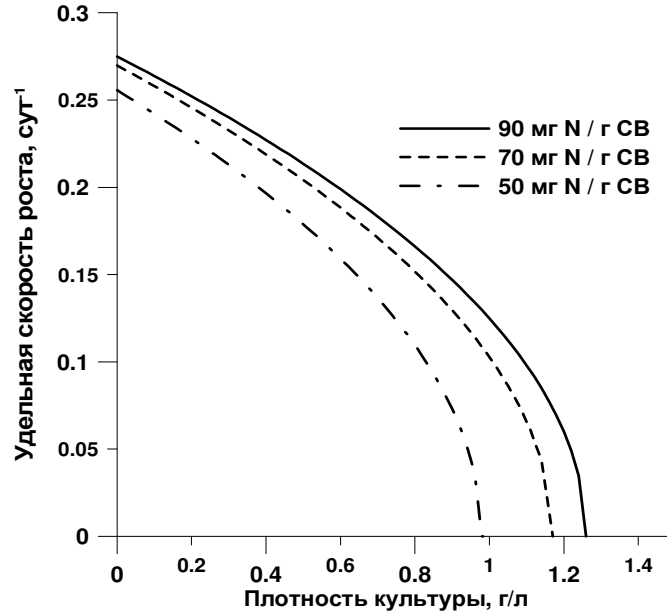


Рисунок 3.2 Теоретические кривые зависимости удельной скорости роста от плотности культуры согласно (3.14) при различных величинах коэффициента истинной потребности

Приведённые графики показывают, что при увеличении истинной потребности клеток микроводорослей в лимитирующем биогенном элементе, удельная скорость роста культуры достигает нулевого значения при меньших величинах стационарной плотности накопительной

культуры. Подобные кривые зависимости удельной скорости роста от величины биомассы часто наблюдаются экспериментально. Например, на рисунке 3.3 представлена зависимость удельной скорости роста спирулины от плотности культуры по тем же данным [40].

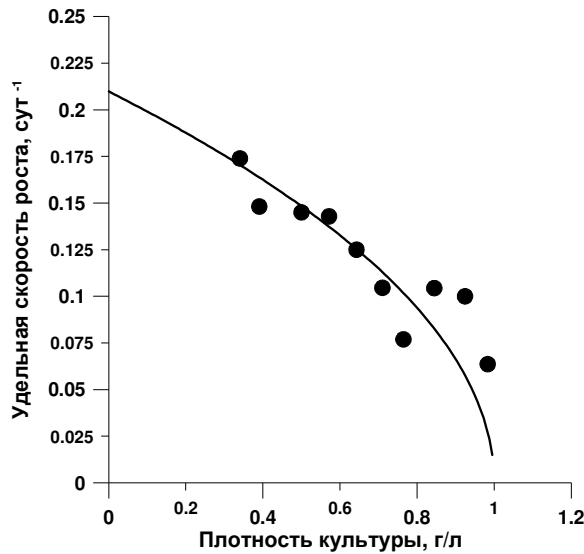


Рисунок 3.3 Зависимость удельной скорости роста от плотности культуры по данным [40] при лимитировании роста нитратным азотом. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (3.14)

Стоит отметить высокое соответствие теоретической кривой (3.14) и экспериментальных данных ($R^2 = 0,9$). Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (3.14) позволила определить обобщённый коэффициент подкоренного выражения, с помощью которого можно рассчитать значение коэффициента истинной потребности спирулины в азоте при известных μ_0 и $K = 50$ мг N/ г СВ.

Для определения зависимости продуктивности от плотности культуры необходимо выполнить обратную подстановку, получаем уравнение для скорости роста:

$$P = \mu \cdot B = B \cdot \sqrt{2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_s^0}{K} \cdot \mu_r \cdot (B_{st} - B)} . \quad (3.15)$$

Уравнение (3.15) показывает зависимость абсолютной скорости роста культуры от величины её плотности. На рисунке 3.4 данная зависимость представлена графически для различных значений коэффициента истинной потребности. При увеличении Y_s^0 мы наблюдаем более высокую максимальную продуктивность. Как и в случае с удельной скоростью роста (3.15) применимо только на участке лимитирования роста минеральным субстратом, причём диапазон изменения плотности культуры от B_K до B_{st} , а продуктивности от $\mu_m \cdot B_K$ до 0.

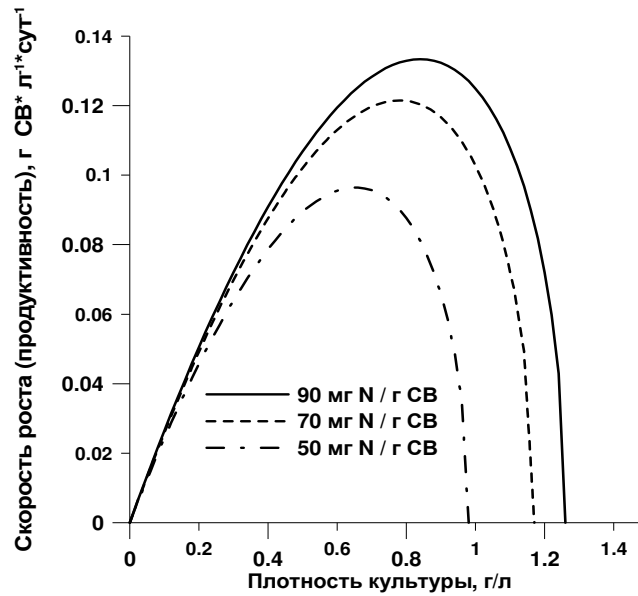


Рисунок 3.4 Теоретические кривые зависимости скорости роста от плотности культуры по уравнению (3.15) при различных величинах коэффициента истинной потребности

Теперь можно записать дифференциальное уравнение, описывающее изменение биомассы во времени:

$$\frac{dB}{dt} = B \cdot \sqrt{2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_s^0}{K} \cdot \mu_r \cdot (B_{st} - B)}.$$

Решение последнего уравнения с учетом двух обобщённых коэффициентов:

$$K_B = \operatorname{arcth} \left(\sqrt{\frac{B_{st} - B_K}{B_{st}}} \right), a_1 = 2 \cdot \frac{\mu_0 \cdot Y_s^0}{K} \cdot \mu_r \cdot B_{st}$$

можно записать в виде:

$$B = B_{st} - B_{st} \cdot \operatorname{th} \left(K_B - \frac{\sqrt{a_1}}{2} (t - t_K) \right)^2. \quad (3.16)$$

Уравнение (3.16) применимо для описания динамики плотности культур микроводорослей (в диапазоне от B_K до B_{st}) при лимитировании их роста пластическим субстратом, доля возврата которого в биосинтетические процессы близка нулю, либо время возврата достаточно велико. Например, таким пластическим субстратом может выступать минеральный азот в нитратной форме. На рисунке 3.5 представлены типовые теоретические кривые зависимости плотности культуры от времени для различных значений коэффициента истинной потребности. Анализируя рисунок 3.5, мы видим, что в соответствии с предложенной моделью и её математической записью в виде уравнения (3.16), плотность накопительной культуры увеличивается до максимального значения. Это обусловлено тем, что концентрация

лимитирующего субстрата достигает компенсационного значения $S_K = \mu_r \cdot K / \mu_0$, при этом наблюдаемая скорость роста равна нулю.

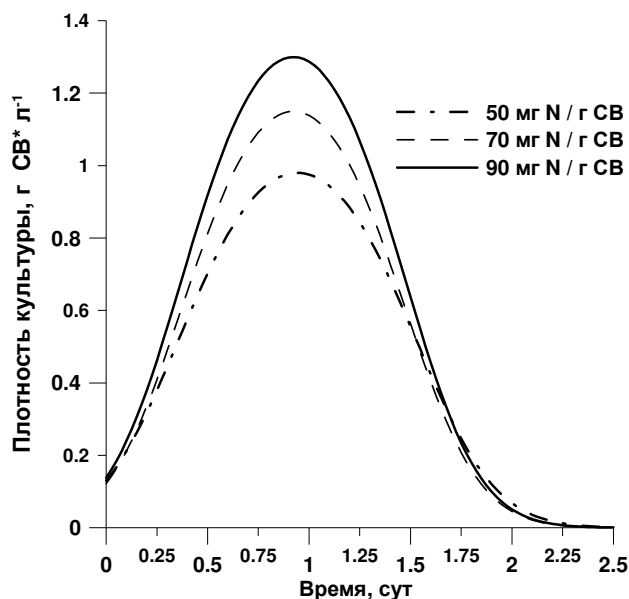


Рисунок 3.5 Теоретические кривые динамики плотности культуры микроводорослей по уравнению (3.16) при различных величинах коэффициента истинной потребности

В следующий момент времени процессы деструкции биомассы преобладают над синтезом, что приводит к снижению плотности культуры. Культура переходит в фазу отмирания, что на графике представлено уменьшением биомассы вплоть до нулевого значения. Однако предлагаемая модель базируется на предположении о полной потере субстрата, который выделяется из распавшейся биомассы. В случае если происходит возврат лимитирующего субстрата, на фазе отмирания будут наблюдаться колебания плотности культуры, период которых определяется временем возврата, а предложенная модель не применима.

Полученная модель (3.16) применена при описании экспериментальных данных роста культуры *A. platensis* в условиях лимитирования азотом. В опытном варианте содержание азота было уменьшено в 2 раза по сравнению с контрольным. Полученные результаты представлены на рисунке 3.6. Можно отметить высокое соответствие предлагаемой модели с реальными экспериментальными данными ($R^2 = 0,93$). Кроме того, уравнения экспоненциальной фазы и фазы лимитирования (3.16) 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 (в данном случае азота) снижается до константы насыщения K . Именно в области этой концентрации уравнение зависимости $\mu(S)$ в виде ломанной хуже всего описывает экспериментальные данные. При переходе культуры из экспоненциальной в фазу лимитирования роста происходят изменения биохимического состава

клеток микроводорослей. Для корректного описания динамики плотности культуры микроорганизмов необходимо учитывать способ подачи лимитирующего субстрата в культуру, а также моменты смены лимитирующих факторов на накопительной кривой. Если накопительная кривая имеет точку перегиба, то кривую следует разбить на два участка: фаза ускорения роста и фаза замедления роста [68].

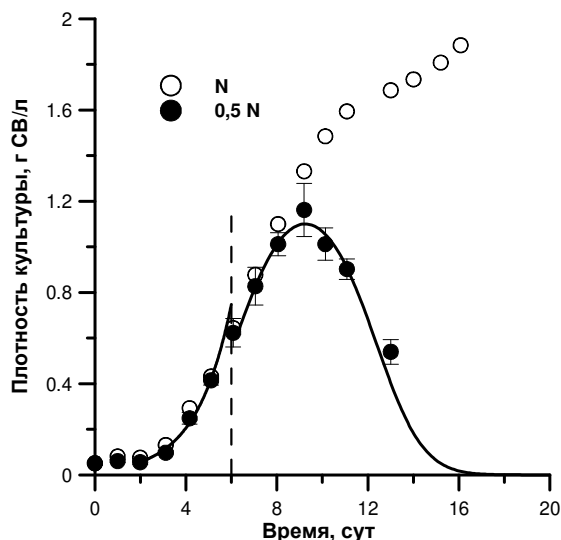


Рисунок 3.6 Накопительные кривые роста культуры *A. platensis* при различном начальном содержании нитратного азота в среде. Аппроксимация фазы замедления роста уравнением (3.16). Пунктирная линия – момент начала лимитирования роста азотом

Для описания фазы ускорения роста в закрытой системе используется экспоненциальная зависимость (3.1). В точке перегиба накопительной кривой продуктивность культуры достигает своего максимального значения. Затем, продуктивность начинает снижаться, т. е. культура переходит в фазу замедления роста. Снижение продуктивности обусловлено истощением лимитирующего субстрата из среды. По аналогии с фазой ускорения роста после точки перегиба динамику плотности культуры в пределах величины ошибки измерения можно описать либо логистической функцией, либо функцией (3.16). При определённых внешних условиях на накопительной кривой может отсутствовать экспоненциальная фаза роста, что свидетельствует о лимитировании роста с начального момента времени, т. е. с этого момента времени начинается фаза замедления роста, которая описывается уравнением (3.16).

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 [67]. В стационарной фазе наблюдаемая продуктивность равна

нулю, при этом клетки микроводорослей способны накапливать ценные биологически активные вещества: углеводы, липиды, экзометаболиты и т. д. [194]. При промышленном культивировании микроводорослей в условиях естественного освещения необходима реализация максимальных скоростей роста. На практике не всегда возможно обеспечить оптимальные условия, вследствие чего культура переходит в стационарную фазу роста. Для максимизации скоростей роста и биосинтеза в альгобиотехнологии применяют квазинепрерывный метод культивирования [116]. Однако даже в этих условиях культура может переходить в стационарную фазу роста между двумя последовательными процедурами обмена среды.

На рисунке 3.7 представлена накопительная кривая роста *Ph. tricornutum* и динамика pH культуральной среды. Стационарная фаза роста характеризовалась постоянством плотности с небольшими отклонениями от среднего значения в пределах ошибки измерения. Обычно при переходе культуры в стационарную фазу роста в качестве лимитирующего фактора выступает концентрация биогенных элементов в питательной среде. Для плотных культур в качестве лимитирующего субстрата может выступать энергетический световой поток [220]. Находясь в стационарной фазе роста (рис. 3.7 А), культура была лимитирована именно светом, поскольку при увеличении облучённости клеток на пятидесятые сутки биомасса перешла на новый стационарный уровень.

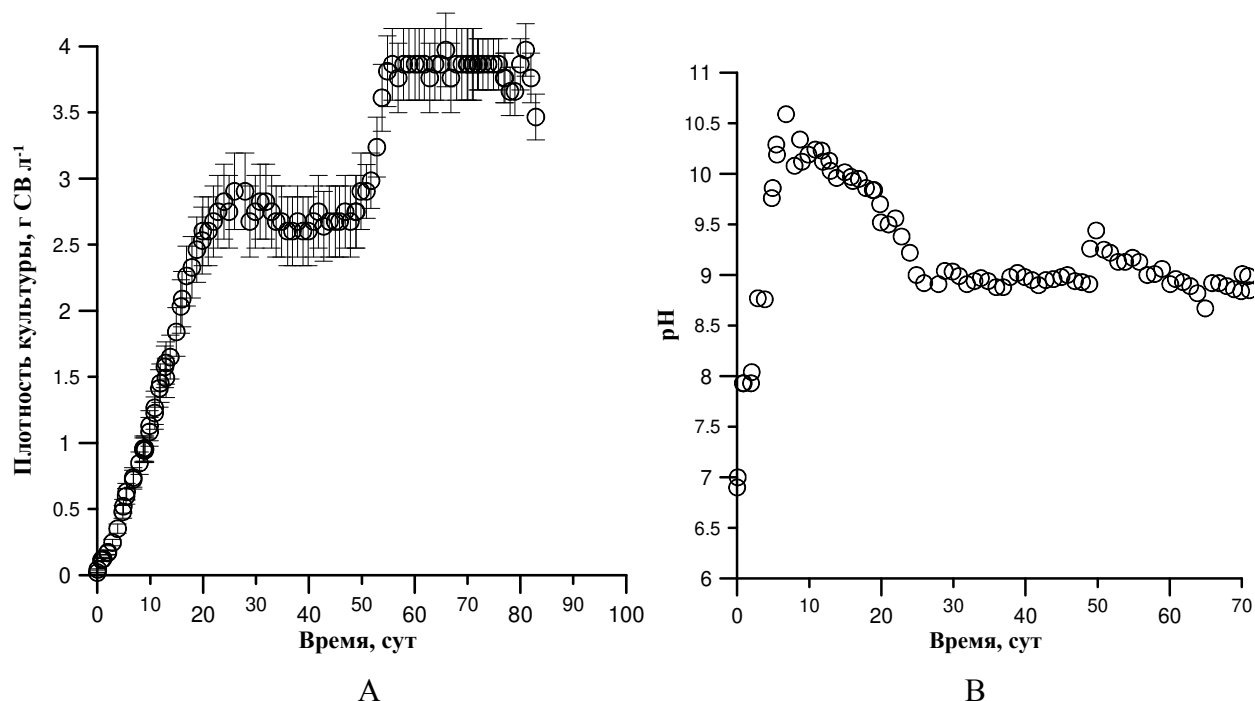


Рисунок 3.7 Динамика плотности накопительной культуры *Ph. tricornutum* (А) и pH культуральной среды (В)

Неизменность плотности культуры в стационарной фазе роста подтверждается неизменностью значений pH культуральной среды (рис. 3.7 В). Представленные экспериментальные результаты являются классическим примером наличия продолжительной стационарной фазы роста у накопительной культуры микроводорослей. Однако для многих видов микроводорослей величина биомассы при достижении значений, близких к максимальному, может изменяться в широком диапазоне. Например, на рисунке 3.8 приведена накопительная кривая и динамика pH при культивировании *A. platensis*. Стационарная фаза роста была непродолжительной. На 8 сутки отмечалось статистически достоверное снижение плотности культуры, с последующим восстановлением до первоначального значения, т. е. наблюдались колебания плотности и pH среды (рис. 3.8). При достижении максимальной плотности величина pH среды достигла 12 единиц. Известно, что при таких значениях pH в среде практически отсутствуют доступные для ассимиляции клетками гидрокарбонат-ионы [17]. Следовательно, скорость биосинтеза была лимитирована наличием доступных источников углерода в среде. В отличие от эксперимента с *Ph. tricornutum*, в данных условиях отсутствовал внешний приток углерода в форме углекислого газа. Следовательно, по углероду система культивирования *A. platensis* являлась закрытой [67]. Сравнивая рисунок 3.8 А и 3.8 В, можно сделать заключение о синфазности колебаний плотности культуры и величины pH. Таким образом, периодическое изменение pH свидетельствует о наличии колебаний плотности культуры. Экспериментально показано (см. рисунок 3.9), что колебания плотности являются затухающими и могут быть достаточно продолжительными.

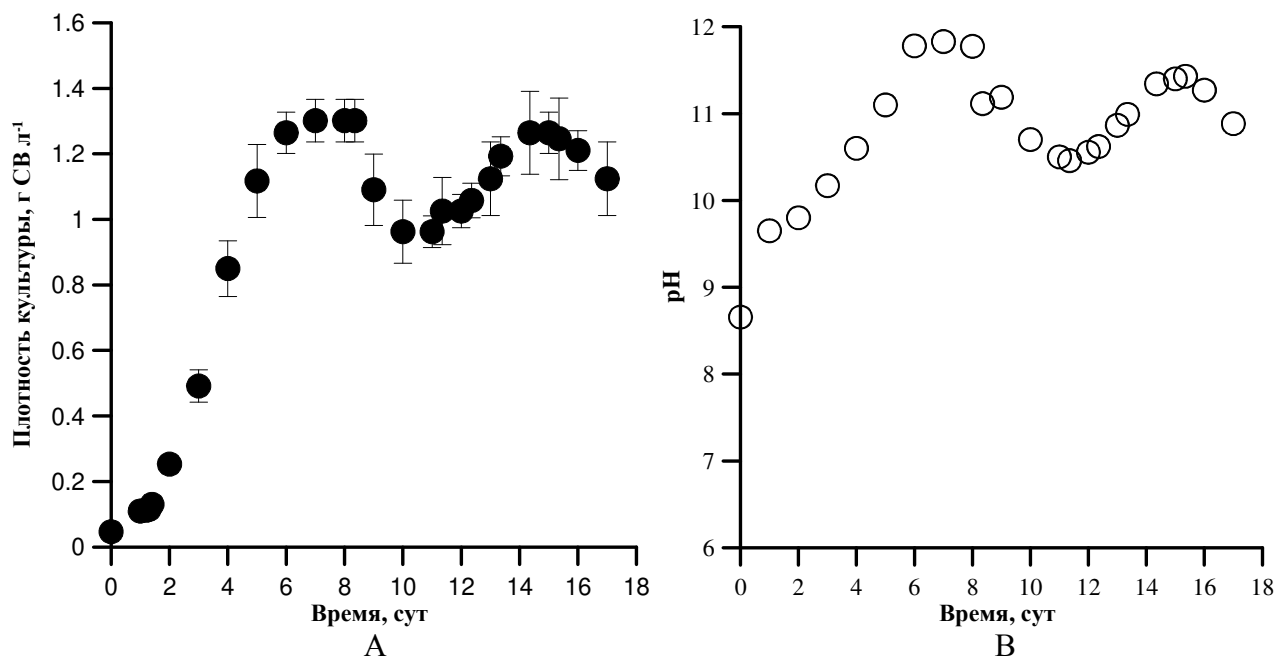


Рисунок 3.8 Динамика плотности накопительной культуры *A. platensis* (А) и pH культуральной среды (В)

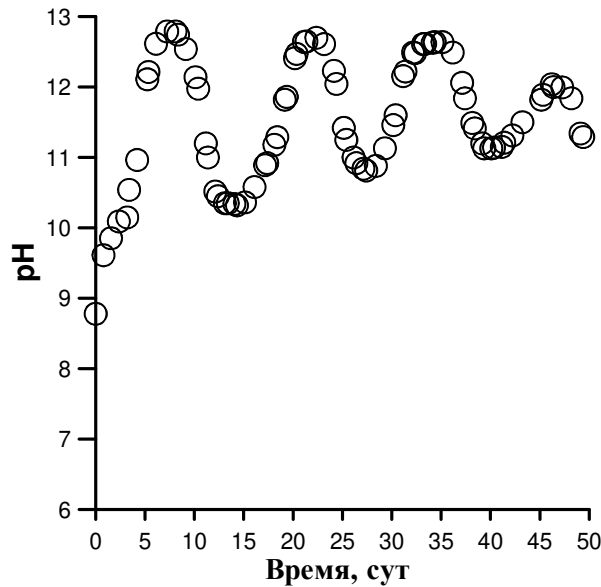


Рисунок 3.9 Динамика pH среды накопительной культуры *A. platensis*

В биологии известны примеры колебаний различных систем: на популяционном уровне классическим примером является модель «хищник–жертва»; на клеточном уровне введено понятие инерционности биосинтеза, посредством которого объясняются колебания плотности микроорганизмов в хемостате [60]; на молекулярном уровне описаны периодические процессы изменения концентрации веществ в клетках в циклах Кальвина, Кребса [99] и пр. Однако объяснение механизмов и математическое описание колебательных процессов в плотных культурах микроводорослей в литературе не встречается. Возможно, это связано с тем, что использование разработанного в прошлом веке понятийного аппарата субстратзависимого роста не позволяет достаточно точно описать динамику роста в накопительной культуре. Опираясь на понятия: биомасса (B), концентрация лимитирующего субстрата (S), потребность (Y_s), удельная скорость дыхания (μ_R), динамику роста в закрытой системе можно описать системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = k_s \cdot S - \mu_R \cdot B \\ \frac{dS}{dt} = -Y_s \cdot k_s \cdot S + \alpha \cdot Y_s \cdot \mu_R \cdot B, \end{cases} \quad (3.17)$$

где α – коэффициент возврата субстрата из распавшейся биомассы.

Данная система сводится к дифференциальному уравнению второго порядка, корни характеристического уравнения которого равны:

$$\lambda_{1,2} = -\frac{\mu_R + Y_s \cdot k_s}{2} \pm \sqrt{\frac{(\mu_R - Y_s \cdot k_s)^2 + 4 \cdot \alpha \cdot Y_s \cdot k_s \cdot \mu_R}{4}}.$$

Подкоренное выражение положительно всегда, поэтому корни – действительные, следовательно, конечное решение не может быть выражено с помощью периодических

функций. Таким образом, система (3.17) не описывает колебательные процессы в плотных культурах микроводорослей, но позволяет объяснить продолжительную стационарную фазу роста. Остается невыясненным вопрос о природе подобных процессов, являются ли периодические изменения плотности вынужденными или автоколебаниями. Опираясь на понятийный аппарат, который приводит к системе (3.17), можно утверждать, что для закрытой системы колебания плотности культуры микроводорослей в стационарной фазе роста невозможны, что противоречит полученным экспериментальным данным. Следовательно, для построения математической модели, которая позволит описать колебательные процессы, необходимо введение дополнительных параметров, учитывающих структурную организацию «узкого места» метаболизма, биохимический состав биомассы [67].

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

Одним из классических объектов при изучении процессов фотобиосинтеза является *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Благодаря простоте технической реализации большинство экспериментальных работ со спиролиной осуществляются в накопительном режиме культивирования. По форме накопительной кривой можно судить о лимитирующих рост факторах внешней среды, а также о последовательности их действия [65]. Рост накопительной культуры – сложный динамический процесс, в ходе которого происходят постоянные изменения, как биохимического состава клеток, так и состава среды. Следовательно, необходимо принимать во внимание влияние совокупности нескольких факторов на скорость роста культуры.

При выращивании спиролины в условиях накопительной культуры одним из ключевых факторов, определяющих форму кривой роста, является углеродное обеспечение. При оптимальных световых условиях и температуре скорость роста будет определяться концентрацией основных биогенных элементов в питательной среде. Обычно при выращивании спиролины используется питательная среда Заррук [281], основным элементом которой является гидрокарбонат натрия (пищевая сода). Использование питательной среды Заррук для выращивания спиролины предполагает барботаж суспензии газо-воздушной смесью воздуха и CO₂. Однако способность клеток спиролины выдерживать высокие величины pH позволяет культивировать спиролину без дополнительной подачи CO₂, что значительно упрощает лабораторные исследования и удешевляет промышленное культивирование данного объекта [69].

Без дополнительной подачи CO_2 в культуру единственным источником углерода является гидрокарбонат-ионы. Из-за высокого начального содержания соды в питательной среде именно поглощение гидрокарбонат-ионов клетками определяет динамику pH в накопительной культуре [17]. При высоких значениях pH среды (>11.5) углерод представлен в растворе только карбонат-ионами [63], которые не поглощаются клетками спироулины, что приводит к остановке роста плотности культуры. При таких условиях рост культуры останавливается на плотностях около 1,5 – 2 г сухого вещества (СВ) на литр, в то время как среда Заррук по основным биогенным элементам (азот, фосфор и др.) рассчитана на 4,5 г СВ/л. Это означает, что в среде остаётся около половины всех питательных веществ, следовательно, при оптимальных световых условиях наступает лимитирование роста культуры углеродом. Необходимым этапом оптимизации углеродного питания становится разработка математической модели роста водорослей как функции потока углерода.

Рассмотрим закрытую по углероду систему культивирования микроводорослей. Выше показано, что в простейшем случае накопительную кривую необходимо разделить на две фазы роста: фаза неограниченного роста и лимитированного (ограниченного) роста. На первом участке рост культуры происходит с максимальной удельной скоростью. Математически, скорость роста культуры *A. platensis* на данном участке записывается следующим образом:

$$\frac{dB}{dt} = \mu_m \cdot B,$$

где μ_m – константа максимальной удельной скорости роста в данных условиях.

Проинтегрировав данное выражение при заданных начальных условиях, мы получим экспоненциальный рост плотности культуры во времени:

$$B = B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \quad (3.18)$$

где B_0 – начальная плотность культуры *A. platensis* в момент времени $t = 0$.

Экспериментально доказано, что источниками неорганического углерода для низших фотоавтотрофов являются CO_2 и HCO_3^- [144, 248]. Для культур, растущих при высоких значениях pH, углерод в среде может быть представлен только в виде гидрокарбонат- и карбонат-ионов. Существенную роль в ассимиляции углерода играет цинксодержащий фермент карбоангидраза, участвующий в различных стадиях работы CO_2 -концентрирующего механизма [96]. У цианобактерий внутриклеточная β -карбоангидраза ассоциирована с карбоксисомами [105]. В результате работы карбоангидразы на одну поглощенную молекулу HCO_3^- образуется одна молекула CO_2 и один гидроксил-ион OH^- [208]. CO_2 используется в цикле Кальвина, а OH^- выносится во внешнюю среду, где взаимодействует с HCO_3^- с образованием CO_3^{2-} . Таким образом, изъятие углерода клетками в виде гидрокарбонат-иона приводит к образованию одной

молекулы CO_2 , поступающей в цикл Кальвина, и карбонат-иона, который остается во внешней среде.

Так как содержание гидрокарбоната натрия в среде Заррук во много раз превышает содержание фосфата калия, можно считать, что изменение рН 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:

$$\frac{d[\text{OH}^-]}{dt} = k_1 \cdot N_{\text{CA}},$$

где k_1 – константа связи, включающая активность и время оборота карбоангидразы; N_{CA} – суммарное количество молекул карбоангидразы.

Считая долю карбоангидразы f_{CA} в биомассе постоянной, можем выразить количество фермента через величину биомассы:

$$\begin{aligned} f_{\text{CA}} &= \frac{N_{\text{CA}}}{B}, \\ N_{\text{CA}} &= f_{\text{CA}} \cdot B, \\ \frac{d[\text{OH}^-]}{dt} &= k_1 \cdot N_{\text{CA}} = k_1 \cdot f_{\text{CA}} \cdot B = \mu_{\text{CA}} \cdot B, \end{aligned}$$

где: $\mu_{\text{CA}} = k_1 \cdot f_{\text{CA}}$ – константа.

Учитывая то, что биомасса растёт по экспоненциальному закону, последнее уравнение приобретёт следующий вид:

$$\frac{d[\text{OH}^-]}{dt} = \mu_{\text{CA}} \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Начальному моменту времени $t = 0$ соответствует некоторое начальное содержание гидроксил-ионов $[\text{OH}^-]$. Проинтегрируем последнее уравнение при данных начальных условиях:

$$[\text{OH}^-] = [\text{OH}^-]_0 - \frac{\mu_{\text{CA}} \cdot B_0}{\mu_m} + \frac{\mu_{\text{CA}} \cdot B_0}{\mu_m} \cdot e^{\mu_m \cdot t}. \quad (3.19)$$

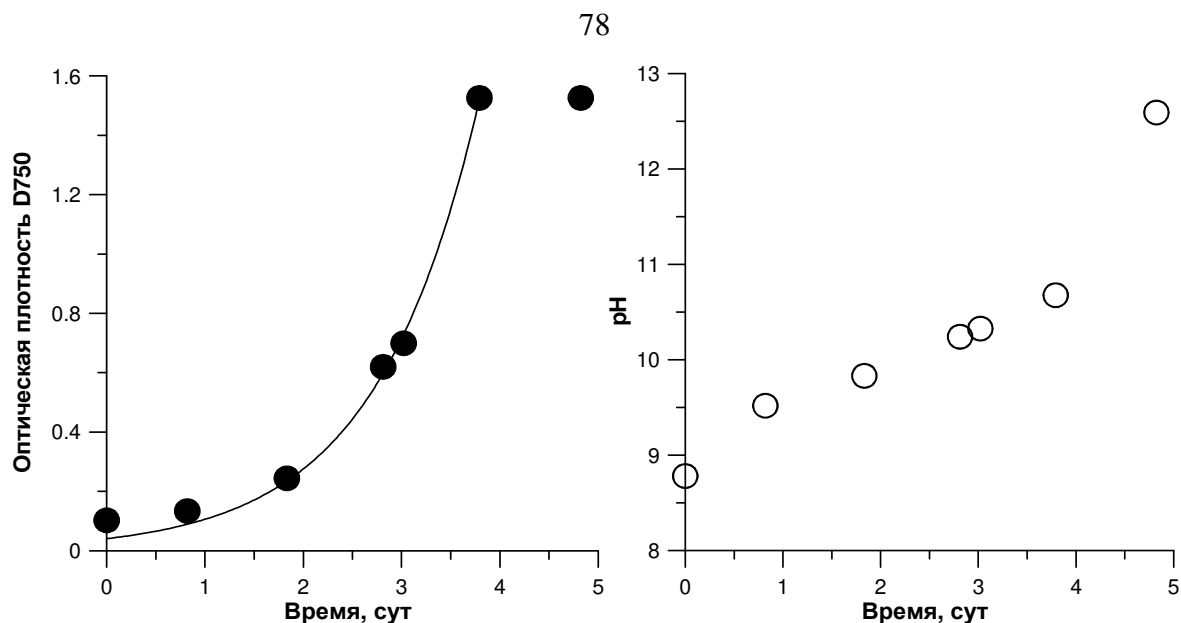


Рисунок 3.10 Накопительная кривая роста *A. platensis* и pH культуральной среды. Аппроксимация экспоненциальной фазы роста уравнением (3.18)

Анализ выражения (3.19) показывает, что концентрация $[OH^-]$ в среде увеличивается экспоненциально. Это приводит к резкому увеличению pH среды на начальных этапах культивирования *A. platensis*, что подтверждается многочисленными экспериментальными данными. На рисунке 3.10 представлена накопительная кривая роста спирулины и динамика изменения pH культуральной среды. Плотность культуры увеличивалась в течение четырёх суток с последующим выходом в стационарную фазу. Благодаря отсутствию лимитирования светом, рост спирулины хорошо ($R^2 = 0,99$) описывается экспоненциальным уравнением (3.18). Однако, следует отметить, небольшие отклонения от экспоненциального закона в самом начале накопительной кривой, что объясняется процессами фотоадаптации при переносе клеток с иннокулята с низкой на высокую освещённость [47], которые будут рассмотрены далее.

Параллельно с ростом культуры происходит увеличение pH среды. Так как pH есть логарифм концентрации ионов водорода, концентрация которых, в свою очередь, будет меняться по экспоненте (3.19). Поэтому переведём величину pH среды в молярную концентрацию гидроксил-ионов:

$$pH + pOH = 14, \quad -\lg[OH^-] = 14 - pH, \quad [OH^-] = 10^{-14+pH}.$$

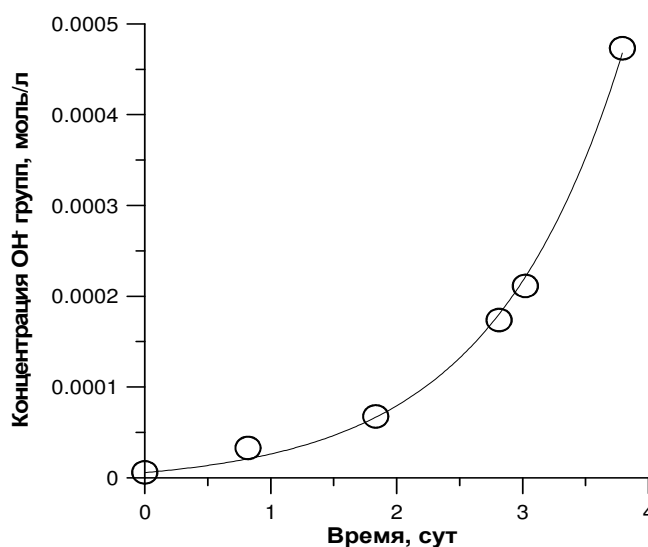


Рисунок 3.11 Изменение концентрации гидроксил-ионов в среде. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (3.19)

Полученные результаты свидетельствуют об адекватности предложенной математической модели ($R^2 = 0,99$). Следует отметить, что при проведении аппроксимации уравнением (3.19), мы использовали ранее определённое значение (см. рис. 3.11) максимальной удельной скорости роста, которое составило $0,95 \text{ сут}^{-1}$. Значения начальных концентраций гидроксил-ионов и плотности культуры также являются экспериментально определяемыми величинами. Таким образом, единственным неизвестным параметром в уравнении (3.19) является коэффициент μ_{CA} , который, в свою очередь, является произведением содержания карбоангидразы в биомассе на её активность за время оборота. По нашим расчётам, в результате обработки экспериментальных данных (см. рис. 3.11) величина μ_{CA} составила $1,5 \times 10^{-4}$. Оценка данного параметра в дальнейших исследованиях может позволить сделать выводы о количестве и активности карбоангидразы в клетках различных видов низших фотоавтотрофов, выращиваемых в закрытой по углероду системе [69].

Предложенный подход позволяет получить уравнение, описывающее убыль гидрокарбонат-ионов в культуральной среде. Как показано выше, убыль их концентрации в среде будет определяться двумя процессами: отток на биосинтез, который происходит в ходе работы карбоангидразы, а также взаимодействие гидрокарбонат-ионов с гидроксильными группами, концентрация которых в растворе увеличивается экспоненциально согласно (3.19). Данные процессы можно формализовать в виде дифференциального уравнения:

$$\begin{aligned}
\frac{d[HCO_3^-]}{dt} &= -k_1 \cdot N_{CA} - k_2 \cdot [OH^-] = -\mu_{CA} \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t} - k_2 \cdot [OH^-] = \\
&= -\mu_{CA} \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t} - k_2 \cdot \left([OH^-]_0 - \frac{\mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m} + \frac{\mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m} \cdot e^{\mu_m \cdot t} \right) = \\
&= -\mu_{CA} \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t} - k_2 \cdot \frac{\mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m} \cdot e^{\mu_m \cdot t} - k_2 \cdot [OH^-]_0 + k_2 \cdot \frac{\mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m} = \\
&= -e^{\mu_m \cdot t} \cdot \left(\mu_{CA} \cdot B_0 + \frac{k_2 \cdot \mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m} \right) + \frac{k_2 \cdot \mu_{CA} \cdot B_0 - k_2 \cdot [OH^-]_0 \cdot \mu_m}{\mu_m}.
\end{aligned}$$

Последнее выражение интегрируется методом разделения переменных при начальных условиях $t=0$, $[HCO_3^-] = [HCO_3^-]_0$:

$$\begin{aligned}
[HCO_3^-] &= [HCO_3^-]_0 + \frac{\mu_m \cdot \mu_{CA} \cdot B_0 + k_2 \cdot \mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m^2} - \frac{k_2 \cdot [OH^-]_0 \cdot \mu_m - k_2 \cdot \mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m} \cdot t - \\
&- \frac{\mu_m \cdot \mu_{CA} \cdot B_0 + k_2 \cdot \mu_{CA} \cdot B_0}{\mu_m^2} \cdot e^{\mu_m \cdot t}.
\end{aligned} \tag{3.20}$$

Выражение (3.20) позволяет описать динамику уменьшения концентрации гидрокарбонат-ионов в среде при заданных условиях. Все коэффициенты в (3.20), кроме константы пропорциональности k_2 , которая определяет активность перехода гидрокарбонат- в карбонат-ионы в присутствии $[OH^-]$, есть либо измеряемые, либо расчётные величины, определяемые с помощью уравнений (3.18) и (3.19). Концентрация гидрокарбонат-ионов снижается экспоненциально за счёт оттока на биосинтез, а также происходит её линейное уменьшение за счет взаимодействия со свободными гидроксил-ионами. Таким образом, часть доступного для биосинтеза углерода переходит в недоступную карбонатную форму. Этот факт позволяет ответить на поставленный ранее вопрос об остановке роста спирулины на плотностях, которые не менее чем в 2 раза ниже расчётных по прописи питательной среды Заррук.

Полученные уравнения справедливы только для условий неограниченного роста, т. е. для экспоненциальной фазы. С течением времени концентрация гидрокарбонатов, уменьшаясь по (3.20), достигнет некоторого значения, при котором дальнейший неограниченный рост по экспоненте невозможен. Культура перейдёт в фазу замедления роста. Рост спирулины в случае лимитирования гидрокарбонат-ионами будет описываться 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, по смыслу являющаяся экономическим коэффициентом.

Для решения полученной системы уравнений и получения искомой зависимости биомассы спироулины от времени, продифференцируем первое уравнение два раза с последующей подстановкой в него второго и третьего уравнения системы:

$$\begin{cases} \frac{d^2 B}{dt^2} = k_3 \cdot \frac{d[HCO_3^-]}{dt}, \\ \frac{d[HCO_3^-]}{dt} = -\mu_{CA} \cdot B - k_2 \cdot [OH^-], \\ \frac{d[OH^-]}{dt} = \mu_{CA} \cdot B. \end{cases}$$

$$\frac{d^3 B}{dt^3} + a \cdot \frac{dB}{dt} + b \cdot B = 0.$$

Решение последнего уравнения можно представить в виде:

$$B(t) = C_1 \cdot e^{-a_1 \cdot t} + C_2 \cdot \sin(a_2 \cdot t) + C_3 \cdot \cos(a_2 \cdot t), \quad (3.21)$$

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.

Уравнение (3.21) применимо для описания динамики изменения плотности культуры спироулины в фазе замедления и стационарной фазе роста, когда наблюдается лимитирование углеродом. Отметим, что в (3.21) содержатся слагаемые, которые указывают на наличие отмеченных ранее (см. рис. 3.9) периодических колебаний биомассы [67]. Предложенная математическая модель позволяет описать увеличение pH и уменьшение концентрации гидрокарбонат-ионов в культуральной среде с увеличением плотности культуры *A. platensis*, при условии, что углерод не вносится в фотобиореактор извне, т. е. система культивирования является закрытой по углероду. Модель достаточно точно описывает экспериментальные данные при экспоненциальном росте плотности культуры, а также позволяет объяснить колебания плотности культуры в стационарной фазе роста.

3.5. Модель динамики пигментов в накопительной культуре микроводорослей

В основе рассмотренных нами моделей роста культуры микроводорослей лежат основные кинетические коэффициенты: удельная скорость роста, максимальная продуктивность, удельная скорость дыхания и потребность в субстрате. Используя данные характеристики, нами получены выражения, позволяющие описывать как динамику биомассы накопительной культуры микроводорослей, так и изменение pH культуральной среды. Однако с ростом накопительной культуры происходит изменение пигментного и биохимического состава клеток, что приведёт к варьированию параметров моделей. Таким образом, возникает необходимость

разработки динамической модели относительного содержания пигментов в биомассе микроводорослей при изменении световых условий. В качестве базовых положений примем, что под действием света происходит полное или частичное разрушение пигментов за счёт фотодеструкции. Также для упрощения математических расчётов рассмотрим экспоненциальный рост культуры микроводорослей [123].

3.5.1. Моделирование процессов синтеза, фотодеструкции и восстановления пигментов при экспоненциальном росте культуры микроводорослей.

Пусть культура микроводорослей переведена в плотностатный режим непрерывного культивирования при стабилизации плотности на низком уровне, что обеспечивает экспоненциальный рост популяции клеток. Аналогичные условия создаются и в экспоненциальной фазе роста накопительной культуры, т. е. рост культуры ничем не лимитирован и клетки растут с максимальной удельной скоростью роста, которая определяется только внешними световыми условиями. В культурах низкой плотности клетки микроводорослей не затевают друг друга, поэтому скорость роста определяется только внешним освещением. Т. е. μ_m является константой при неизменной интенсивности падающего света. В этом случае динамика плотности культуры описывается экспоненциальной зависимостью (3.18):

$$B = B_0 e^{\mu_m t},$$

Обозначим величину относительного содержания пигмента в биомассе через β :

$$\beta = \frac{\pi}{B},$$

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

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

Модель 1. Скорость синтеза пигментов. Фотодеструкции пигментов не происходит.

При отсутствии фотодеструкции изменение концентрации пигмента в произвольный момент времени t определяется скоростью синтеза пигмента ($d\pi_s/dt$), которую можно считать пропорциональной скорости роста культуры водорослей в целом [24]. При этом коэффициентом пропорциональности является величина, определяемая как максимальное содержание пигмента в биомассе β_m :

$$\frac{d\pi_s}{dt} = \beta_m \cdot \frac{dB}{dt} = \beta_m \cdot \mu_m \cdot B.$$

Разделив переменные, проинтегрируем последнее уравнение и, учитывая, что при начальных условиях $t = 0$, $\pi_s = \pi_{s0}$, в результате получим:

$$\pi_s = \beta_m \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t} = \pi_{s0} \cdot e^{\mu_m \cdot t}. \quad (3.22)$$

Уравнение (3.22) показывает, что концентрация синтезированного пигмента экспоненциально увеличивается, причём показатель скорости синтеза равен максимальной удельной скорости роста биомассы в целом. В этом случае относительное содержание пигмента в биомассе будет:

$$\beta = \frac{\pi_s}{B} = \frac{\pi_{s0} e^{\mu_m t}}{B_0 e^{\mu_m t}} = \frac{\pi_{s0}}{B_0} = \beta_m.$$

Таким образом, если бы не было явления фотодеструктивного окисления пигментов, то относительное содержание пигмента в клетках с течением времени не изменялось бы и, всегда было равным β_m . Такая модель противоречит всем известным экспериментальным данным (см. рисунок 1.5), но позволяет оценить количество синтезированного пигмента в любой момент времени.

Модель 2. 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 содержание пигмента в культуре (π) будет определяться разностью скоростей синтеза и фотодеструкции:

$$\frac{d\pi}{dt} = \frac{d\pi_s}{dt} - \frac{d\pi_d}{dt}.$$

Для произвольного момента времени t будет справедливо балансовое равенство:

$$\begin{aligned} \pi &= \pi_s - \pi_d, \\ \frac{\pi}{B} &= \frac{\pi_s}{B} - \frac{\pi_d}{B}, \\ \beta &= \beta_s - \beta_d. \end{aligned}$$

Оценим скорость фотодеструкции. Данная величина будет зависеть от количества поглощённой световой энергии [123]:

$$\frac{d\pi_d}{dt} = k_1 \cdot \alpha \cdot I_0,$$

где k_1 – коэффициент, показывающий долю квантов в общем световом потоке, которые вызывают фотодеструкцию; α – коэффициент поглощения культуры микроводорослей, определяемый по закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$\alpha = 1 - 10^{-k_2 \cdot \pi},$$

где k_2 – удельный коэффициент поглощения, зависящий от спектральных свойств источника света и суспензии микроводорослей.

Из последней формулы видно, что коэффициент поглощения зависит от концентрации пигмента в культуре. При высокой плотности культуры свет поглощается практически полностью, а коэффициент поглощения равен единице. В культурах низкой плотности коэффициент поглощения прямо пропорционален концентрации пигментов:

$$\alpha \cong k_2 \cdot \pi.$$

Т. е. в культурах низкой плотности скорость распада пигмента за счёт фотодеструкции можно записать в следующем виде:

$$\begin{aligned} \frac{d\pi_d}{dt} &= k_1 \cdot k_2 \cdot I_0 \cdot \pi = K \cdot I_0 \cdot \pi = \mu_i \cdot \pi, \\ K &= k_1 \cdot k_2, \\ \mu_i &= K \cdot I_0. \end{aligned}$$

С учетом последнего выражения уравнение баланса скоростей можно представить в виде:

$$\begin{aligned} \frac{d\pi}{dt} &= \frac{d\pi_s}{dt} - \frac{d\pi_d}{dt}, \\ \frac{d\pi_s}{dt} &= \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \\ \frac{d\pi_d}{dt} &= \mu_i \cdot \pi, \\ \frac{d\pi}{dt} &= \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t} - \mu_i \cdot \pi. \end{aligned}$$

Запишем последнее уравнение в виде:

$$\frac{d\pi}{dt} + \mu_i \cdot \pi = \pi_{s0} \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

В итоге имеем линейное дифференциальное уравнение первого порядка со специальной правой частью, решив которое при начальных условиях $t=0$, $\pi = \pi_0$ получим динамику накопления пигмента в культуре:

$$\pi = \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \cdot e^{\mu_m \cdot t} + \left(\pi_0 - \frac{\pi_{s0} \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \right) \cdot e^{-\mu_i \cdot t}. \quad (3.23)$$

Разделив полученное выражение (3.23) на текущее значение плотности культуры B , получим уравнение, которое позволяет описать динамику изменения относительного содержания пигмента в биомассе:

$$\beta = \frac{\pi}{B} = \frac{\beta_m \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} + \left(\beta_0 - \frac{\beta_m \cdot \mu_m}{(\mu_m + \mu_i)} \right) \cdot e^{-(\mu_m + \mu_i) \cdot t}. \quad (3.24)$$

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

$$t \rightarrow \infty, \beta = \beta_{st},$$

$$\beta_{st} = \beta_m \cdot \frac{\mu_m}{\mu_m + K \cdot I_0}. \quad (3.25)$$

Из уравнения (3.25) видно, что с увеличением интенсивности действующего света стационарные значения относительного содержания пигментов неуклонно снижаются, что соответствует экспериментальным данным, и имеющиеся модельные представления объясняют это снижение [190, 195, 226]. Но при высоких интенсивностях света стационарные значения β стремятся к нулю. Это не соответствует корректно проведенным экспериментальным данным, имеющимся в литературе [47, 110].

С учётом (3.25) уравнение для динамики β (3.24) можно привести к параметрическому виду:

$$\beta = \beta_{st} + (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-(\mu_m + K \cdot I_0) \cdot t}. \quad (3.25)$$

Коэффициент перед экспонентой в уравнении (3.25) может быть как положительным, так и отрицательным, в зависимости от разности начального содержания пигментов β_0 и стационарного значения β_{st} , что позволяет количественно описывать динамику как увеличения, так и уменьшения содержания пигментов в клетках. Однако изменение величины β по уравнению (3.25) имеет плавный монотонный (без экстремумов) характер перехода от начальных условий к стационарным. Уравнение не может описать «ложный старт», т. е. реальную картину динамики снижения относительного содержания пигментов в начальный период времени с дальнейшим его увеличением.

Модель 3. Фотодеструкция с последующим восстановлением пигментов.

Полагаем, что фотодеструкция проявляется в частичном разрушении пигментов и некоторая их доля может восстановиться до нормального состояния. 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_n).

Общий баланс пигментов запишется в следующем виде:

$$\pi_s = \pi + \pi_d + \pi_r + \pi_n.$$

Для такого механизма обратимой фотодеструкции важно определиться с оценкой доли пигментов, которые измеряются в процессе экспериментальных исследований. Считая, что в момент измерения мы резко снижаем условия освещения, можно принять, что нет условий для

необратимого разрушения пигмента. В этом случае, измеряемая концентрация пигмента в клетках будет определяться разностью концентраций синтезированного и необратимо разрушенного пигмента:

$$\pi + \pi_d + \pi_r = \pi_m = \pi_s - \pi_\pi,$$

$$\beta = \frac{\pi_m}{B} = \beta_m - \beta_\pi.$$

Наиболее вероятным представляется вариант механизма восстановления, который требует некоторого времени на процесс восстановления. Если μ_r – интенсивность процесса, то скорость восстановления можно записать в виде:

$$\frac{d\pi_r}{dt} = \mu_r \cdot \pi_d.$$

Аналогично для необратимого распада:

$$\frac{d\pi_\pi}{dt} = \mu_\pi \cdot \pi_d.$$

Для произвольного момента времени t можно записать балансовое уравнение для наблюдаемого (текущего) значения содержания пигмента в культуре в виде, представленном ранее:

$$\pi + \pi_d + \pi_r = \pi_m = \pi_s - \pi_\pi,$$

$$\beta = \frac{\pi_m}{B} = \beta_m - \beta_\pi.$$

Скорость изменения текущего содержания пигментов в культуре будет зависеть от скоростей синтеза, фотодеструкции и восстановления:

$$\frac{d\pi_m}{dt} = \frac{d\pi}{dt} + \frac{d\pi_d}{dt} + \frac{d\pi_r}{dt} = \frac{d\pi_s}{dt} - \frac{d\pi_\pi}{dt}.$$

Подставим известные зависимости скоростей в последнее уравнение:

$$\frac{d\pi_s}{dt} = \beta_m \cdot B_0 \cdot \mu_m \cdot e^{\mu_m \cdot t},$$

$$\frac{d\pi_\pi}{dt} = \mu_\pi \cdot \pi_d,$$

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

Вместе с выражением для скорости фотодеструкции получим систему дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами:

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

Продифференцируем первое уравнение системы по времени:

$$\frac{d^2 \pi_m}{dt^2} = \beta_m \cdot B_0 \cdot \mu_m^2 \cdot e^{\mu_m \cdot t} - \mu_\pi \cdot \frac{d\pi_d}{dt}.$$

Подставим второе уравнение из системы в последнее выражение и запишем в виде дифференциального уравнения второго порядка с правой частью:

$$\begin{aligned} \frac{d^2 \pi_m}{dt^2} &= \mu_m^2 \cdot \beta_m \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t} - \mu_\pi \cdot \mu_i \cdot \pi_m, \\ \frac{d^2 \pi_m}{dt^2} + \mu_\pi \cdot \mu_i \cdot \pi_m &= \mu_m^2 \cdot \beta_m \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}. \end{aligned}$$

Так как коэффициенты в левой части уравнения постоянны, оно всегда приводится к квадратурам, и его частное решение имеет вид:

$$r^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i = 0.$$

Характеристическое уравнение имеет мнимые корни:

$$r_{1,2} = \pm \sqrt{-\mu_\pi \cdot \mu_i} = \pm \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot i.$$

В этом случае частное решение уравнения без правой части можно записать в виде:

$$\pi_{m0}^* = \pm C_1 \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t).$$

Или:

$$\begin{aligned} \pi_{m0}^* &= C_3 \cdot \sin(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + C_4 \cdot \cos(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t), \\ C_3 &= C_1 \cdot \cos C_2, C_4 = C_1 \cdot \sin C_2, \frac{C_4}{C_3} = \operatorname{tg} C_2. \end{aligned}$$

Частное решение уравнения для правой части:

$$\pi_{m1}^* = C \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Теперь искомое решение дифференциального уравнения запишется в виде:

$$\pi_m = C_3 \cdot \sin(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + C_4 \cdot \cos(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + C \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Разделив на текущее значение плотности культуры, получим относительное содержание пигментов в биомассе:

$$\begin{aligned} \beta &= \frac{\pi_m}{B} = \frac{C_1}{B} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \frac{C}{B} \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \\ \beta &= \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \frac{C}{B_0} \cdot \beta_m. \end{aligned}$$

Или:

$$\beta = \frac{C_3}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \frac{C_4}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \cos(\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \frac{C}{B_0} \cdot \beta_m.$$

Рассматривая стационарные значения относительного содержания пигментов в биомассе (β_{st}), которые будут наблюдаться при $t \rightarrow \infty$, можно определить константу C :

$$t \rightarrow \infty, \beta = \beta_{st}$$

$$\beta_{st} = \frac{C}{B_0} \cdot \beta_m,$$

$$C = \frac{\beta_{st} \cdot B_0}{\beta_m}.$$

Зная наблюдаемое содержание пигмента в начальный момент времени ($t = 0$), можно определить C_4 и связь между постоянными C_1 и C_2 :

$$t = 0, \beta = \beta_0,$$

$$\beta_0 = \frac{C_1}{B_0} \cdot \sin C_2 + \beta_{st},$$

$$\frac{C_1}{B_0} \cdot \sin C_2 = \frac{C_4}{B_0} = \beta_0 - \beta_{st}.$$

Полученная разность может быть как положительной, так и отрицательной, в зависимости от начальных условий (предыстории культуры) и уровня освещения, при котором измеряется стационарное содержание пигментов. Теперь для относительного содержания пигмента можно записать:

$$\begin{aligned} \beta &= \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \beta_{st}, \\ \beta &= \frac{C_3}{B_0} \cdot e^{-\mu_m t} \cdot \sin \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-\mu_m t} \cdot \cos \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + \beta_{st}. \end{aligned} \quad (3.26)$$

В итоге получено 2 формы уравнения, позволяющие по экспериментальным данным найти обобщенные коэффициенты и описать динамику относительного содержания пигментов в биомассе микроводорослей в экспоненциальной фазе роста периодической (накопительной культуры). Однако полученные уравнения не позволяют в явном виде найти связь полученных обобщённых констант уравнения с кинетическими коэффициентами рассматриваемой модели и определить наличие «ложного старта» в динамических кривых роста.

3.5.2. Анализ модели

Для оценки наличия экстремумов в полученных уравнениях найдём производную по времени и приравняем её нулю. В момент времени (t_{ext}) величина относительного содержания пигмента будет экстремальной (β_{ext}). Эти величины могут быть экспериментально определены при исследовании динамики содержания пигментов в экспоненциальной фазе роста накопительной культуры микроводорослей.

$$\beta = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \beta_{st},$$

$$\frac{d\beta}{dt} = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \left(-\mu_m \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot \left(\cos(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) \right) \right).$$

Приравнивание производной нулю имеет более одного решения:

$$1. e^{-\mu_m \cdot t} = 0,$$

$$t \rightarrow \infty,$$

$$\beta = \beta_{ext} = \beta_{st}.$$

Это уже известный случай стационарного состояния. Второе решение позволяет найти постоянную C_2 :

$$2. -\mu_m \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot \left(\cos(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) \right) = 0,$$

$$\mu_m \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) = \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot \left(\cos(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) \right),$$

$$\operatorname{tg}(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}) = \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m}, C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext} = \operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m},$$

$$C_2 = \operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} - \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}.$$

Подставляя значение этого коэффициента в уравнение для β при $t = t_{ext}$ можно найти коэффициент (C_1):

$$\beta_{ext} = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t_{ext}} \cdot \sin(\operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m}) + \beta_{st}.$$

После преобразования:

$$\operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} = \operatorname{arcsin} \frac{\frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m}}{\sqrt{1 + \frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2}}} = \operatorname{arcsin} \sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}},$$

$$\beta_{ext} = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t_{ext}} \cdot \sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}} + \beta_{st},$$

находим:

$$\frac{C_1}{B_0} = \frac{\beta_{ext} - \beta_{st}}{e^{-\mu_m \cdot t_{ext}} \cdot \sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}}} = \frac{(\beta_{ext} - \beta_{st})}{e^{-\mu_m \cdot t_{ext}}} \cdot \sqrt{\frac{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_\pi \cdot \mu_i}}.$$

Подставляем найденные константы интегрирования в решение динамического уравнения:

$$\beta = \frac{C_1}{B_0} \cdot e^{-\mu_m \cdot t} \cdot \sin(C_2 + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t) + \beta_{st},$$

$$C_2 = \operatorname{arctg} \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} - \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext},$$

$$\frac{C_1}{B_0} = \frac{(\beta_{ext} - \beta_{st})}{e^{-\mu_m \cdot t_{ext}}} \cdot \sqrt{\frac{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_\pi \cdot \mu_i}},$$

$$\beta = (\beta_{ext} - \beta_{st}) \cdot \sqrt{\frac{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_\pi \cdot \mu_i}} \cdot e^{-\mu_m \cdot (t - t_{ext})} \cdot \sin\left(\operatorname{arcsin} \sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}} + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot (t - t_{ext})\right) + \beta_{st}.$$

Обозначим:

$$\sqrt{\frac{\mu_\pi \cdot \mu_i}{\mu_m^2 + \mu_\pi \cdot \mu_i}} = a,$$

Тогда:

$$\beta = \frac{(\beta_{ext} - \beta_{st})}{a} \cdot e^{-\mu_m \cdot (t - t_{ext})} \cdot \sin(\operatorname{arcsin} a + \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot (t - t_{ext})) + \beta_{st}.$$

Константу C_3 определим из условия:

$$\frac{C_4}{C_3} = \operatorname{tg} C_2,$$

$$\frac{C_3}{B_0} = (\beta_0 - \beta_{st}) \frac{1 + \frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} \operatorname{tg} \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}}{\frac{\sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i}}{\mu_m} - \operatorname{tg} \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t_{ext}} = c \cdot (\beta_0 - \beta_{st}).$$

Теперь вторую форму уравнения (3.26) можно записать в виде:

$$\begin{aligned} \beta &= (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-\mu_m t} \cdot \left(c \cdot \sin \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + \cos \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t \right) + \beta_{st}, \\ \beta &= \beta_{st} + (\beta_0 - \beta_{st}) \cdot e^{-\mu_m t} \cdot \left(c \cdot \sin \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t + \cos \sqrt{\mu_\pi \cdot \mu_i} \cdot t \right). \end{aligned} \quad (3.27)$$

В двух формах уравнений присутствует параметр, отражающий стационарное значение относительного содержания пигментов микроводорослей при непрерывном выращивании микроводорослей. Величина этого параметра является светозависимой и может быть определена в отдельных экспериментах. Кроме того, этот параметр может быть выражен через кинетические коэффициенты используемого в данной работе механизма фотодеструкции при стационарном решении модели [123].

3.5.3. Описание экспериментальных данных

В качестве примера рассмотрим экспериментальные данные работы [91], где проводились параллельные измерения числа клеток, биомассы и содержания хлорофилла a при переносе

клеток *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia sp.* с низкой на высокую освещённость и наоборот (см. рисунок 3.12 и 3.13).

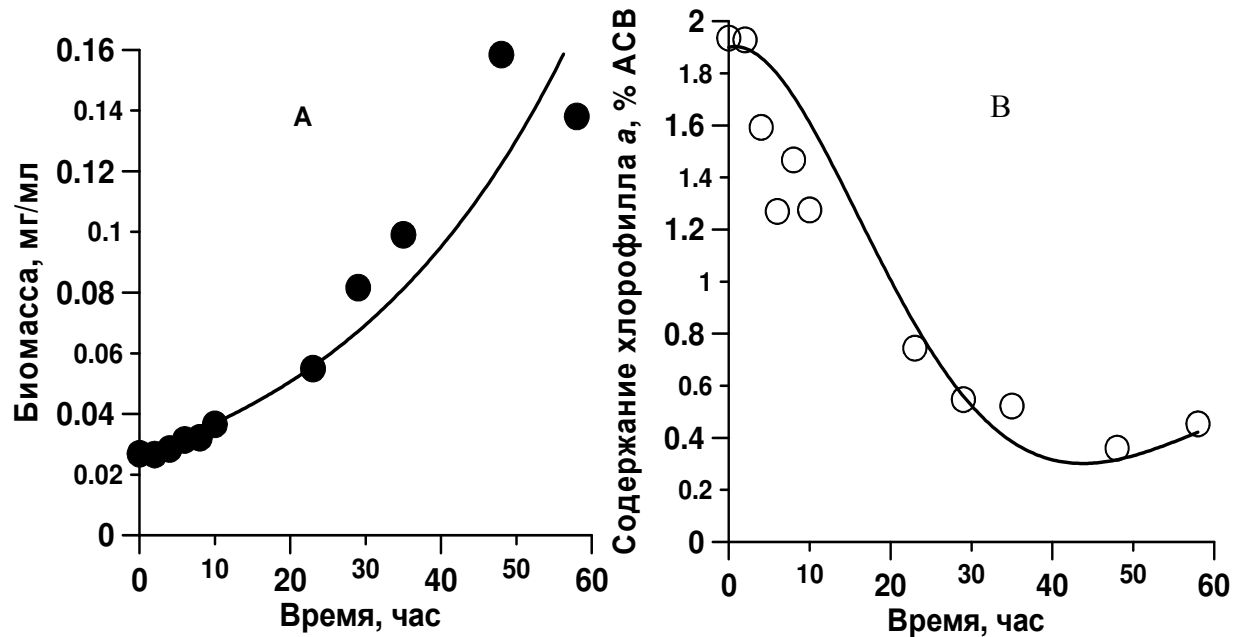


Рисунок 3.12 Динамика биомассы (А) и относительного содержания хлорофилла *a* (В) при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой на высокую освещённость [91]. Аппроксимация динамики биомассы уравнением (3.18), относительного содержания хлорофилла *a* уравнением (3.27)

Анализ полученного экспериментального материала позволил автору сделать заключение, что данные виды диатомей адаптировались к высокой интенсивности света путём уменьшения синтеза хлорофилла и повышения скорости роста клеток. При этом адаптация к низкой интенсивности света сопровождалась интенсивным синтезом хлорофилла *a*, который превышал скорость деления клеток. Подобное заключение является сильно упрощённым и не соответствует современным представлениям о процессах фотодинамического действия света на живые клетки [5, 109, 214]. Однако в связи с наличием большого количества различных механизмов фотоакклимации клеток микроводорослей авторам достаточно тяжело проводить критический анализ своих результатов. Тем более ни одна из существующих моделей кинетики светозависимого содержания пигментов в клетках микроводорослей напрямую не может объяснить данных изменения величины β при накопительном режиме культивирования, потому что все они построены для условий стационарного динамического равновесия, обеспечиваемого либо с помощью плотностата, либо с помощью хемостата. Поэтому использование динамической модели, предлагаемой в данной работе, позволит получить представления о

процессах, протекающих в клетках накопительных культур микроводорослей при различных уровнях освещённости [123].

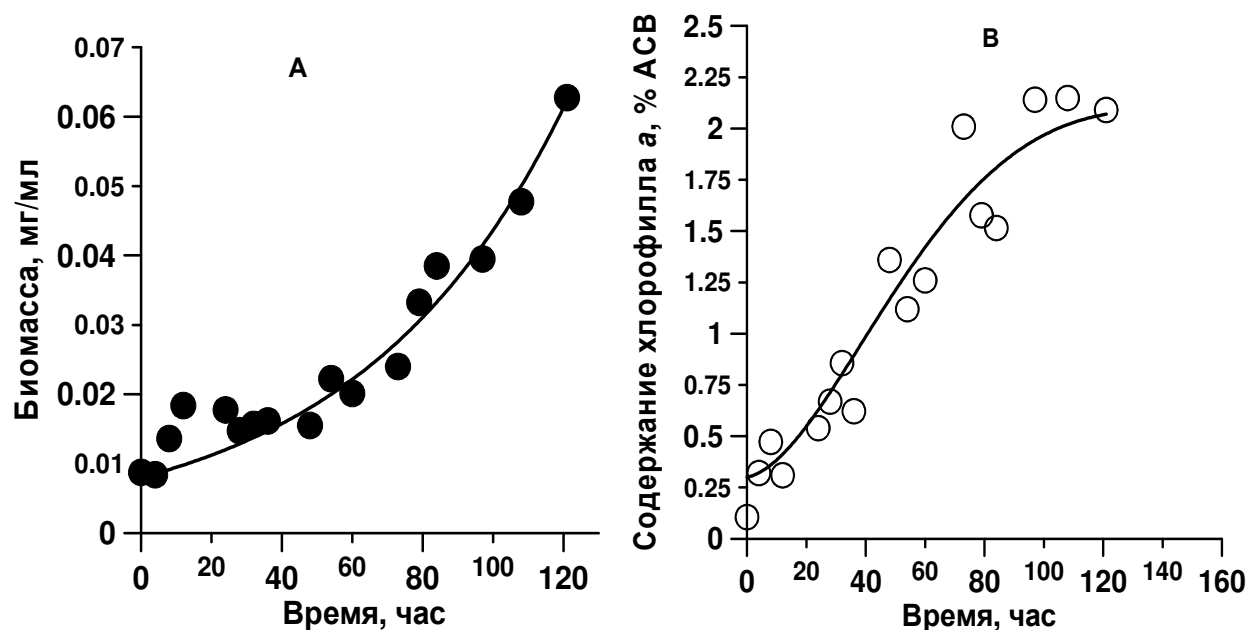


Рисунок 3.13 Динамика биомассы (А) и относительного содержания хлорофилла а (В) при переносе клеток *Ph. tricornutum* с высокой на низкую освещённость [91]. Аппроксимация динамики биомассы уравнением (3.18), относительного содержания хлорофилла а уравнением (3.27)

На рисунке 3.12 представлена аппроксимация экспериментальных данных по биомассе и относительному содержанию хлорофилла а при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой на высокую облучённость. Анализируя характер кривой, следует отметить, что на начальном этапе фотодеструктивное окисление пигмента преобладает над его синтезом, поэтому величина β уменьшается. Рассчитанные на данном этапе коэффициенты модели позволили построить прогностическую кривую содержания хлорофилла а (см. рис. 3.14 А). С течением времени плотность культуры микроводорослей увеличивается, поэтому всё меньше квантов света вызывает деструкцию и всё большее количество пигмента синтезируется. В связи с этим кривая имеет точку перегиба [220]. Далее происходит увеличение содержания пигментов в клетке. Это связано с тем, что плотность культуры увеличивается, а средняя пространственная облучённость на одну клетку уменьшается. Таким образом, для поддержания постоянной удельной скорости роста необходимо больше пигментов в клетке. В итоге, мы достигаем стационарного равновесия, которое определяется величиной внешнего светового потока. Подобные рассуждения можно привести при переносе клеток *Ph. tricornutum* с высокой на низкую освещённость. В данном случае в начальный момент времени содержание пигмента

растёт (рисунок 3.13), достигая стационарного значения, определяемого внешней освещённостью (рисунок 3.14 В).

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} . Данные величины могут быть рассчитаны и являются кинетическими характеристиками роста культуры микроводорослей в данных условиях при заданной освещённости.

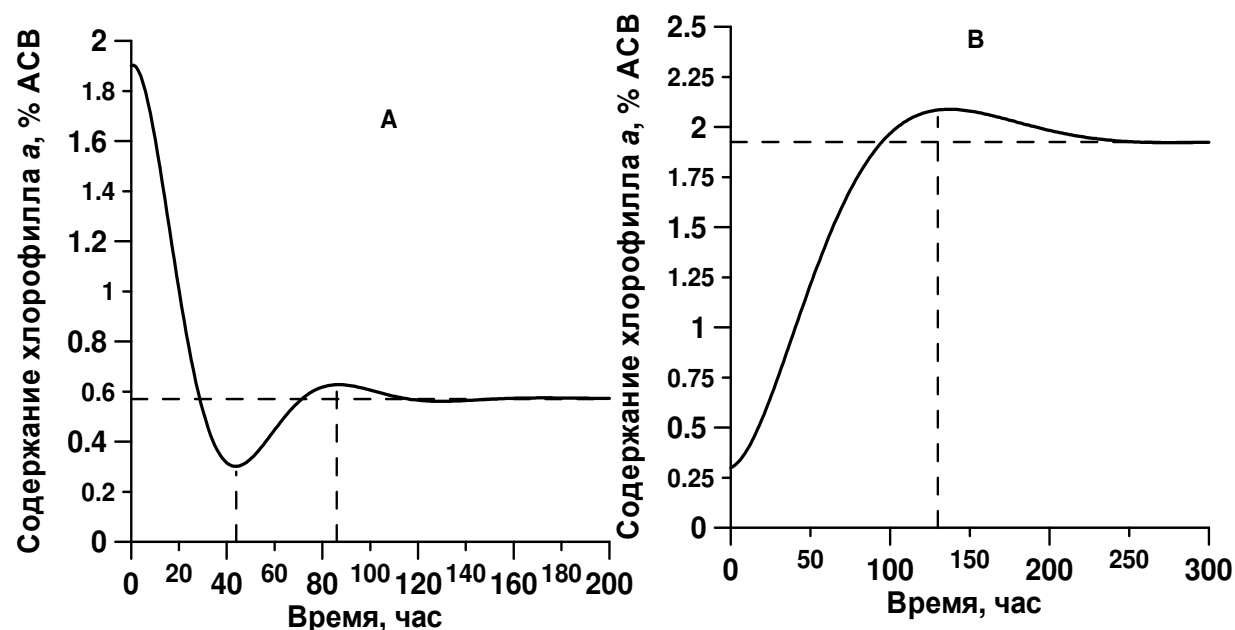


Рисунок 3.14 Теоретические кривые динамики относительного содержания хлорофилла *a* при переносе клеток *Ph. tricornutum* с низкой на высокую (А) и с высокой на низкую (В) освещённость. Пунктиром отмечены экстремумы функции (3.27)

Полученные теоретически экстремумы функции динамики относительного содержания хлорофилла *a* для феодактилиума (рис. 3.14 А, В) находят экспериментальное подтверждение и при культивировании других видов микроводорослей. Например, в работе [82] представлена динамика относительного содержания хлорофилла *a* (рисунок 3.15 А) и С-фикоцианина (рисунок 3.15 В) при культивировании *Spirulina platensis*. В данной работе авторы приводят данные по росту биомассы и динамике пигментного состава при различных концентрациях нитратного азота в питательной среде. На рисунке 3.15 представлена динамика β при полной обеспеченности азотом (200 мг N / л). Здесь мы наблюдаем высокое соответствие предложенной динамической модели с экспериментальными данными содержания и хлорофилла и С-фикоцианина. При лимитировании роста спироулины азотом (см. рисунок 1.5) данная модель не применима, поскольку в этом случае не выполняется условие

экспоненциального роста культуры микроводорослей. Нами также проведена верификация предложенной модели при описании данных относительного содержания В-фикоэритрина в клетках накопительной культуры *Porphyridium purpureum* (см. рисунок 3.16). Как и в предыдущих случаях, модельная кривая, построенная по уравнению (3.27), характеризуется минимумом на первые сутки культивирования и дальнейшим выходом на стационар [202].

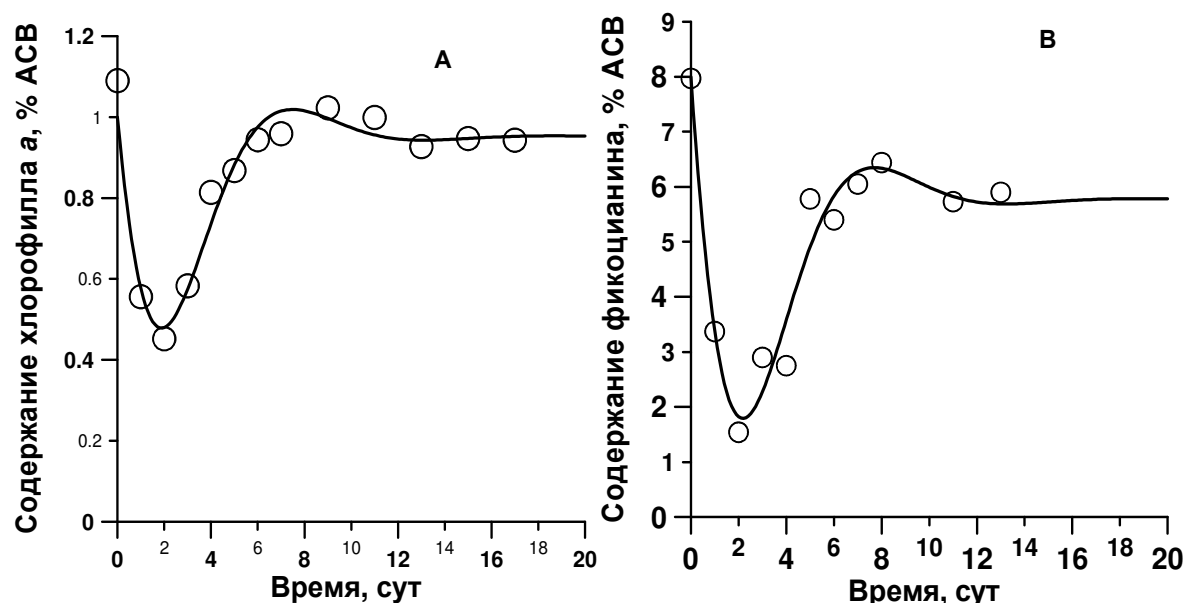


Рисунок 3.15 Динамика относительного содержания хлорофилла *a* (А) и С-фикоцианина (В) при культивировании *S. platensis* [82]. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (3.27)

Таким образом, предлагаемая модель может быть использована для прогнозирования динамики содержания пигментов при культивировании микроводорослей с заданной внешней освещённостью, но при этом должны быть известны значения видоспецифичных коэффициентов. Следует отметить, что при использовании данной модели необходимо соблюдать условие экспоненциального роста плотности накопительной культуры микроводорослей. В противном случае возможны отклонения экспериментальных данных от теоретической кривой (3.27), которые связаны с наличием ограничения роста культуры микроводорослей либо по свету, либо по газовому обеспечению, либо по минеральному питанию. Высокое соответствие теоретических и экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что именно при учёте процессов фотодеструктивного окисления пигментов с возможностью их последующего восстановления можно объяснить явление «ложного старта» динамики относительного содержания пигментов при культивировании микроводорослей.

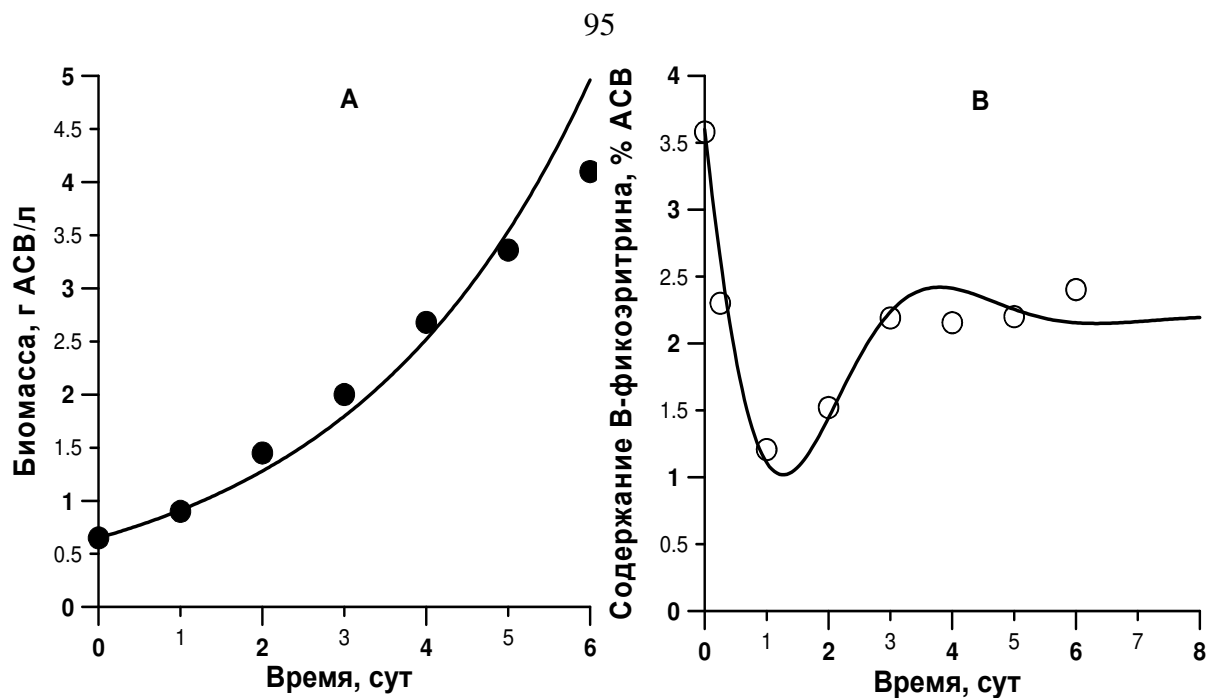


Рисунок 3.16 Динамика биомассы (А) и относительного содержания В-фикоэритрина (В) при переносе клеток *P. purpureum* с низкой на высокую освещённость. Аппроксимация динамики биомассы уравнением (3.18), относительного содержания В-фикоэритрина уравнением (3.27)

3.5.4. Моделирование динамики содержания пигментов в клетках *Dunaliella salina* на стадии каротиногенеза

Широко известно, что дефицит компонентов минерального питания влечёт за собой изменение скорости роста микроводорослей, а также количественного состава пигментов. При дефиците биогенных элементов и, особенно, азота, наблюдается общая тенденция снижения содержания белка и пигментов, образующих комплексы с белком (хлорофиллы, фикобилипротеины) в клетках микроводорослей. С другой стороны, при недостатке азота общей для всех микроорганизмов тенденцией является снижение содержания клеточного азота за счёт диссимиляции азотсодержащих макромолекул [259, 260].

Исключение азота из питательной среды изменяет направленность биосинтеза микроводорослей, в том числе и у *Dunaliella salina*, вызывая усиленный синтез запасных веществ липидной природы, а также приводит к увеличению содержания β -каротина в клетках более чем в 2 раза [216, 224, 231]. Повышенная освещённость вызывает дополнительное возрастание содержания β -каротина в клетках *D. salina*, причём каротиноиды, накапливаемые в клетках при стрессовых условиях относятся не к фотосинтетически активным пигментам, а к фотопротекторным. Установлено, что накопление β -каротина у *D. salina* происходит как защитная реакция против облучения [148, 216]. Усиленное накопление β -каротина защищает

клетки от высокой радиации через адсорбцию синего света, поскольку при его высокой концентрации происходит фотодеструкция хлорофилла и наступает гибель клеток.

Рассмотрим случай деструктивного распада пигментов в культуре *D. salina*, например, хлорофилла *a*, под действием света при отсутствии минерального азота [66]. В таких условиях скорость синтеза хлорофилла *a* равна нулю, либо пренебрежимо мала по сравнению со скоростью фотодеструкции. Из фотоокисленного состояния пигмент может перейти либо в нормальное состояние (восстанавливается), либо необратимо разрушается.

Скорость изменения концентрации пигмента в культуре будет определяться разностью скоростей фотодеструкции, восстановления и необратимого распада:

$$\frac{d\pi}{dt} = -\frac{d\pi_d}{dt} + \frac{d\pi_r}{dt} - \frac{d\pi_\pi}{dt}.$$

Модель 1. Фотодеструкция без восстановления

Скорость фотодеструкции зависит от интенсивности действующего света и, как отмечено ранее, пропорциональна количеству поглощённой энергии:

$$\frac{d\pi_d}{dt} = k_1 \cdot \alpha \cdot I_0,$$

где k_1 – коэффициент, показывающий долю квантов в общем световом потоке, которые вызывают фотодеструкцию; α – коэффициент поглощения культуры микроводорослей, определяемый по формуле:

$$\alpha = 1 - 10^{-k_2 \cdot \pi},$$

где k_2 – коэффициент пропорциональности, зависящий от спектральных свойств источника света и суспензии микроводорослей.

Для культуры невысокой оптической плотности справедлива линеаризация зависимости коэффициент α поглощения от концентрации хлорофилла:

$$\frac{d\pi}{dt} = -\mu_i \cdot \pi.$$

Считая μ_i величиной постоянной, при заданных начальных условиях: в начальный момент времени концентрация пигмента равна π_0 , получим:

$$\pi = \pi_0 \cdot e^{-\mu_i \cdot t} \quad (3.28)$$

Уравнение (3.28) показывает, что концентрация хлорофиллов на второй "красной" стадии выращивания *D. salina* экспоненциально снижается. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (3.28) позволит определить удельную скорость фотодеструкции для данных световых условий.

Модель 2. Фотодеструкция с последующим восстановлением

Как отмечено ранее, наиболее вероятным представляется вариант механизма восстановления, который требует некоторого времени на процесс восстановления. Примем, что μ_r – интенсивность процесса, то скорость восстановления можно записать в виде:

$$\frac{d\pi_r}{dt} = \mu_r \cdot \pi_d.$$

Аналогично для необратимого распада:

$$\frac{d\pi_\pi}{dt} = \mu_\pi \cdot \pi_d.$$

где μ_π – удельная скорость необратимого распада.

Теперь скорость изменения концентрации пигмента в культуре можно записать в виде:

$$\begin{cases} \frac{d\pi}{dt} = -\mu_i \cdot \pi + \mu_r \cdot \pi_d - \mu_\pi \cdot \pi_d, \\ \frac{d\pi_d}{dt} = \mu_i \cdot \pi \end{cases}$$

Решение полученной системы дифференциальных уравнений имеет вид:

$$\pi(t) = C_1 \cdot e^{-\frac{1}{2}(\sqrt{\mu_i^2 + 4 \cdot \mu_{r\pi} \cdot \mu_i} + \mu_i)t} + C_2 \cdot e^{\frac{1}{2}(\sqrt{\mu_i^2 + 4 \cdot \mu_{r\pi} \cdot \mu_i} - \mu_i)t}.$$

Обозначим $a = \sqrt{\mu_i^2 + 4 \cdot \mu_{r\pi} \cdot \mu_i}$.

$$\pi(t) = C_1 \cdot e^{-\frac{1}{2}(a + \mu_i)t} + C_2 \cdot e^{\frac{1}{2}(a - \mu_i)t}.$$

Взаимосвязь констант интегрирования можно определить из начальных условий $t = 0$, $\pi = \pi_0$:

$$\pi_0 = C_1 + C_2.$$

Окончательно имеем:

$$\pi(t) = C_1 \cdot e^{-\frac{1}{2}(a + \mu_i)t} + (\pi_0 - C_1) \cdot e^{\frac{1}{2}(a - \mu_i)t}. \quad (3.29)$$

Верификация полученных уравнений (3.28) и (3.29) представлена на рисунке 3.17. Отметим, что обе модели описывают снижение концентрации хлорофилла a во второй стадии выращивания *D. salina*. Однако модель с восстановлением по (3.29) аппроксимирует экспериментальные данные с большей точностью ($R^2 = 0,99$), по сравнению с более простым уравнением (3.28) ($R^2 = 0,83$). Это позволяет сделать вывод, что вторая модель, учитывающая частичное восстановление пигментов, является более предпочтительной. Однако для прогностических оценок на практике возможно применение модели (3.28), которая позволяет легко определить параметр удельной скорости фотодеструкции. Для приведённых экспериментальных данных в обоих случаях эта величина составила около $0,12 \text{ сут}^{-1}$. Равенство μ_i свидетельствует о близости световых условий, в которых находятся клетки, а также позволяет поставить вопрос о видоспецифичности данного коэффициента.

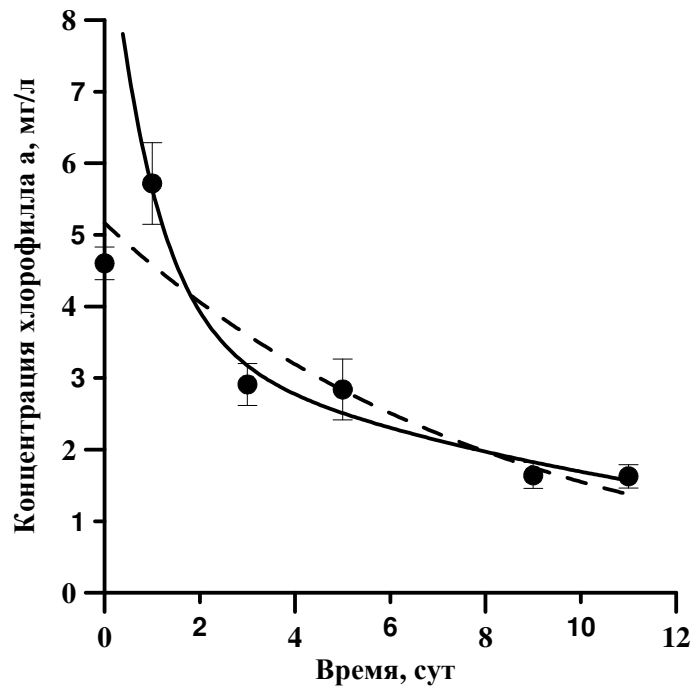


Рисунок 3.17 Динамика концентрации хлорофилла *a* в культуре *D. salina* при её выращивании в лабораторных условиях на второй ("красной") стадии. Пунктирная линия – аппроксимация уравнением (3.28). Линия – аппроксимация уравнением (3.29)

Модель 3. Накопление вторичных каротиноидов

Рассмотрим процесс синтеза вторичных каротиноидов при лимитировании роста *D. salina* биогенными элементами питательной среды и избытке солнечной энергии. В таких условиях фотобиосинтез клеток направлен в сторону увеличения содержания резервных липидов, углеводов, а также каротиноидов [261]. На рисунке 3.18 представлены данные по динамике хлорофиллов, суммарных каротиноидов и плотности культуры. Параллельно с процессами фотовыцветания хлорофиллов, наблюдался рост биомассы *D. salina* и накопление каротиноидов в клетках. Рост плотности культуры сопровождался делением клеток в течение первых пяти суток эксперимента. Далее наблюдалась стабилизация плотности культуры, при этом численность клеток не менялась. Так как в питательную среду на второй ("красной") стадии выращивания не вносили биогенных элементов, то рост плотности культуры можно объяснить использованием внутриклеточных запасов, либо возвратом субстрата из распавшейся биомассы. Динамика биомассы микроводорослей как в первом, так и во втором случае, в первом приближении может быть описана уравнением [115]:

$$B = B_m - (B_m - B_0) \cdot e^{-b \cdot t}. \quad (3.30)$$

где b – константа, которая определяется потребностью клеток в лимитирующем субстрате и удельной скоростью синтеза биомассы.

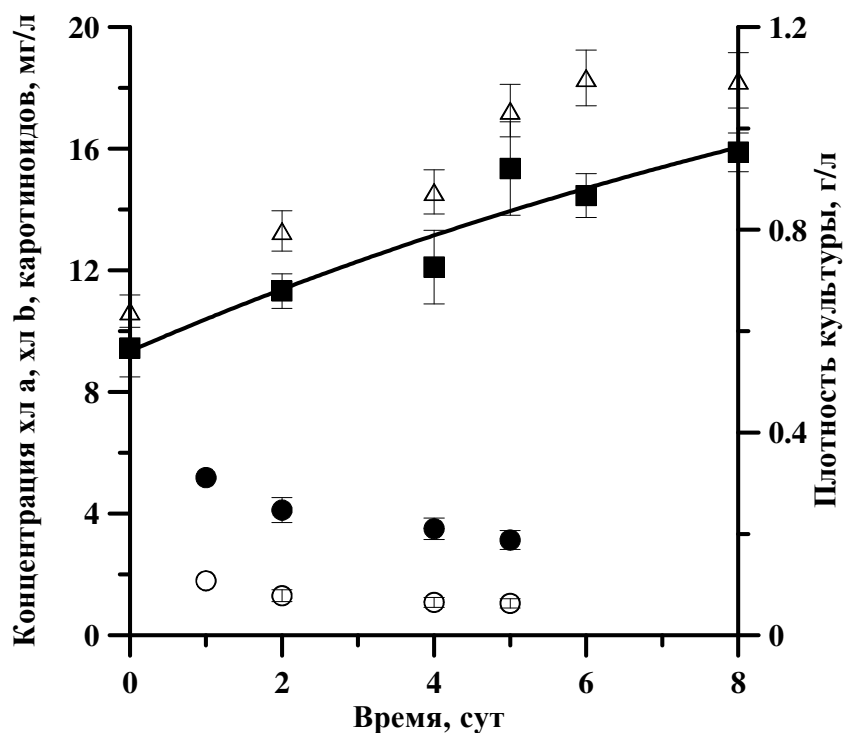


Рисунок 3.18 Динамика содержания хлорофилла a (●), хлорофилла b (○) каротиноидов (Δ) и плотности культуры (■) *Dunaliella salina* на второй ("красной") стадии выращивания. Линия – аппроксимация данных динамики плотности культуры уравнением (3.30)

К окончанию первой "зелёной" стадии выращивания в клетках *D. salina* образуются липидные гранулы, которые локализованы в цитоплазме, содержат ярко-оранжевые вкрапления вторичных каротиноидов (ВКар). Во время нахождения клеток *D. salina* на второй "красной" стадии количество ВКар значительно увеличивается, что свидетельствует о накоплении клетками резервных веществ. Этот процесс интенсифицируется на фоне отсутствия источников азота во внешней среде. Биомассу *D. salina* можно условно разделить на две составляющие: структурную B_{str} и резервную часть B_{res} . К структурной части отнесём белки и др. компоненты, которые непосредственно входят в состав клеточных органелл, либо, как ферменты, участвуют в биосинтетических реакциях. Резервная часть биомассы представлена липидами, углеводами, которые могут накапливаться в клетках при тех или иных условиях. Таким образом, уравнение (3.30) описывает динамику роста структурных клеточных компонентов и, как следствие, рост численности клеток. В свою очередь скорость синтеза ВКар, которые не относятся к структуре, будет определяться количеством поглощённой световой энергии [66]. Так как на второй стадии культура *D. salina* находится в условиях избытка света, скорость образования ВКар будет ограничена только количеством ключевого ферментного комплекса F , который участвует в их синтезе и скоростью его оборота (активностью μ_F):

$$\frac{d\pi_s^{car}}{dt} = \mu_F \cdot F.$$

Считая долю ферментного комплекса F в структурной части биомассы постоянной и равной f , скорость синтеза ВКар будет прямопропорциональна B_{str} :

$$\frac{d\pi_s^{car}}{dt} = \mu_F \cdot f \cdot B_{str} = \mu_f \cdot B_{str}.$$

Под действием света часть ВКар будет разрушаться, причём скорость деструкции, по аналогии с предыдущим случаем, прямо пропорциональна поглощённой световой энергии или количеству самих пигментов:

$$\frac{d\pi_d^{car}}{dt} = \mu_I \cdot \pi^{car}.$$

Таким образом, простейшая модель накопления ВКар на "красной" стадии выращивания *D. salina* в дифференциальной форме имеет вид:

$$\begin{aligned} \frac{d\pi^{car}}{dt} &= \mu_f \cdot B_{str} - \mu_I \cdot \pi^{car}, \\ \frac{d\pi^{car}}{dt} + \mu_I \cdot \pi^{car} &= \mu_f \cdot (B_m - (B_m - B_0) \cdot e^{-b \cdot t}). \end{aligned}$$

Решение последнего уравнения может быть получено в виде:

$$\pi^{car} = C \cdot e^{-\mu_I t} + \frac{\mu_f \cdot B_m}{\mu_I} - \frac{\mu_f \cdot (B_m - B_0)}{\mu_I - b} \cdot e^{-b \cdot t}.$$

Для определения константы интегрирования рассмотрим начальное условие: при $t = 0$, $\pi^{car} = \pi_0^{car}$:

$$\begin{aligned} \pi_0^{car} &= C + \frac{\mu_f \cdot B_m}{\mu_I} - \frac{\mu_f \cdot (B_m - B_0)}{\mu_I - b}, \\ C &= \pi_0^{car} - \frac{\mu_f \cdot (B_m - B_0)}{\mu_I - b} + \frac{\mu_f \cdot B_m}{\mu_I} \end{aligned}$$

Граничное условие: при $t \rightarrow \infty$, $\pi^{car} = \pi_m^{car}$:

$$\pi_m^{car} = \frac{\mu_f \cdot B_m}{\mu_I}.$$

С учётом определённых констант, окончательно динамика ВКар во второй стадии выращивания *D. salina* имеет вид:

$$\pi^{car} = \pi_m^{car} - \left(\pi_m^{car} - \pi_0^{car} + \frac{\mu_f \cdot (B_m - B_0)}{\mu_I - b} \right) \cdot e^{-\mu_I t} - \frac{\mu_f \cdot (B_m - B_0)}{\mu_I - b} \cdot e^{-b \cdot t}. \quad (3.31)$$

На рисунке 3.19 представлена верификация полученного уравнения. Отметим, что модель позволяет описать явление "ложного старта": при переносе клеток микроводорослей с низкой

на высокую освещённость происходит резкое падение содержания пигментов в клетках, при этом биомасса в целом увеличивается. С целью интенсификации вторичного каротиногенеза при запуске второй стадии выращивания *D. salina* культура сильно разбавляется, что приводит к значительному повышению энергии ФАР на клетку. Однако полученные экспериментальные данные не позволяют достоверно подтвердить явление "ложного старта" концентрации ВКар в данных условиях, что обуславливает необходимость дальнейших исследований в этой области.

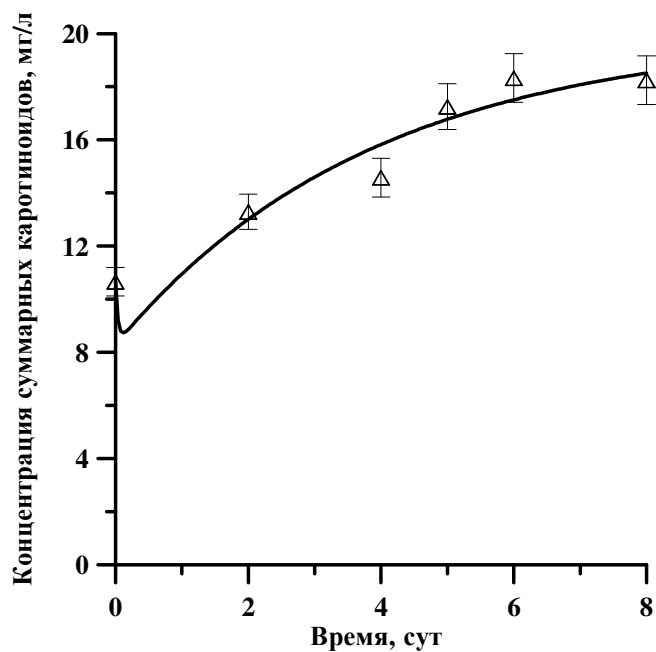


Рисунок 3.19 Динамика содержания суммарных каротиноидов в культуре *D. salina* на второй ("красной") стадии выращивания. Линия – аппроксимация данных уравнением (3.31)

Предлагаемые выражения, описывающие фотодеструкцию хлорофиллов и накопления Вкар, могут быть использованы для прогнозирования динамики содержания пигментов при выращивании *D. salina* на второй "красной" стадии при заданной внешней освещённости и известных значения видоспецифичных коэффициентов [66]. Следует отметить, что при использовании данных моделей необходимо соблюдать условие отсутствия светового лимитирования. В противном случае возможны отклонения экспериментальных данных от теоретических кривых, которые связаны с наличием ограничения скорости синтеза Вкар.

3.6. Заключение к главе 3

К настоящему моменту глубоко разработан математический аппарат для стационарных условий проточной культуры микроводорослей [107, 116, 134, 189]. Для условий накопительной культуры в закрытой системе модели практически отсутствуют, что связано с

трудностями математического описания динамических процессов. Одним из существенных недостатков существующих в литературе динамических моделей [169, 278], в том числе приведённых в данной главе, является использование формализма ферментативной кинетики и предположение о неизменности биохимического состава клеток во всех фазах роста накопительной культуры. Экспериментально показано, что в связи с лимитированием роста одним из биогенных элементов, в фазе замедления потребность клеток в данном субстрате может изменяться [35, 267]. Кроме того, другие параметры моделей, в общем случае, нельзя считать постоянными. Например, максимальная удельная скорость синтеза биомассы будет зависеть от облучённости культуры, т. к. 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 базовая гипотеза о фотодеструкции в некоторых работах экспериментально не подтверждается и подвергается сомнению [198].

Общепринятое положение о пропорциональности скорости роста концентрации лимитирующего субстрата, которое появилось в биокинетике из ферментативной кинетики (закон действующих масс), также вызывает множество вопросов применительно к культурам. 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 [114]. Скорость метаболической реакции при субстратном лимитировании (особенно ярко это иллюстрируется при световом лимитировании) определяется не концентрацией, а величиной потока субстрата на ключевой фермент или ферментный комплекс, его структурную организацию. 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

Накопленные к настоящему моменту знания о фотосинтезе микроводорослей, механизмах ассимиляции биогенных элементов вместе с уже устоявшимися представлениями и принципами биологии и физики, позволяют вплотную подойти к разработке теории роста микроводорослей. Рассмотрим некоторые известные данные о механизмах трансформации энергии и вещества, которые позволяют сформулировать методологические основы моделирования роста культур микроводорослей.

4.1. Разделение процессов энерго- и массообмена

В основе роста микроводорослей лежит фотосинтез. Процесс фотосинтеза протекает в хлоропластах, либо, в случае их отсутствия у цианобактерий, в расположенных параллельными слоями ламеллярных мембранах, пронизывающих всю цитоплазму [137]. Микроводоросли характеризуются пространственным разделением фотохимических (световая стадия) и ферментативных (темновая стадия) процессов синтеза первичных углеводов за счёт энергии восстановленных макроэргов – НАДФ·Н и АТФ. Строго говоря, НАДФ·Н не является макроэргическим соединением, а лишь переносчиком протонов. Однако для образования восстановленной формы НАДФ·Н необходима энергия, поэтому далее под макроэргами будем понимать и АТФ, и НАДФ·Н. Процесс образования макроэнергетических соединений осуществляется в результате нециклического транспорта электрона по цепи переносчиков и моделируется общепринятой Z-схемой [5, 49, 83, 100]. В результате циклического переноса электронов происходит синтез добавочного количества АТФ, необходимого для нормальной работы цикла Кальвина и протекания последующих биосинтетических процессов. Основным продуктом цикла Кальвина являются фосфорилированные гексозы. Промежуточное соединение цикла С₃-фосфоглицериновая кислота, при недостатке НАДФ·Н, может превращаться в пировиноградную кислоту и далее в аланин. Наряду с аминокислотами, при определённых условиях, продуктами цикла Кальвина могут являться органические кислоты, жиры, липиды [11]. Обобщенная блок-схема энерго- и массообмена микроводорослей представлена на рис. 4.1.

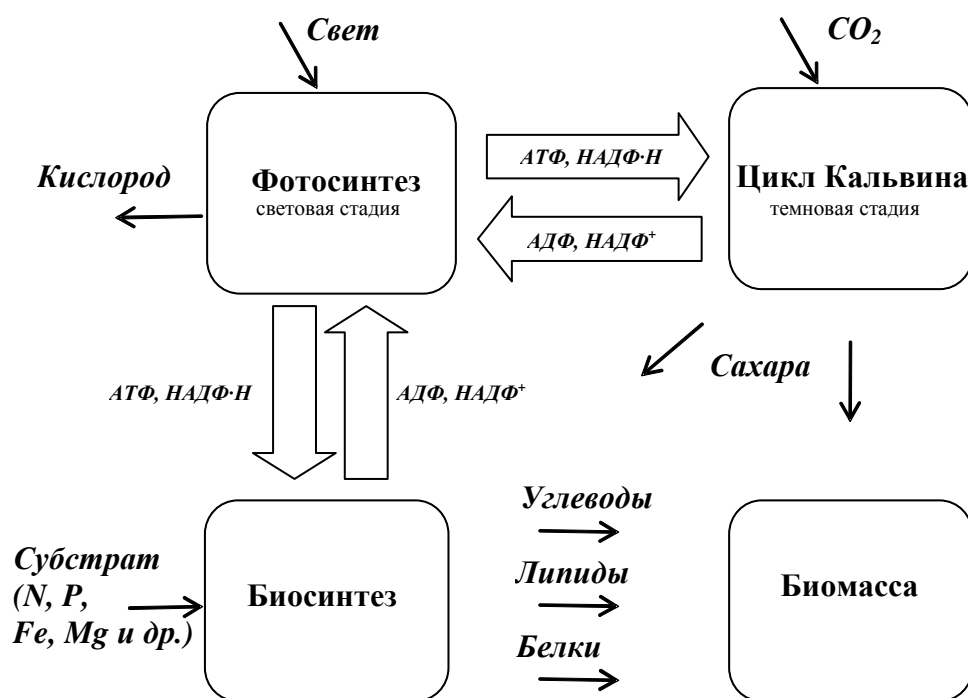
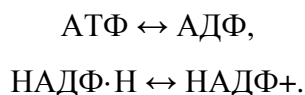


Рисунок 4.1 Схема сопряжения световых (фотосинтез) и темновых (биосинтез) реакций у микроводорослей

Необходимо отметить, что предлагаемая схема является упрощённой, в ней не показано участие в реакциях обмена фосфора, электронов, протонов и других участников энергообмена. Кроме того, не показано участие в биосинтетических реакциях компонентов электрон-транспортной цепи, например ферредоксина, который может играть существенную (возможно, ключевую) роль не только в регуляции циклического и нециклического фотофосфорилирования, но и в образовании аминокислот, т.е. в реакциях превращения минеральных форм азота и серы в органическую форму [102]. Учёт этих и других факторов приведёт к громоздкости математических построений и сложностям в редуцировании систем уравнений [41]. Хотя в дальнейшем, возможно, игнорирование отдельных процессов приведёт к неадекватному количественному описанию экспериментальных результатов; в этом случае схему придется дополнить [125].

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:



Вероятно, ключевым макроэргом, определяющим скорость энергообмена, является НАДФ·Н. Это может быть подтверждено тем, что восстановленная форма образуется только в результате нециклического транспорта электрона. В отличие от АТФ, который может образовываться как при нециклическом, так и при циклическом фотофосфорилировании [102].

4.2. Предельная скорость энергообмена

Базируясь на такой простейшей обобщённой модели, рост микроводорослей можно представить как процесс биосинтеза структур клетки из минеральных веществ за счёт энергии макроэргов, т. е. рост микроводорослей можно рассматривать как совокупность энергообменных реакций [125]. Соответственно, понятия скорости роста и скорости энергообмена являются эквивалентными, а предельные скорости энергообмена будут определять предельные скорости роста. Обозначим количество молекул макроэргов (веществ, обеспечивающих энергообмен), находящихся в высокоэнергетическом и низкоэнергетическом состоянии, через E_+ и E_- , соответственно, а их сумму через E_0 :

$$E_+ + E_- = E_0.$$

Скорость синтеза биомассы будет зависеть как от величины потока световой энергии, так и от величины потока минерального питания в клетку. Для динамически равновесного (стационарного) роста, скорости образования и расходования энергии в точке сопряжения будут пропорциональными количествам молекул макроэргов и равными:

$$\frac{dE_+}{dt} = \frac{dE_-}{dt}.$$

При лимитировании светом скорость роста будет определяться скоростью образования высокоэнергетических форм согласно кинетики первого порядка:

$$\frac{dE_+}{dt} = \mu_i \cdot E_0.$$

Положим, что общее количество макроэргов E_0 ограничено. Тогда с увеличением интенсивности светового потока скорость роста достигнет максимальной величины, определяемой максимальной скоростью энергообмена:

$$\left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{\max} = \mu_i^{\max} \cdot E_0,$$

где μ_i – удельная скорость энергообмена, определяемая интенсивностью действующего света и структурной организацией первичных фотохимических процессов фотосинтеза; $\mu_i^{\max}$ – максимальная удельная скорость энергообмена, не зависящая от света и определяемая только структурной организацией.

Аналогичная ситуация будет наблюдаться и для минерального лимитирования роста, при котором скорость расходования энергии (или образования низкоэнергетического состояния макроэргов) также будет ограничена:

$$\frac{dE_-}{dt} = \mu_s \cdot E_0,$$

$$\left(\frac{dE_-}{dt} \right)_{\max} = \mu_{\max}^s \cdot E_0,$$

где μ_s – удельная скорость энергообмена, определяемая потоком лимитирующего субстрата в клетку и структурной организацией системы биосинтеза; $\mu_{\max}^s$ – максимальная удельная скорость энергообмена, не зависящая от минерального питания и определяемая только структурной организацией системы биосинтеза.

Наиболее вероятным представляется вариант, при котором максимальные скорости ограничены реакциями в более крупных и сложных структурах клетки – метаболонах [64]. Биохимические преобразования субстрата происходят в мультиферментных комплексах, состоящих из большого числа различных ферментов. Такие структуры обеспечивают реакции энергообмена (окисления или восстановления) и включают транспортные, энзиматические и др. системы, которые требуют некоторого времени (время оборота фермента или переносчика) τ на каждый акт взаимодействия макроэрга с энергетическим или минеральным субстратом. Причём реакции окисления макроэргов (биосинтетические темновые реакции) и восстановления в общем случае могут происходить на разных ферментах и переносчиках, имеющих разную активность $\mu_{\max} = 1/\tau$. Точный общепринятый механизм сопряжения пока неизвестен. Рассмотрим механизм сопряжения скоростей, регулируемых одним ключевым ферментом или комплексом F_0 , например, ферредоксин-НАДФ-редуктазой [102, 265]. В этом случае активности ($\mu_{\max}^i = \mu_{\max}^s = \mu^e$) будут одни и те же:

$$\left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{\max} = \left(\frac{dE_-}{dt} \right)_{\max} = \mu^e F_0. \quad (4.1)$$

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 фермента, 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 ζ 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:

$$P_{max}^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{max} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \mu^e F_0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta f \mu^e B, \quad (4.2)$$

где θ^0 – коэффициент перевода энергетических единиц в единицы биомассы, который обычно называют калорийностью биомассы.

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 роста:

$$\mu_{max} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta f \mu^e. \quad (4.3)$$

По сути, определяемая таким образом максимальная удельная скорость роста должна бы являться параметром, не зависящим от внешних потоков минерального и энергетического (светового) питания микроводорослей. Величина этого параметра определяется только механизмом трансформации энергии и вещества в клетке, включая структурную характеристику – содержание ключевого регулятора энергообмена в биомассе клеток. В кинетическом смысле данная характеристика количественно отражает понятие, называемое в биокинетике лимитирующим звеном [139] или "узким местом" метаболизма [233].

4.3. Зависимость скорости синтеза биомассы микроводорослей от внешних потоков субстрата

При любом лимитирующем факторе (минеральном или энергетическом) скорость роста будет напрямую связана со скоростью энергообмена, причём результирующая скорость роста определяется минимальной величиной скорости энергообмена, которая, в свою очередь, зависит от наименьшего [221] из потоков минерального и светового питания. При минеральном дефиците скорость энергообмена будет ограничена скоростью окисления макроэргов, при световом лимитировании – скоростью их восстановления. На основе полученных выражений для максимальных скоростей энергообмена (4.2) и (4.3) можно получить количественные закономерности роста микроводорослей при лимитировании питания клеток светом и минеральными элементами, а также величины потока питания, при котором происходит смена лимитирующих факторов.

4.3.1. Кинетика светозависимого роста

Поглощение света микроводорослями определяется интенсивностью, спектром падающего света, а также оптическими свойствами самих клеток [135]. Для культуры

микроводорослей интенсивность поглощения фотонов (или энергии) можно выразить через интенсивность света, падающего на поверхность культуры (I_0), и коэффициент поглощения (α):

$$I_n = \alpha \cdot I_0.$$

Коэффициент поглощения является безразмерной величиной и зависит от спектральных свойств источника света и пигментного состава биомассы. Поглощенная пигментами энергия мигрирует по пигментной матрице к реакционным центрам фотосинтеза, в которых происходит их восстановление за счёт последовательной передачи электрона от воды к ферредоксин-НАДФ-редуктазе, где образуется высокоэнергетическая форма НАДФ·Н. Одновременно, в процессе транспорта электрона, восстанавливается АТФ. Таким образом, 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):

$$\frac{dE_+}{dt} = \varphi_e \cdot I_n.$$

В энергетических единицах выражение для скорости восстановления макроэргов можно выразить через интенсивность поглощения световой энергии I_e путем учёта энергии каждого фотона ($h\nu$):

$$I_e = (h\nu) \cdot I_n,$$

$$\varsigma \frac{dE_+}{dt} = \frac{\varphi_e}{(h\nu)} I_e.$$

Отсюда находим скорость синтеза биомассы микроводорослей как функцию скорости поглощения световой энергии или поверхностной облучённости культуры:

$$P^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \frac{dE_+}{dt} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \varphi_e I_n = \frac{\varphi_{max}}{\theta^0} \frac{I_e}{h\nu}, \quad (4.4)$$

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

В данном выражении скорость роста отнесена к единице освещаемой поверхности культуры и носит название чистой продуктивности культуры. Полученное выражение показывает прямолинейную зависимость между интенсивностью поглощения света и чистой продуктивностью культуры.

Для удобства запишем уравнение в нормированном виде:

$$P_{norm}^0 = \frac{P^0}{P_{max}^0} = \frac{\frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \frac{dE_+}{dt}}{\frac{\varphi^0}{\theta^0} \varsigma \left(\frac{dE_+}{dt} \right)_{max}} = \frac{\varphi_e I_n}{\mu^e F_0} = \lambda_i. \quad (4.5)$$

Записанное в таком виде уравнение показывает, что скорость синтеза биомассы, выраженная в нормированном виде, прямолинейно зависит от λ_i (количества квантов света, поступающих на одну молекулу ключевого комплекса за время его оборота). Фактически, эта величина представляет собой приведенную плотность потока субстрата, лимитирующего рост [114].

Однако скорость роста увеличивается с ростом освещённости до некоторого предела и ограничена максимальным значением (P_0^{max}), которое определяется внутренней структурой клеток микроводорослей. Используя принцип Блекмана [152] для смены лимитирующих факторов, можно записать уравнение зависимости скорости роста от интенсивности поглощения света в виде ломаной:

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_i; \lambda_i \leq 1 \\ 1; \lambda_i \geq 1 \end{cases} \quad (4.6)$$

4.3.2. Лимитирование роста биогенными элементами

При внешнем лимитировании роста минеральным питанием, скорость энергообмена будет ограничена скоростью поступления низкоэнергетических форм макроэргов в область сопряжения реакций энергообмена. В этом случае расход энергии будет линейно связан с окислением АТФ и НАДФ·Н, зависящим от скорости поступления молекул лимитирующего вещества. Если интенсивность потока биогенных элементов обозначить через I_s , а количество молекул макроэргов, необходимых для ассимиляции одной молекулы субстрата, через φ_s , то для скорости энергообмена можно записать:

$$\frac{dE_-}{dt} = \varphi_s I_s.$$

Отсюда находим скорость синтеза биомассы микроводорослей как функцию скорости потребления энергии макроэргов и связанную с ней скорость ассимиляции элементов питания:

$$P^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \frac{dE_-}{dt} = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \varphi_s I_s.$$

При нормировке относительно максимальной скорости последнее выражение примет вид:

$$P_{norm}^0 = \frac{\varphi_s I_s}{\mu^e F_0} = \lambda_s. \quad (4.7)$$

Полученные выражения справедливы для скоростей, не превышающих максимальную скорость энергообмена. Данная формула также справедлива только для скоростей, не превышающих максимальную, т. е. нормированные значения не должны превышать единицу. В итоге зависимость скорости роста от приведенной плотности потока элементов питания (λ_s),

при всех других оптимальных условиях внешней среды, в простейшем виде также можно представить в виде ломанной:

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_s; \lambda_s \leq 1 \\ 1; \lambda_s \geq 1 \end{cases} . \quad (4.8)$$

4.3.3. Линейные сплайны как способ описания смены лимитирующих факторов

В реальности рост культуры микроводорослей при неизменных условиях происходит исключительно в специальных системах культивирования (плотностат). Такие системы позволяют стабилизировать не только световое питание клеток, но и стабилизировать уровень их минерального питания, вплоть до их полного обеспечения энергией и элементами, и достигать максимальных значений скорости роста, ограниченных только внутренними видоспецифическими свойствами.

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

$$P_{norm}^0 = \begin{cases} \lambda_s; \lambda_s \leq \lambda_i \\ \lambda_i; \lambda_s \geq \lambda_i \\ 1; \lambda_i \geq 1, \lambda_s \geq 1 \end{cases} . \quad (4.9)$$

На рис. 4.2 графически представлены зависимости скорости «чистого» фотобиосинтеза микроводорослей от обеспеченности элементами питания при различном световом обеспечении клеток, рассчитанные по обобщённому уравнению (4.9). Здесь скорость нормирована относительно максимального значения, измеренного для насыщающих ($\lambda_i \geq 1$) интенсивностей света. На рисунке видно, что с увеличением потока элементов минерального питания в клетку (например, за счёт увеличения концентрации данного элемента в среде) скорость роста микроводорослей увеличивается только до некоторого значения, определяемого заданными световыми условиями. За счёт увеличения потока минерального питания увеличить скорость роста выше этого значения можно только при одновременном повышении уровня освещения. Т. е. точки пересечения прямых на приведенном графике соответствуют значению потоков светового и минерального питания и, соответственно, скорости роста, при которых происходит смена лимитирующего фактора. Максимальные значения скорости роста достигаются при значениях приведенных плотностей потоков светового и минерального питания, превышающих единицу [125].

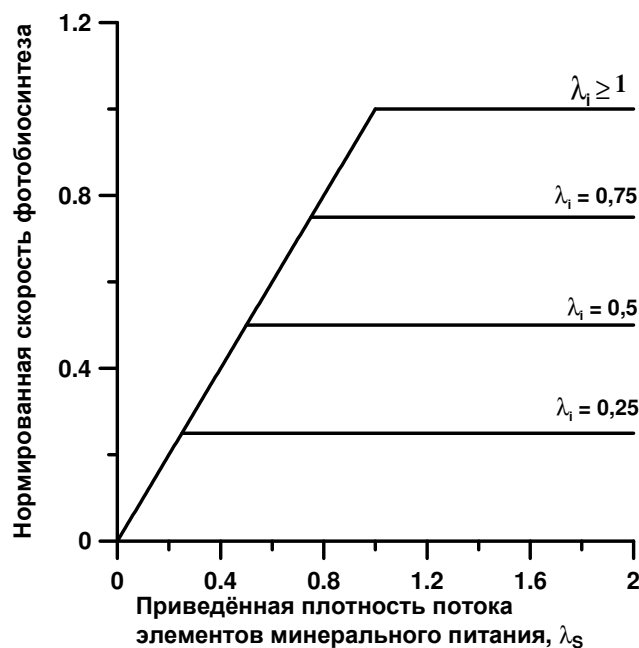


Рисунок 4.2 Зависимости скорости «чистого» фотобиосинтеза от приведенной плотности потока элементов минерального питания при различной приведенной плотности потока светового обеспечения

Аналогичную картину можно получить и для семейства прямых, описывающих зависимости скорости от приведенной плотности потока фотонов при различном минеральном обеспечении клеток микроводорослей (рис. 4.3). Здесь скорости также нормированы относительно максимального значения, измеренного для насыщающих потоков светового и минерального питания. В этом случае повышение интенсивности освещения клеток приведёт к увеличению скорости роста только при одновременном повышении потока минерального питания в клетку. Точки пересечения прямых на приведенных графиках соответствуют точкам на кривой накопительной культуры микроводорослей, в которых происходит смена лимитирующих факторов.

В случае накопительной культуры эти точки отражают окончание экспоненциальной фазы роста. Это позволяет экспериментально исследовать зависимость скорости роста от интенсивности действующего света, используя результаты, полученные в периодическом режиме выращивания клеток. Кроме того, наличие линейной фазы в таких культурах позволяет исследовать зависимость скорости роста от углеродного обеспечения клеток.

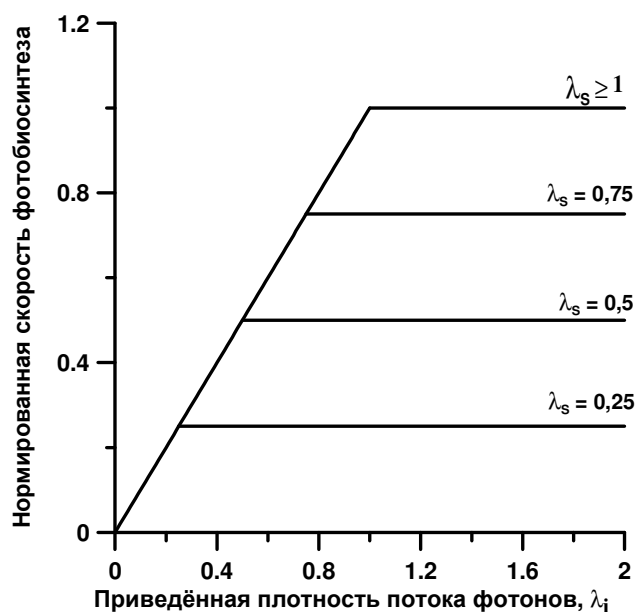


Рисунок 4.3 Зависимости скорости «чистого» фотобиосинтеза от приведенной плотности потока фотонов при различной приведённой плотности потока элементов минерального питания

На практике обычно наблюдаются отклонения скорости «чистого» фотобиосинтеза от приведенной плотности потока, заданное в виде линейных сплайнов (4.9). Это обусловлено переходными процессами, которые протекают в культуре при изменении облучённости, потока субстрата, pH, температуры и др. параметров среды. В таких условиях происходят постоянные изменения структурной организации ключевого ферментного комплекса, регулирующего энергообменные реакции, его активности, эффективности преобразования субстрата. 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 [125].

4.4. Ограничение роста микроводорослей внутриклеточными потоками субстрата

Исходя из обобщённой схемы фотобиосинтеза (рис. 4.1), влияние того или иного фактора среды на продуктивность микроводорослей выражается не напрямую, а через процессы восстановления и окисления макроэргов. Многие виды микроводорослей являются облигатными фотоавтотрофами (особенно ярко это выражено у некоторых видов синезелёных водорослей), для них характерно разделение процессов энергетического и конструктивного метаболизма, а единственным источником энергии для синтеза биомассы являются АТФ и НАДФ·Н. Соответственно в клетках микроводорослей разделены и потоки энергетического и

минерального питания. Например, при недостатке CO_2 в клетках будут накапливаться восстановленные формы НАДФ•Н и АТФ, так как не будет происходить их отток на синтез фосфолирированных сахаров и других продуктов цикла Кальвина. При нехватке азота будет ограничен (остановлен) синтез аминокислот, полипептидов, биосинтез будет направлен в сторону образования углеводов и липидов за счёт энергии макроэргов. В случае отсутствия света, макроэрги будут находиться в окисленных формах НАДФ⁺ и АДФ, поступление энергии для биосинтеза возможно только за счёт внутриклеточных запасных веществ, к которым, в первую очередь, относятся углеводы. Экспериментально обнаружено, что за ночь содержание углеводов в органической массе спироулины уменьшалось почти вдвое, с 34 до 19 %, а содержание белка увеличивалось с 57 до 71 % при незначительном уменьшении доли липидов [268]. В течение дня пропорции биохимических компонентов клеток возвращались к исходным величинам. Аналогичные данные были получены и для планктонных водорослей, причём авторы наблюдали прямую корреляцию между уменьшением углеводов и скоростью дыхания [228].

Общее уравнение (4.9), задающее скорость синтеза биомассы от приведённой плотности потока субстрата в виде линейных сплайнов, может быть записано как для внешних потоков, так и для потоков лимитирующего субстрата внутри клетки [70]. Рассмотрим двухкомпонентную модель, подразумевающую наличие в биомассе B двух основных макромолекулярных форм – структурной B_{str} и резервной B_{res} :

$$B = B_{str} + B_{res}.$$

Резервная часть биомассы представлена липидами, углеводами, различными интермедиатами, которые могут накапливаться в клетках при тех или иных условиях. Например, фосфорилированные моносахара, образованные в цикле Кальвина, аминокислоты, олигопептиды. Также к резервной биомассе отнесём вещества, которые могут быть использованы как источник энергетического и пластического субстрата при неблагоприятных внешних условиях (фикобилипротеины и др.).

К структурной части биомассы отнесём белки, липиды, углеводы и др. компоненты (в т. ч. функциональные), которые непосредственно входят в состав клеточных органелл либо, как ферменты, участвуют в биосинтетических реакциях. Важно отметить, что структурные компоненты биомассы находятся в строго определённых соотношениях и могут быть выражены друг через друга [129].

Исходя из схемы сопряжения световых и темновых реакций у микроводорослей (см. рис. 4.1), скорость синтеза структуры определяется количеством резервной биомассы. По аналогии с (4.7), приведённая плотность потока резервной биомассы λ_r на ключевой ферментный комплекс F_0 за время его оборота ($1/\mu^e$) имеет вид:

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

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:

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

Обозначим через ε величину соотношения структурной и резервной биомассы:

$$\varepsilon = \frac{B_{res}}{B_{str}}.$$

Получим:

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

Последнее выражение связывает величину приведённой плотности потока с измеряемым биохимическими методами параметром. При условии постоянства кинетических констант будет иметь место прямо пропорциональная зависимость λ_r от ε . Однако, в общем случае, активность ключевого ферментного комплекса и эффективность преобразования резервной биомассы могут изменяться в зависимости от физико-химических параметров среды, структурной организации комплекса и пр.

Таким образом, скорость синтеза структуры будет увеличиваться с ростом величины ε до определенного предела ε_{sat} , после чего скорость станет максимальной и будет определяться только количеством ключевого ферментного комплекса и его активностью. При единичном потоке соотношение ε будет равным:

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

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

$$\lambda_r = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_{sat}}.$$

Если соотношение ε больше либо равно некоторому насыщающему значению ε_{sat} , нормированная на максимальную μ_{mrs}^{norm} скорость синтеза структуры будет максимальной. При $\varepsilon < \varepsilon_{sat}$, скорость будет линейно зависеть от ε :

$$\mu_{str}^{norm} = P_{str}^{norm} = \frac{1}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon; & \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}; & \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases}. \quad (4.10)$$

Наблюдаемая (измеряемая) скорость образования структурной части биомассы будет определяться скоростью синтеза согласно (4.10) и распада. Примем, что удельная скорость распада структуры постоянна и равна μ_r . Окончательно выражение, описывающее изменение концентрации структурной биомассы имеет вид:

$$\frac{dB_{str}}{dt} = \frac{\mu_{mrs} q_{rs}}{\varepsilon_{sat}} B_{str} \begin{cases} \varepsilon; \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}; \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r B_{str},$$

где q_{rs} – коэффициент, учитывающий энергетические потери при преобразовании резервной биомассы в структурную.

Последнее выражение учитывает, что не вся резервная биомасса превращается в структурную. Очевидно, что для синтеза структуры необходима энергия в виде АТФ, которая может поступать в область реакции напрямую от фотосинтеза, либо образовываться при дыхании в процессе расщеплении резервной части биомассы. Известно, что транспорт АТФ через мембрану хлоропластов и митохондрий осуществляется через сложную транспортных каналов, в т. ч. посредством образования промежуточных соединений [132, 247]. Таким образом, энергия, необходимая для обеспечения процессов биосинтеза в цитоплазме (или наоборот в пластидах), поступает в виде АТФ через некоторые интермедиаты, которые безусловно относятся к резервным формам биомассы. Поэтому будем считать, что часть резервной биомассы $(1 - q_{rs})$, используется на энергетические затраты, связанные с биосинтезом структуры [70].

В случае светового лимитирования скорость образования резервной составляющей биомассы микроводорослей будет определяться приведённой плотностью потока квантов в области ФАР согласно (4.9). Если скорость синтеза некоторых промежуточных соединений (интермедиатов) выше скорости образования структуры, то в клетке будут накапливаться резервные соединения, в противном случае количество интермедиатов будет уменьшаться. Отметим, что уравнения (4.9) и (4.10) эквивалентны, однако (4.9) отражает суть лимитированного роста, в то время как (4.10) – удобная в практическом плане форма записи через биохимически определяемую величину ε . Систему уравнений, описывающую динамику трансформации структурных и ресурсных форм биомассы микроводорослей при фотоавтотрофном росте можно представить в виде:

$$\begin{cases} \frac{dB_{str}}{dt} = \frac{\mu_{mrs} q_{rs}}{\varepsilon_{sat}} B_{str} \begin{cases} \varepsilon; \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}; \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r B_{str} \\ \frac{dB_{res}}{dt} = \mu_m B_{str} \begin{cases} \lambda_i; \lambda_i < 1 \\ 1; \lambda_i \geq 1 \end{cases} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{str} \begin{cases} \varepsilon; \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}; \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} \end{cases} \quad (4.11)$$

где μ_{rs} – удельная скорость трансформации ресурсных веществ в структурные, μ_r – удельная скорость естественного распада структур, λ_i – нормированная на максимальную внешняя облучённость (приведённая плотность потока квантов).

Таким образом, если рассматривать влияние света на роста культуры микроводорослей, можно сделать вывод, что продуктивность в целом зависит как от условий освещения (λ_i), так и от соотношения ресурсных и структурных составляющих биомассы клеток (ε) [126]. Аналогичную систему можно записать при ограничении роста культуры газовой составляющей. В этом случае приведённую плотность потока квантов света λ_i необходимо заменить на приведённую плотность потока углекислого газа на ключевой регулятор энергообмена, в качестве которого в данном случае необходимо рассматривать РБФК [78].

Система (4.11) является следствием модельных представлений (4.9) или (4.10) об энергообмене микроводорослей, которые задают нормированную скорость от приведённой плотности потока субстрата в виде ломаных – линейных сплайнов [70, 74]. Достоинством предлагаемого подхода является чёткое определение точки смены лимитирующего фактора или звена, если рассмотреть поток субстрата внутри клетки. В окрестностях этой точки возможны отклонения экспериментальных данных от идеализированной ломанной. Для повышения точности описания экспериментальных данных мы можем разбить кривую на большее количество участков, каждый из которых опишем линейным сплайном. Метод линейных сплайнов или метод касательных широко применяется во многих науках, позволяя описать сложные процессы простыми уравнениями [1]. Моделирование кинетики фотосинтеза на клеточном уровне [114] показало, что внутренняя организация "узкого места" метаболизма определяет характер зависимости скорости процесса от приведённой плотности потока: чем лучше организована система, тем ближе эта зависимость к ломаной (4.9). Самой низкопродуктивной организации соответствует гиперболическая зависимость, выражаемая уравнением Михаэлис-Ментен.

4.5. Моделирование скорости фотобиосинтеза линейными сплайнами

4.5.1. Мгновенные световые кривые

Световая кривая фотосинтеза представляет собой зависимость скорости выделения кислорода или скорости поглощения углерода от внешней облучённости. Обычно скорость фотосинтеза нормируют на хлорофилл a , клеточный углерод либо на число клеток [226]. В общем случае, кривую фотосинтеза можно разделить на светолимитированную область, области насыщения и фотоингибирования. Количественно кривая характеризуется начальным углом наклона α и максимальной скоростью фотосинтеза P_m .

Необходимость количественного описания фотосинтетических кривых обусловлена тем, что моделирование фотосинтеза является первым этапом при разработке прогностических моделей первичной продукции фитопланктона. В литературе приводится множество математических моделей, которые описывают зависимость скорости фотосинтеза P от облучённости I , например, ломаная Блэкмана [152], гипербола Бэйли [146], группа экспоненциальных моделей Стилла [262], Горского [199], Филипповского [133], гиперболический тангенс Плата [209], степенные зависимости, полученные на базе формализма теории массового обслуживания [114], двухэкспоненциальные модели, учитывающие фотоингибирование [243], численные модели, основывающиеся на всей полноте современных знаний о процессах фотосинтеза [100, 131, 279].

Такое огромное количество подходов к описанию фотосинтетических кривых свидетельствует об отсутствии единой общепринятой теории роста микроводорослей. Покажем возможность применения линейных сплайнов при моделировании световых кривых фотосинтеза [72]. Будем рассматривать только мгновенные световые кривые фотосинтеза: чем больше время измерения фотосинтеза, тем больше вероятность того, что за время измерения в клетках микроводорослей произойдут изменения пигментного и биохимического состава. Экспериментально показано [226], что скорость фотосинтеза, определённая по кислороду может отличаться 10 – 50 % от таковой по углероду. Очевидно, что эти методы определяют различные отклики фотосинтетического аппарата клеток микроводорослей на внешнее воздействие. Так выделение кислорода происходит на мембране тилакоидов при восстановлении реакционного центра фотосистемы 2, в то время как фиксация углерода происходит в строме хлоропласта в реакциях цикла Кальвина за счёт энергии макроэргов НАДФ·Н и АТФ. Кроме того, немаловажным является степень адаптации клеток микроводорослей к конкретному уровню облучённости. В этом плане интерес представляют данные по фотосинтезу, которые получены для культур микроводорослей в плотностатном режиме культивирования. В таких условиях клетки адаптируются к заданному уровню облучённости, происходит стабилизация биохимического состава, исключается влияние биогенных элементов питательной среды и др. факторов, что невозможно добиться при накопительном культивировании, либо при анализе проб фитопланктона.

Скорость фотосинтеза P , нормированная на концентрацию хлорофилла a , в литературе носит название ассимиляционное число хлорофилла a :

$$A = \frac{P}{\pi},$$

где π – концентрация хлорофилла a .

Максимальная ассимиляционное число хлорофилла a запишется как:

$$A_m = \frac{P_m}{\pi}.$$

Согласно предлагаемой линеаризированной модели (4.9), максимальная скорость "чистого" фотосинтеза пропорциональна общему количеству ключевого фермента (или переносчика) F_0 :

$$P_{max}^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \mu^e F_0.$$

Для области светолимитирования, скорость "чистого" фотосинтеза определяется потоком энергии I_e в области ФАР:

$$P^0 = \frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \varphi_e I_e,$$

Наблюдаемая скорость будет определяться скоростью "чистого" фотосинтеза и скоростью эндогенного расхода:

$$P = P^0 - P_r.$$

Аналогично, для максимальной скорости фотосинтеза:

$$P_m = P_{max}^0 - P_r.$$

Таким образом, при условии неизменности пигментного и биохимического состава клеток ($\pi = const$, $F_0 = const$), зависимость ассимиляционного числа хлорофилла a от облучённости может быть выражена линейными сплайнами:

$$A = \begin{cases} \frac{P_0 - P_r}{\pi}, I_e < I_{sat} \\ \frac{P_{max}^0 - P_r}{\pi}, I_e \geq I_{sat} \end{cases} = \begin{cases} \frac{\frac{\varphi^0 \zeta \varphi_e}{\theta^0} I_e - P_r}{\pi}, I_e < I_{sat} \\ \frac{\frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \mu^e F_0 - P_r}{\pi}, I_e \geq I_{sat} \end{cases}. \quad (4.12)$$

Насыщающую облучённость I_{sat} определяем из условия $-I_e = I_{sat}$, $A = A_m$:

$$I_{sat} = \frac{\mu^e F_0}{\varphi_e}.$$

Последнее выражение показывает, что величина насыщающей облучённости, а, следовательно, и максимальной скорости фотосинтеза, определяется не только числом и активностью ключевого регулятора энергообмена, а также числом молекул макроэрга, восстанавливающихся за счёт одного кванта. Параметр φ_e можно считать константой – известно [137], что для фиксации одной молекулы CO_2 необходимо 8 – 10 квантов света. Можно сделать вывод, что адаптация клеток микроводорослей к разным облучённостям выражается в

изменении параметра $\mu_e \cdot F_0$. Кроме того, величина ассимиляционного числа будет определяться содержанием хлорофилла a в клетках на момент снятия кривой фотосинтеза [72].

Подобные утверждения не противоречат известным на сегодняшний день механизмам адаптации клеток микроводорослей к различным уровням обеспеченности световой энергией. Так для различных систематических групп микроводорослей отмечено уменьшение количества хлорофилла a и других пигментов с ростом облучённости [182, 183, 196, 211]. Также изменяются соотношения между различными фотосинтетическими пигментами [181, 237, 257], наиболее значимое из которых носит название "размер фотосинтетической единицы" и может быть выражено как отношение хлорофилла a к количеству реакционных центров фотосинтеза. На основе применения формализма теории массового обслуживания при моделировании мгновенных световых кривых фотосинтеза [113] показано, что адаптация микроводорослей к различным световым условиям может выражаться как в изменении количества реакционных центров фотосинтеза (мультицентральная организация), так и в образовании "пула" переносчиков перед лимитирующим компонентом электрон транспортной цепи. Как для первого, так и для второго случая адаптация может быть выражена в изменении размера фотосинтетической единицы.

Анализируя (4.12), можно сделать вывод, что скорость фотосинтеза в области светолимитирования определяется не только облучённостью, но и содержанием хлорофилла a . К аналогичному выводу пришли и в [226], где показано, что начальный угол наклона кривой фотосинтеза определяется именно содержанием хлорофилла a , а величина максимальной скорости фотосинтеза – клеточным содержанием углерода. Согласно предлагаемого подхода, максимальная скорость фотосинтеза прямо пропорциональна количеству и активности ключевого регулятора энергообмена ("узкое место" метаболизма), содержание которого может быть выражено и через углерод клетки. Однако последние исследования говорят о том, что следует отличать структурные и резервные формы углерода. Содержание структурных форм можно считать прямо пропорциональным любому структурному компоненту биомассы, например, хлорофиллу a , либо белку [70, 104], то количество резервных (ресурсных, запасных) углеводов в клетках микроводорослей является крайне вариабельной величиной и изменяется в широком диапазоне.

Для верификации (4.12) рассмотрим данные [225]. Здесь приведены фотосинтетические кривые для морской диатомовой водоросли *Skeletonema costatum*, клетки которой адаптированы к высокой ($1200 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) и низкой ($50 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) облучённости (рисунок 4.4 А). Для высокой облучённости кривая с высокой точностью ($R^2 = 0,96$) описывается линейными сплайнами согласно (4.12) (рисунок 4.4 Б). Следовательно, выполняется условие о постоянстве пигментного и биохимического состава клеток.

Кривая фотосинтеза для низкой облучённости не описывается линейными сплайнами (4.12) (область фотоингибирования в данной работе не анализировалась). Это говорит о том, за время измерения фотосинтеза, а он составляло 30 мин [225], в клетках *S. costatum* происходили изменения содержания хлорофилла, размера фотосинтетической единицы. Как и в первом случае определим нормирующие множители I_{sat} и P_m (рисунок 4.5 А). При нормировке данных (для каждой кривой скорость фотосинтеза разделим на максимальную, величину облучённости на соответствующую насыщающую), фактор адаптации клеток, вызывающий отклонение экспериментальных данных от ломаной (4.12), сокращается. В нормированном виде все значения для высокой и низкой облучённости ложатся на одну кривую (рис. 4.5 Б), которая, с учётом компенсационного пункта фотосинтеза, описывается линейными сплайнами (4.9).

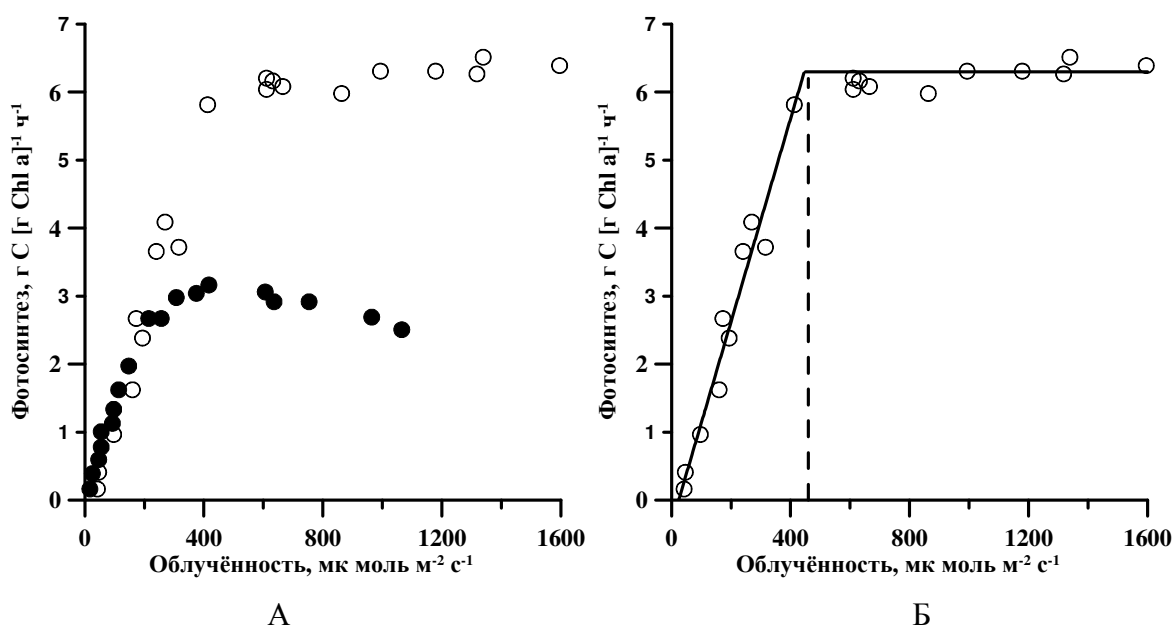


Рисунок 4.4 А – кривые фотосинтеза для *S. costatum* адаптированной к высокой (белые маркеры) и низкой (чёрные маркеры) облучённости [225]. Б – аппроксимация экспериментальных данных для высокой облучённости линейными сплайнами (4.12) ($R^2 = 0,96$). Пунктирная линия показывает графический способ определения насыщающей облучённости, $I_{sat} = 450 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$

Таким образом, показана принципиальная возможность применения линейных сплайнов при моделировании кривых фотосинтеза. Определив нормирующие множители (P_{max}^0 и I_{sat}), мы можем судить о предыстории культуры. Отношение данных параметров показывает, как меняется эффективность преобразования энергии при адаптации клеток к тем или иным световым условиям [72]. Конечно, необходимо указать недостатки используемого подхода. К ним можно отнести недостаточную точность описания данных в окрестностях точки перегиба (смены лимитирующего фактора). Для повышения точности описания экспериментальных

данных мы можем разбить кривую на большее количество участков, каждый из которых опишем линейным сплайном.

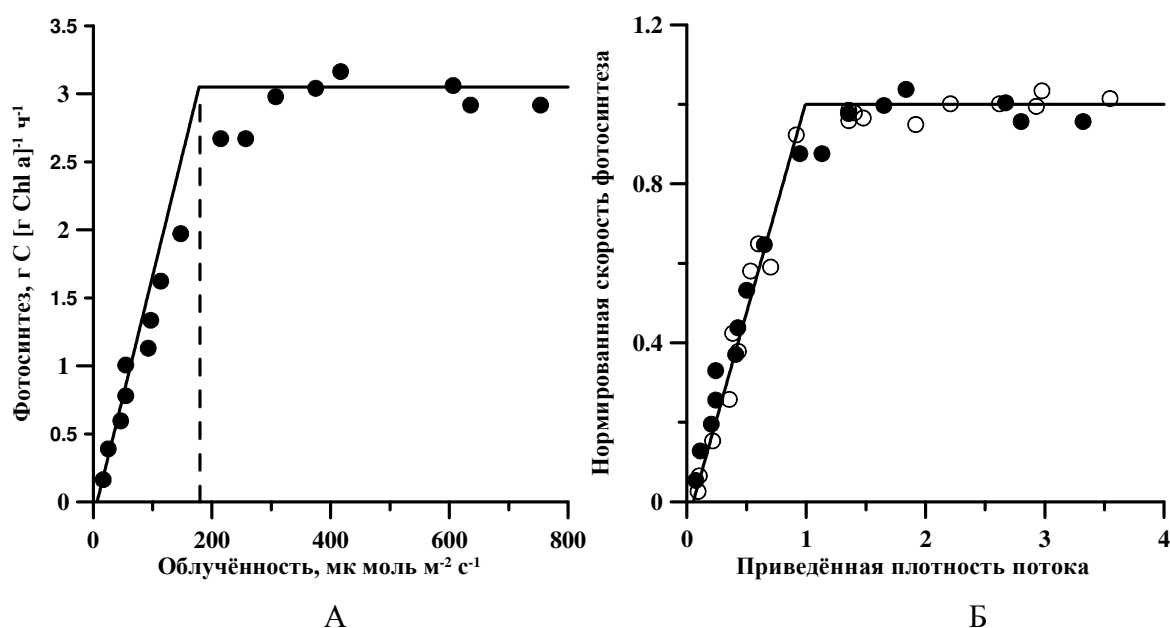


Рисунок 4.5 А – кривая фотосинтеза для *S. costatum* адаптированной к низкой облучённости [225]. Графический способ определения насыщающей облучённости, $I_{sat} = 178$ мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Б – нормированные (см. пояснения в тексте) экспериментальные данные для высокой и низкой облучённости. Аппроксимация экспериментальных данных линейными сплайнами (4.9) ($R^2 = 0,96$)

Для сравнения приведём пример использования линейных сплайнов при описании мгновенных световых кривых культуры *Chlorella pyrenoidosa*, адаптированной к различным интенсивностям света [234]. Культуры выращивали в непрерывном режиме при различных удельных скоростях протока. После достижения стационарного динамического равновесия (окончания переходных адаптационных процессов) снимали мгновенную световую кривую (см. рисунок 4.6). Для каждой экспериментальной кривой определим насыщающую плотность потока квантов, поглощаемых культурой, и максимальную скорость фотосинтеза (ассимиляционное число хлорофилла a). Для этого аппроксимируем начальный участок световой кривой линейной функцией и определим угол наклона полученной прямой. Для каждой кривой отбирались первые три – пять точек (линейный участок). Также графически определим величину максимальной скорости.

Величина насыщающей плотности потока квантов для опытного варианта $\mu = 0,35$ составила 33 мВт/см^2 , при этом максимальная скорость фотосинтеза равняется $107 \text{ моль } \text{O}_2/(\text{хл. а.} \cdot \text{час})$. Для $\mu = 0,78$ эти величины составили $40,58 \text{ мВт/см}^2$ и $160 \text{ моль } \text{O}_2/(\text{хл. а.} \cdot \text{час})$

соответственно. Отметим, что для первой кривой ($\mu = 0,35$) экспериментальные данные ближе к ломанной, которая соответствует идеальной организации системы [114].

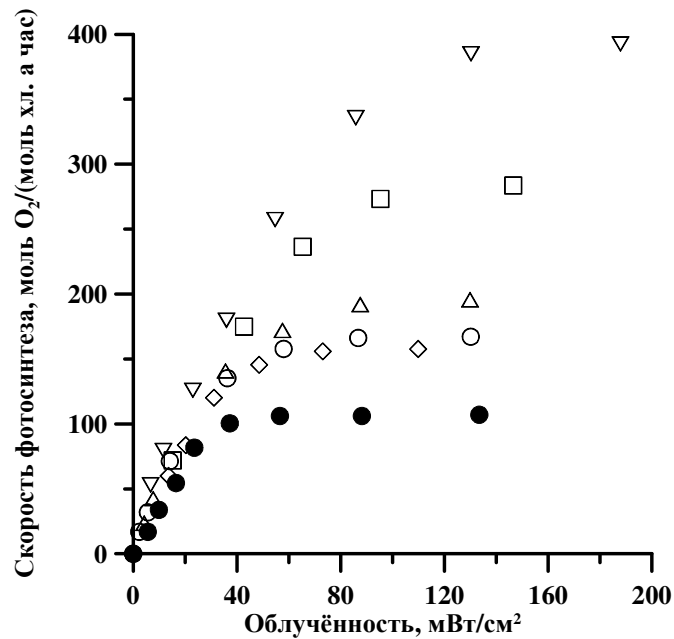


Рисунок 4.6 Зависимость скорости фотосинтеза от интенсивности света для *Ch. pyrenoidosa*, выращенной в непрерывной хемостатной культуре с разной удельной скоростью потока среды (● – 0,35, ◇ – 0,78, ○ – 1,3, △ – 1,8, □ – 2,3, ▽ – 2,4 сут⁻¹) [234]

Значения величины насыщающей плотности потока квантов, максимальной скорости фотосинтеза и их соотношение сведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Величина насыщающей плотности потока квантов, максимальная скорость фотосинтеза и их соотношение при разных μ по данным [234]

	0,35	0,78	1,3	1,8	2,3	2,4
I_{sat}	33	40,58	33,51	48,98	68,76	76,25
A_m	107	160	167	198	286	400
A_m/I_{sat}	3,24	3,94	4,98	4,04	4,15	5,24

Полученные результаты говорят о том, что адаптация клеток микроводорослей к новым световым условиям выражается в изменении активности μ_e и количества ключевого регулятора энергообмена F_0 , приходящихся на единицу хлорофилла. Такое предположение не противоречит выводу, который сделан в работе [113], что адаптация проявляется в изменении размера фотосинтетической единицы, т. е. общего количества реакционных центров, приходящихся на весь хлорофилл. Для каждой мгновенной кривой фотосинтеза отношение

A_m/I_{sat} с учётом определённой ранее максимальной скорости (4.2) будет зависеть от количества хлорофилла a :

$$\frac{A_m}{I_{sat}} = \frac{\frac{\varphi^0}{\theta^0} \zeta \mu^e F_0}{\frac{\mu^e F_0}{\varphi_e}} = \frac{\varphi^0 \varphi_e \zeta}{\theta^0 \pi}.$$

Как видно из последнего выражения, с уменьшением концентрации хлорофилла a соотношение A_m/I_{sat} будет увеличиваться. Это подтверждается экспериментальными данными, приведёнными в таблице 4.1: адаптация клеток микроводорослей к высоким скоростям роста и, как следствие, к высоким освещённостям сопровождается уменьшением концентрации фотосинтетических пигментов. Кроме того, при переходе с одних световых условий к другим, в клетках происходит изменение количества и соотношения основных биохимических компонентов [117]. Следовательно, при переходных процессах будет изменяться и калорийность биомассы микроводорослей θ^0 .

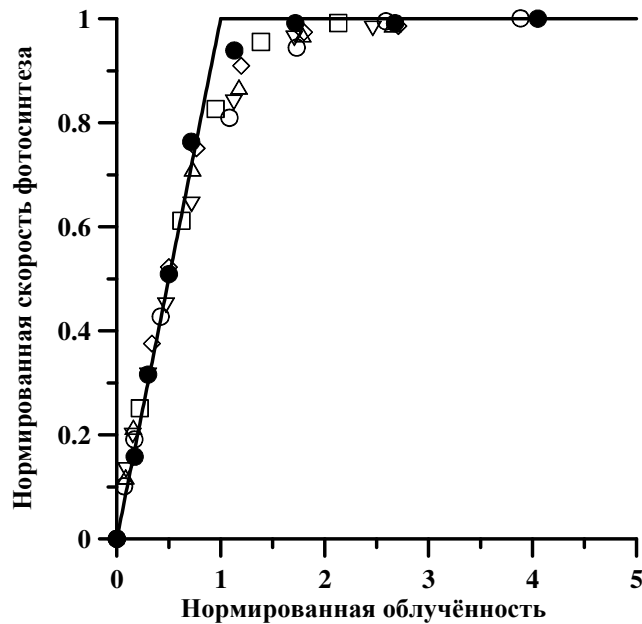


Рисунок 4.7 Зависимость нормированной скорости фотосинтеза от нормированной интенсивности света (приведённой плотности потока λ) для микроводорослей, выращенных в непрерывной хеостатной культуре с разной удельной скоростью протока среды ($\bullet$ – 0,35, $\diamond$ – 0,78, $\circ$ – 1,3, Δ – 1,8, $\square$ – 2,3, ∇ – 2,4 сут⁻¹) [234]. Линия – описание экспериментальных данных линейными сплайнами (4.12)

Аппроксимация нормированных экспериментальных данных выражением (4.12) представлена на рисунке 4.7, углы наклона A_m/I_{sat} и максимальные значения скорости фотосинтеза представлены в таблице 4.1. Отметим, что в окрестностях точки переключения

лимитирующего фактора ($I_e = I_{sat}$) имеем отклонения ломанной от экспериментальных данных. Это обусловлено тем, что модель ломаной подразумевает адаптацию клеток микроводорослей к внешним условиям. Адаптация может выражаться различными способами: изменение размера фотосинтетической единицы, изменение количества ключевых регуляторов энергообмена или их активности, перестройка биохимического состава клеток и др. Однако в любом случае при работе с культурами микроводорослей в управляемых условиях, особенно на протоке, зависимость скорости фотосинтеза от облучённости довольно близка к идеализированной ломаной [72, 125].

4.5.2. Поглощение нитратов микроводорослями

Рассмотрим пример применения метода линейных сплайнов при моделировании ассимиляции азота клетками красных микроводорослей. Как отмечено выше, константы уравнения Михаэлиса – Ментен изменяются в широком диапазоне, что связано с изменением структурной организации клеток микроводорослей при их адаптации к тем или иным условиям среды, в т. ч. и световым.

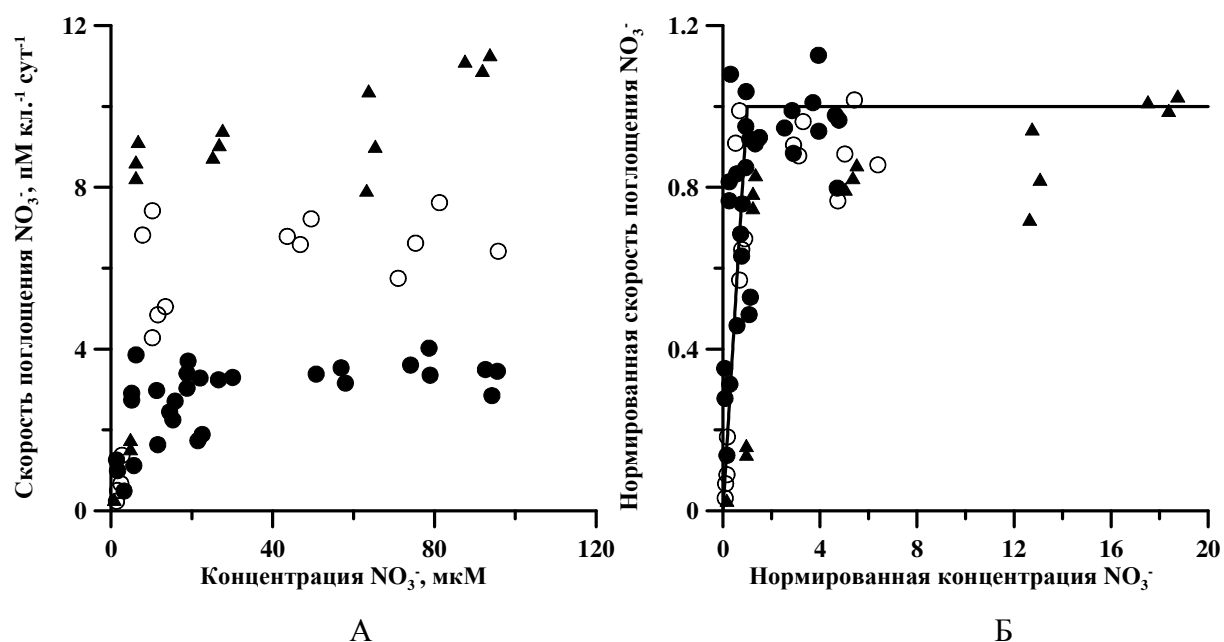


Рисунок 4.8 А – Зависимость скорости поглощения нитратов от их концентрации в среде при различных облучённостях [218]: 10 мкЭ•м²•с⁻¹ (●); 50 мкЭ•м²•с⁻¹ (○); 100 мкЭ•м²•с⁻¹ (▲). В – данные в нормированном виде. Линии – аппроксимация линейными сплайнами

Очевидно, что интенсивность света определяет максимальную скорость поглощения нитратов, т. к. их транспорт через клеточную мембрану происходит с участием нескольких ферментов-переносчиков, для функционирования которых необходима энергия в виде АТФ

[258]. Например, на рисунке 4.8 представлена кинетика поглощения азота культурой *Prorocentrum micans* при различной интенсивности света [218].

Если для каждой кривой величину скорости поглощения нормировать на максимальное её значение, а концентрацию нитратов нормировать на насыщающую величину (при которой скорость достигает максимума), то все точки лягут на одну кривую, которая может быть описана линейными сплайнами (см. рис. 4.8). Следовательно, адаптация к изменившимся световым условиям проявляется в изменении активности или количества ключевого ферментного комплекса, отвечающего за поглощение азота.

4.5.3. Зависимость максимальной удельной скорости роста от температуры

На рост микроводорослей влияют множество экологических факторов, которые можно условно разделить на 3 группы: световые условия, газовая составляющая, минеральные компоненты питательной среды. Помимо этих факторов, продуктивность культуры также зависит от pH среды и температуры, которые определяют поступление питательных веществ в клетку, конформацию макромолекул, кинетику биохимических реакций [6, 19, 125]. На практике промышленное выращивание водорослей осуществляется в условиях естественного освещения при широком варьировании температуры [251]. Учёт температурной зависимости удельной скорости роста позволит прогнозировать величину урожая и продукции основных биохимических составляющих клеток. Например, одним из самых распространённых объектов биотехнологии является цианопрокариота *Arthrospira (Spirulina) platensis* [158]. Оптимальный температурный диапазон, при котором выращивают *A. platensis*, находится в пределах 25 °C – 35 °C. В работе [215] показано, что при низкой (20 °C) и высокой (40 °C) температурах у спиролины не наблюдалась экспоненциальной фазы. Следовательно, экстремальные температуры не обеспечивают реализацию максимальных скоростей роста. Кроме того, при температуре 45 °C наблюдалось отсутствие деления клеток с исчезновением их пигментации. Продуктивность культуры *A. platensis* увеличивалась с повышением температуры и была максимальной при 35 °C. Затем она снижается при дальнейшем повышении температуры из-за уменьшения концентрации хлорофилла и других пигментов [158]. Процессы фотосинтеза, дыхания и роста в целом замедляются при превышении значений оптимальных температур в результате дисбаланса между потреблением энергии, производством АТФ и инактивации или денатурации белков, участвующих в фотосинтезе.

Удельная скорость роста культуры микроводорослей зависит от различных факторов внешней среды, в том числе и от температуры. Для периодической культуры μ изменяется в зависимости от фазы роста. На экспоненциальной фазе она постоянна и максимальна, затем уменьшается, достигая нуля при остановке роста культуры. Как указано выше, μ_m зависит от

доли ключевого фермента f , которую для экспоненциальной фазы можно считать постоянной, и его активности μ_e , которая и определяется температурой. Поэтому корректно оценить влияние температуры на рост микроводорослей возможно только в экспоненциальной фазе или плотностате [54]. Далее следующие фазы роста характеризуются лимитированием продуктивности культуры светом, биогенными элементами, метаболитами, которые, накапливаясь в среде, при определенной концентрации могут препятствовать нормальному протеканию биохимических процессов, обмена веществ, уменьшается число делений клеток [20].

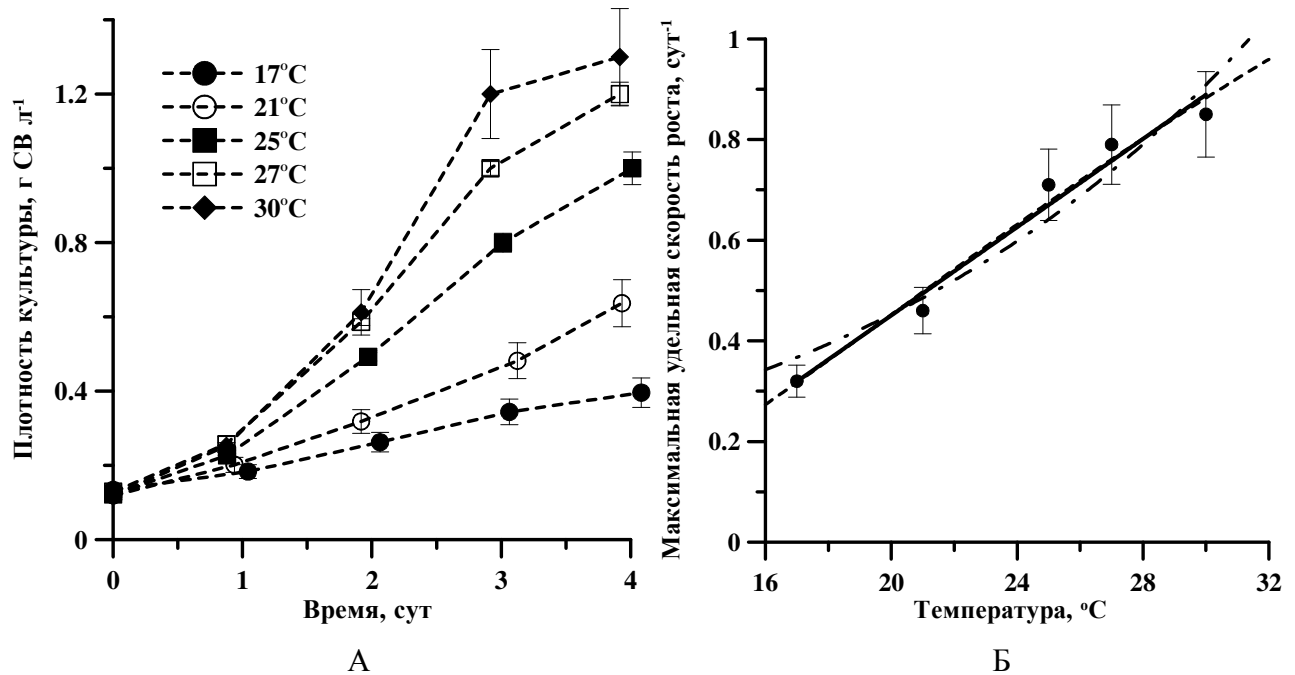


Рисунок 4.9 А – накопительные кривые роста культуры *A. platensis* при различной температуре. В – зависимость максимальной удельной скорости роста от температуры. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением Вант-Гоффа (1.37) – штрихпунктирная линия; уравнением Аррениуса (1.38) – пунктирная линия; линейной регрессией (4.13) – сплошная линия. Значения коэффициентов в тексте

На рисунке 4.9 представлены накопительные кривые роста культуры *A. platensis* и максимальная удельная скорость при различных значениях температуры. Для удобства расчётов и дальнейшего использования полученных результатов единицы измерения температуры – градусы Цельсия.

Обычно температурная зависимость скорости роста моделируется с помощью классических выражений Вант-Гоффа (1.37) и Аррениуса (1.38). В качестве альтернативного подхода рассмотрим возможность применения линейных сплайнов для описания

температурной кинетики роста [54]. Для диапазона температур, относящихся к физиологической норме, используем выражение:

$$\mu_m = \begin{cases} \mu_{\min} + \psi(t - t_{\min}), & t_{\min} \leq t \leq t_{opt} \\ \mu_{\max}, & t_{opt} \leq t \leq t_{crit} \end{cases}, \quad (4.13)$$

где $\mu_{\min}$ – минимальное значение μ_m при температуре $t_{\min}$; $\mu_{\max}$ – максимальное значение μ_m при температуре t_{opt} ; ψ – температурный коэффициент роста μ_m ; t_{crit} – критическая температура, при которой наблюдается снижение удельной скорости роста.

На рисунке 4.9 представлена аппроксимация экспериментальных данных зависимости μ_m культуры *A. platensis* от температуры выражениями (1.37), (1.38) и (4.13). Все модели с хорошей точностью описывают полученную температурную зависимость удельной скорости роста культуры *A. platensis*. При использовании модели Вант-Гоффа ($R^2 = 0,89$) температурный коэффициент Q_{10} составил 2,1, при этом кривая описывается выражением:

$$\mu = 0,34 \cdot 2,1^{\frac{t-17}{10}}.$$

При аппроксимации экспериментальных данных моделью Аррениуса ($R^2 = 0,91$) температурная кривая имеет вид:

$$\mu = 3,7 \cdot e^{\frac{-359,72}{RT}}.$$

Уравнение линейной регрессии ($R^2 = 0,91$), которое описывает полученную температурную кривую:

$$\mu_m = 0,3 + 0,04 \cdot (t - 17), 17 \leq t \leq 30.$$

Проведённые расчёты показывают, что применимость классических моделей вызывает множество вопросов. Например, модель Вант-Гоффа монотонно возрастает, и удельная скорость никогда не достигнет насыщения. В противоположность, модель Аррениуса с рассчитанными значениями коэффициентов выходит на плато, но при этом температура составляет около 200 °С, что является невозможным. Таким образом, применение линейной аппроксимации представляется наиболее адекватным подходом.

Для сравнения проведём верификацию предлагаемых моделей на других видах микроводорослей, относящихся к различным систематическим группам. Например, на рисунке 4.10 представлена температурная зависимость удельной скорости роста для двух зелёных видов по данным [241, 256].

Удельная скорость роста культуры *Scenedesmus sp.* увеличивается с ростом температуры и достигает максимального значения 1,36 сут⁻¹ при 20 °С. Оптимальным температурным диапазоном для данного вида, в котором реализуются максимальные скорости роста, является от 20 °С до 25 °С [256]. В случае *Chlorococcum littorale* максимальная удельная скорость роста

составляет $2,72 \text{ сут}^{-1}$ при достижении 22°C [241]. И в первом и во втором случае экспериментальные данные с высокой точностью ($R^2 = 0,93$ и $0,99$ соответственно) описываются линейными сплайнами. Для *Scenedesmus sp.* система (4.13) имеет вид:

$$\mu = \begin{cases} 0,2 + 0,077(t-5), & 5 \leq t \leq 20 \\ 1,31, & 20 \leq t \leq 25 \end{cases}.$$

Аналогично, для *Ch. littorale*:

$$\mu = \begin{cases} 0,82 + 0,125(t-8), & 8 \leq t \leq 22 \\ 2,68, & 22 \leq t \leq 26 \end{cases}.$$

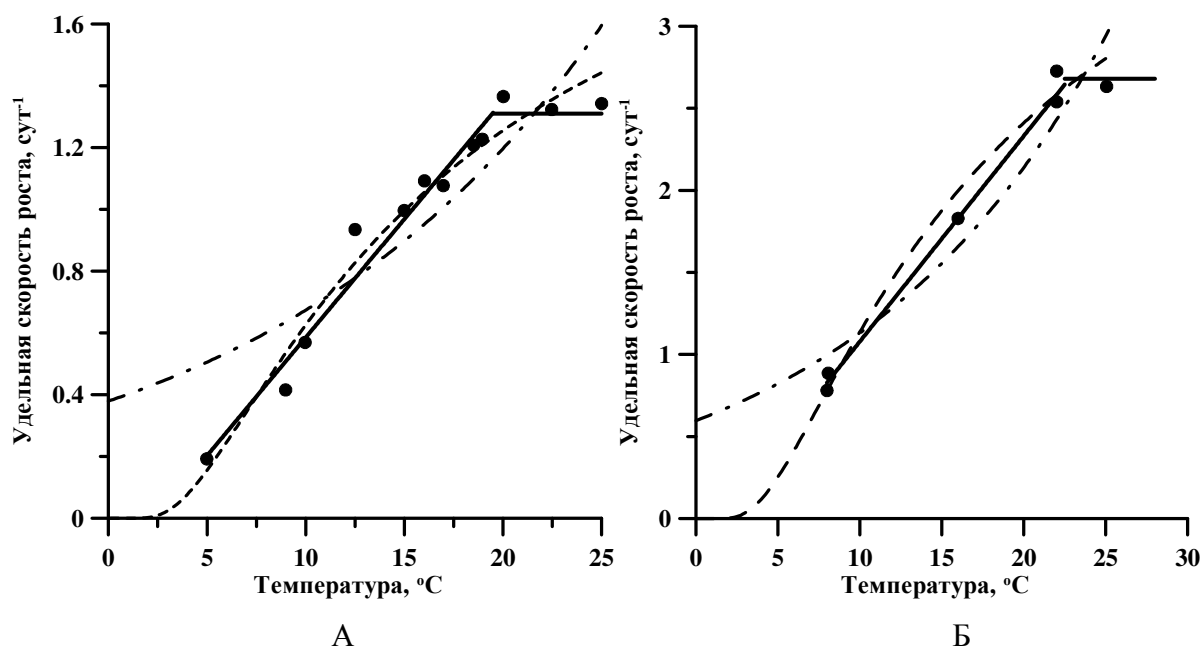


Рисунок 4.10 Зависимость удельной скорости роста культуры *Scenedesmus sp.* (А) и *Chlorococcum littorale* (В) от температуры по данным [241, 256] соответственно. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением Вант-Гоффа (1.37) – штрихпунктирная линия; уравнением Аррениуса (1.38) – пунктирная линия; линейными сплайнами (4.13) – сплошная линия. Значения коэффициентов в тексте

Рисунок 4.10 показывает, что предлагаемая линеаризованная модель зависимости удельной скорости роста культуры микроводорослей от температуры имеет высокую точность описания как в области низких, так и в области оптимальных температур. Для сравнения модель Аррениуса хорошо описывает рост удельной скорости в области низких температур, однако в области оптимальных температур не выходит на плато.

На рисунке 4.11 представлена аппроксимация моделями (1.37), (1.38) и (4.13) температурной зависимости удельной скорости роста двух диатомей по экспериментальным данным [245, 256].

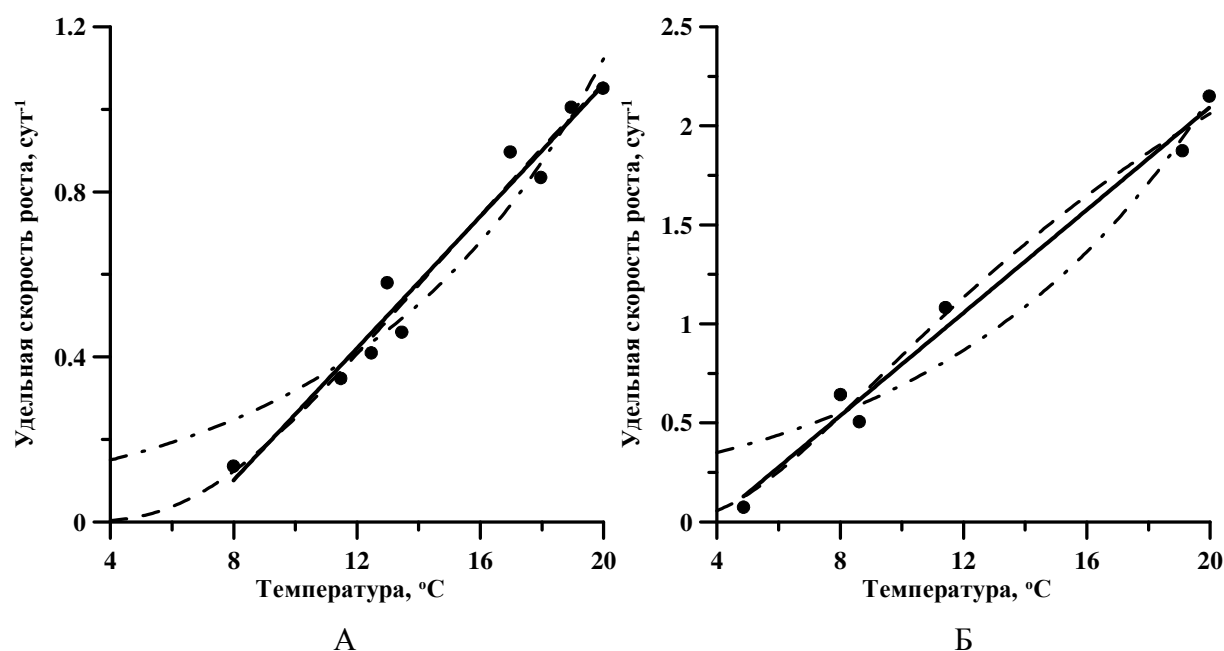


Рисунок 4.11 Зависимость максимальной удельной скорости роста культуры *A. formosa* (А) и *P. tricornutum* (В) от температуры по данным [245, 256] соответственно. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением Вант-Гоффа (1.37) – штрихпунктирная линия; уравнением Аррениуса (1.38) – пунктирная линия; линейными сплайнами (4.13) – сплошная линия

Максимальное значение удельной скорости роста культуры *Asterionella formosa* составляет 1,05 сут⁻¹ и достигается при 20 °C, при этом оптимальный диапазон температур – 19-20 °C [256]. Для культуры как *Phaeodactylum tricornutum* максимальная скорость роста – 2,15 сут⁻¹, наблюдается также при температуре 20 °C, которая и является оптимальной для данного вида водоросли [245]. Как и для других видов микроводорослей, точность описания данных линейной регрессией на рисунке 4.11 высокая ($R^2 = 0,97$) и сопоставима с моделью Аррениуса.

4.6. Заключение к главе 4

На сегодняшний день, ввиду появления новых знаний о фотобиосинтезе микроводорослей, структуре их популяций, наметилась смена парадигм [52], которая ещё не нашла достаточного подтверждения в теоретических и экспериментальных исследованиях. Однако для интенсивных культур микроводорослей в строго контролируемых условиях в данной главе сформулированы принципы, на которых должно строиться моделирование их роста:

1. Зависимость скорости фотобиосинтеза от приведённой плотности потока энергетического или пластического субстрата описывается линейными сплайнами. Также температурная кинетика удельной скорости роста в области физиологической нормы 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.

В данной главе продемонстрирована возможность применения линейных сплайнов при описании мгновенных фотосинтетических кривых, ассимиляции нитратов, зависимости удельной скорости роста культуры от температуры. Модель ломаной, известная ещё со времён Блэкмана [152], всегда рассматривалась исследователями как некоторая идеализированная кривая. При описании кинетических зависимостей продуктивности культуры от внешних факторов среды авторы обычно используют гиперболические модели субстратзависимого роста [107, 173, 190, 233] либо экспоненциальные полуэмпирические выражения для фотосинтеза [209]. Исходя из полученных нами результатов, применение гиперболы Моно целесообразно для культур микроводорослей, которые не адаптированы к данным условиям. При работе с интенсивными, активно растущими культурами необходимо использовать линейные сплайны. Механизмы адаптации клеток подробно рассмотрены в работах Р.П. Тренкеншу на примере фотосинтеза [114].

При моделировании субстратзависимого роста микроводорослей многими авторами используется деление биомассы на составляющие [129, 189, 232]. В главе 3 данной работы также показано, что использование простейшего однокомпонентного подхода, основанного на кинетике первого порядка, позволяет получить только сильно упрощённые модели роста микроводорослей, которые не учитывают внутриклеточную биотрансформацию вещества. Как

следствие, коэффициенты данных моделей имеют не только видоспецифичный характер, но и зависят от условий роста культуры. Казалось бы, чем больше внутриклеточных составляющих мы учтём, тем выше точность и прогностическая ценность полученных моделей. Однако огромное количество кинетических параметров таких моделей затрудняет их интерпретацию, а значит, задача моделирования сводится к чисто формальной проблеме описания конкретных экспериментальных данных. Кроме того, численное решение сложных систем дифференциальных уравнений предполагает использование кусочно-линейных функций для графической интерпретации полученных результатов. Ранее показано, что даже при работе с трёх-компонентными моделями роста культур микроводорослей [129] невозможно получить аналитические решения и наделить смыслом обобщённые коэффициенты полученных уравнений. Выход из сложившейся ситуации следует искать в новых подходах, которые будут оперировать такими характеристиками системы, которые позволят с требуемой степенью точности описать процессы фотобиосинтеза в культурах микроводорослей. С этой точки зрения, двухкомпонентные модели роста культуры представляются наиболее адекватными, информативными, показывающие высокое соответствие с экспериментальными данными.

ГЛАВА 5

СВЕТОЗАВИСИМЫЙ РОСТ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В КУЛЬТУРАХ НЕВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ

Количество исследований роста и биохимического состава микроводорослей в культуре огромно, однако большинство опытов проведено с периодической культурой микроводорослей. Несмотря на относительно небольшое число экспериментальных работ с непрерывными культурами микроводорослей, основные успехи в области изучения роста микроводорослей достигнуты именно при работе в таких режимах выращивания. Особенностью непрерывных культур является возможность достижения динамически равновесного состояния благодаря подаче в фотобиореактор свежей питательной среды и отбора части культуральной суспензии. В этом случае стабилизируются все кинетические характеристики культуры, строго контролируется воспроизводимость результатов, любой анализ производится без вмешательства в процессы роста. В общем случае различают два способа управления ростом культуры микроводорослей (либо их комбинацию): плотностат, когда фиксируется определённая плотность культуры или хемостат – постоянство скорости потока среды. Оба способа принципиально различаются как по технической реализации, так и по создаваемым для клеток микроводорослей условиям среды. Хемостат характеризуется наличием того или иного лимитирующего фактора. Область работы плотностата характеризуется экспоненциальным (неограниченным) ростом культуры. Низкие плотности культуры обеспечивают отсутствие самозатенения клеток, высокие концентрации всех биогенных элементов исключают ограничение скорости роста. В таких условиях реализуются максимальные скорости синтеза биомассы. Собственно экспоненциальный рост начинается с момента окончания адаптации клеток к новым условиям. Устойчивый экспоненциальный рост клеток микроводорослей без светового или минерального лимитирования возможен только в плотностате. Таким образом, возможно получить непрерывный стационарный динамический процесс, который позволяет исследовать влияние главного фактора среды – световых условий.

5.1. Моделирование содержания хлорофилла *a* в плотностате

Содержание хлорофилла *a* в биомассе микроводорослей является ключевым параметром, лежащим в основе расчёта первичной продукции в Мировом океане [55, 140, 185]. Для различных систематических групп микроводорослей отмечено уменьшение количества хлорофилла *a* и других пигментов с ростом облучённости [237]. Также изменяются

соотношения между различными фотосинтетическими пигментами [45, 257]. Весьма показательной в этой области исследований является работа [226]. Авторы проанализировали большой экспериментальный материал для 17 видов фитопланктона и показали, что форма зависимости содержания хлорофилла от света одинакова практически для всех классов и видов морских микроводорослей.

У эукариотических видов микроводорослей хлорофилл *a* образует с белками комплекс, который представляет собой структурный компонент хлоропластов. Прокариотические микроводоросли также содержат хлорофилл *a* в виде комплекса с белками, которые сосредоточены в специализированных структурных компартментах [100, 137]. В обоих случаях можно констатировать, что хлорофилл *a* является структурным компонентом микроводорослевой биомассы. Это означает, что в условиях нормального роста популяции клеток соотношение хлорофилл *a* / белок должно оставаться постоянным. С одной стороны, такое утверждение можно считать спорным, т. к. существует множество работ, в которых авторы такого постоянства не обнаруживают. С другой стороны, можно выделить публикации, где такое постоянство наблюдается в широком диапазоне концентраций хлорофилла *a* и белка [82, 154]. Например, на рисунке 5.1 представлена линейная зависимость концентрации хлорофилла *a* от общего белка для цианопрокариоты *Arthrospira platensis* по данным [82]. Независимо от постоянства рассмотренного соотношения, можно утверждать, что эти вопросы связаны с трансформациями биохимического состава микроводорослей.

В основе моделирования светозависимого содержания пигментов положена гипотеза об их обратимом фотодеструктивном окислении [15, 236]. Несмотря на широкое распространение данной гипотезы, в некоторых работах она подвергается сомнению. Например, для диатомеи *Thalassiosira weissflogii* показано, что скорость распада хлорофилла *a* не зависит от внешней интенсивности света, при этом доля хлорофиллида и других продуктов распада не превышает 2 % клеточного содержания хлорофилла *a* [198]. Такие данные полностью подтверждают предлагаемый модельный подход, который основан на разделении биомассы на структурную и резервную части. Скорость синтеза хлорофилла определяется не внешней облучённостью, а количеством резервной биомассы и активностью ключевого ферментного комплекса μ_{rs} , который преобразует резервную биомассу в структурную [73]. Конечно, подобные заключения имеют место, если отнести хлорофилл *a* к структурным формам биомассы. В случае, когда клетки полностью обеспечены минеральным питанием и находятся в прочих оптимальных условиях, можно изучить влияние света на соотношение хлорофилл *a* / биомасса. Такие условия можно реализовать только в непрерывной культуре микроводорослей при стабилизации концентрации хлорофилла *a* и варьировании внешнего освещения.

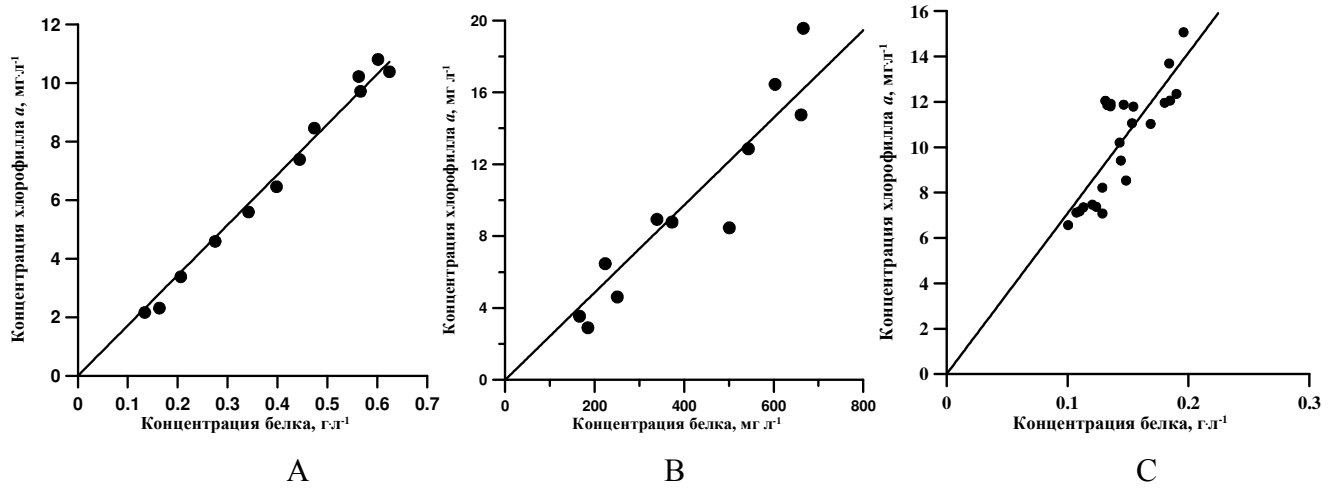


Рисунок 5.1 Линейная зависимость между концентрацией общего белка и хлорофилла a для: А – *A. platensis* по данным [82], В – *P. purpureum* [156], С – *T. viridis* [128]

Содержание хлорофилла в биомассе может быть выражено в различных единицах измерения. Чаще всего его оценивают в весовых долях (или в процентах). Обозначим содержание хлорофилла a (π) в биомассе (B):

$$\beta = \frac{\pi}{B},$$

а долю хлорофилла a в структурной форме биомассы через β_{str} :

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

Отсюда:

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

Таким образом, задача сводится к нахождению зависимости ε от интенсивности света. Для непрерывной культуры невысокой плотности, базовая система уравнений, описывающая динамику трансформации структурных и ресурсных форм биомассы микроводорослей при фотоавтотрофном росте, имеет вид:

$$\begin{cases} \mu = \frac{q_{\text{rs}} \mu_{\text{mrs}}}{\varepsilon_{\text{sat}}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{\text{sat}} \\ \varepsilon_{\text{sat}}, \varepsilon \geq \varepsilon_{\text{sat}} \end{cases} - \mu_{\text{r}} \\ \mu = \frac{\mu_{\text{m}}}{\varepsilon} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - \frac{\mu_{\text{mrs}}}{\varepsilon_{\text{sat}} \varepsilon} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{\text{sat}} \\ \varepsilon_{\text{sat}}, \varepsilon \geq \varepsilon_{\text{sat}} \end{cases} \end{cases}, \quad (5.1)$$

где μ – удельная скорость роста; μ_{m} – максимальная удельная скорость фотосинтеза, I_{sat} – насыщающая внешняя облучённость, 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.

Анализ базовой системы (5.1) 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. Решение базовой системы для того или иного случая позволяет определить искомую зависимость параметра ε от облучённости. Для этого необходимо приравнять первое и второе уравнения системы, исключив величину удельной скорости роста, и записать решение при соответствующих граничных условиях.

Модель 1. Ограничение роста культуры интенсивностью света

Решая (5.1) для данных условий, получим зависимость соотношения ресурсных и структурных макромолекулярных форм в биомассе микроводорослей от интенсивности света:

$$\varepsilon = -\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\mu_m \varepsilon_{\min}}{\mu_r} i_0}, \quad (5.2)$$

Выражение (5.2) 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. С ростом интенсивности света ε увеличивается, достигая максимума при I_{sat} . Таким образом, границы применимости выражения (5.2):

$$\varepsilon_{\min} < \varepsilon < \varepsilon_{sat}, I_{cp} < I_0 < I_{sat}.$$

С учётом (5.2) содержание хлорофилла a в биомассе микроводорослей имеет вид:

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

Интенсивность света в "компенсационном пункте" фотосинтеза и соответствующее ей минимальное значение ε могут быть выражены через кинетические коэффициенты культуры:

$$i_{cp} = \frac{I_{cp}}{I_{sat}} = \frac{\mu_r}{\mu_m q_{rs}}, \quad \varepsilon_{\min} = \frac{\mu_r}{k_\varepsilon \mu_{mrs} q_{rs}} \varepsilon_{sat},$$

где k_ε – коэффициент, характеризующий смену лимитирующих факторов, численно равный отношению параметра ε при световом и метаболическом лимитировании.

Окончательно, зависимость содержания хлорофилла a от интенсивности света имеет вид:

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{1 - \frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{\min} i_0}{q_{rs} i_{cp}}}}. \quad (5.3)$$

Модель 2. Метаболическое ограничение роста культуры

Рассмотрим второй случай, 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} . В таких условиях в диапазоне интенсивностей света от I_{cp} до I_{sat} соотношение резервные / структурные формы биомассы описывается уравнением идентичным (5.2). При высокой облучённости в диапазоне от I_{sat} до I_{max} удельная скорость роста не изменяется, а величина ε линейно зависит от облучённости:

$$\varepsilon = \varepsilon_{\text{max}} i_0. \quad (5.4)$$

Зависимость относительного содержания хлорофилла a от интенсивности света принимает вид:

$$\beta = \frac{\beta_{\text{str}}}{1 + \varepsilon_{\text{max}} i_0}. \quad (5.5)$$

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 [125]. Пусть удельная скорость распада структур – μ_r , эффективность – q_{sr} . Для условий светового лимитирования и культуры невысокой плотности запишем:

$$\begin{cases} \mu = \frac{q_{\text{rs}} \mu_{\text{mrs}}}{\varepsilon_{\text{sat}}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{\text{sat}} \\ \varepsilon_{\text{sat}}, \varepsilon \geq \varepsilon_{\text{sat}} \end{cases} - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m}{I_{\text{sat}} \varepsilon} \begin{cases} I_0, I_0 < I_{\text{sat}} \\ I_{\text{sat}}, I_0 \geq I_{\text{sat}} \end{cases} - \frac{\mu_{\text{mrs}}}{\varepsilon_{\text{sat}}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{\text{sat}} \\ \varepsilon_{\text{sat}}, \varepsilon \geq \varepsilon_{\text{sat}} \end{cases} + \frac{q_{\text{sr}} \mu_r}{\varepsilon} \end{cases}.$$

Зависимость соотношения ресурсных и структурных макромолекулярных форм от интенсивности света будет описываться выражением:

$$\varepsilon = -\frac{1 - q_{\text{rs}} \varepsilon_{\text{min}}}{2q_{\text{rs}}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{\text{rs}} \varepsilon_{\text{min}}}{2q_{\text{rs}}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{\text{min}}}{q_{\text{rs}}} + \frac{\varepsilon_{\text{min}} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{\text{cp}})}, \quad (5.6)$$

$$\beta = \frac{\beta_{\text{str}}}{1 - \frac{1 - q_{\text{rs}} \varepsilon_{\text{min}}}{2q_{\text{rs}}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{\text{rs}} \varepsilon_{\text{min}}}{2q_{\text{rs}}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{\text{min}}}{q_{\text{rs}}} + \frac{\varepsilon_{\text{min}} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{\text{cp}})}}. \quad (5.7)$$

Таким образом, нами получены три математические модели, которые позволяют описать изменение величины относительного содержания хлорофилла a от облучённости для культур невысокой плотности. Модель 3 может быть дополнена уравнением для случая метаболического лимитирования, по аналогии с моделью 2. Однако полученное выражение будет идентично (5.4), при этом обобщённый параметр $\varepsilon_{\max}$ будет также связан с коэффициентом перехода структурной биомассы в резервную. Модели 1 и 3 близки по форме записи, отличие состоит в подкоренном выражении, что важно при расчёте видоспецифичных коэффициентов. Модель 2 применима только в узком диапазоне интенсивностей света, которые близки к насыщающим.

Проанализируем кинетические коэффициенты, входящие в вышеуказанные модели.

Минимальное соотношение резервная / структурная биомасса $\varepsilon_{\min}$

В "компенсационном пункте" соотношение резервных и структурных форм биомассы минимально, при этом доля структурных форм (β_m) будет максимальна:

$$\beta_m = \frac{1}{1 + \varepsilon_{\min}}.$$

При длительном отсутствии света резервная форма биомассы вся перейдет в структурные формы, т. е. станет равной нулю, а содержание пигментов приблизится к своему предельному значению:

$$\varepsilon \rightarrow 0, \beta \rightarrow \beta_{\text{str}}.$$

Таким образом, для оценки $\varepsilon_{\min}$ необходимо проанализировать данные по содержанию культур микроводорослей в темноте. Например, для цианопрокариоты *A. platensis*, которая находилась в темноте в течение 8 часов, общая потеря биомассы составила около 8 % [2]. Исходя из предположения, что за это время все резервные компоненты были исчерпаны, доля структурных форм составляет около 92 %. Согласно другим источникам [268], темновая потеря биомассы для этого же вида составляла около 14 %, доля структурных форм биомассы – 85 %. Таким образом, мы можем оценить параметр $\varepsilon_{\min}$, величина которого находится в диапазоне 0,09 – 0,18.

Соотношение максимальной скорости фотосинтеза и скорости распада структуры

В культурах микроводорослей как на свету (наряду с фотосинтезом), так и в темноте, происходит эндогенный расход биомассы в результате "темнового дыхания". Основными функциями расхода биомассы в ходе эндогенного катаболизма являются энергетическое обеспечение процессов поддержания, а также обеспечение процессов фотобиосинтеза необходимыми АТФ, НАДФ•Н и углеродными скелетами. Соотношение интенсивности дыхания и фотосинтеза может быть выражено относительно расхода и биосинтеза биомассы. По литературным данным, этот параметр изменяется в широких пределах и составляет 0,05 –

0,65 для микроводорослей различных систематических групп [197, 217]. Изменение соотношения интенсивности дыхания и фотосинтеза обычно связывают с увеличением облучённости, различным содержанием основных биохимических компонентов. В контексте данной работы, так как мы рассматриваем максимальную удельную скорость фотосинтеза, соотношение $\mu_m : \mu_r$ является постоянным видоспецифическим коэффициентом и составляет около 20.

Экономический коэффициент перехода резервной биомассы в структурную

Оценка величины q_{rs} является непростой задачей, которая требует рассмотрения многочисленных метаболических реакций в клетке. На сегодняшний день разрабатываются подходы для решения данного вопроса для гетеротрофов. Так расчёт, проведённый с использованием стационарной потоковой модели первичного метаболизма *Corynebacterium glutamicum*, дал максимальную величину экономического коэффициента образования лизина при росте продуцента на ацетате в 0,18 моль/моль [174]. Позднее, теоретически рассчитан наилучший возможный экономический коэффициент роста биомассы *E. coli* в аэробных условиях на глюкозе [85]. Авторами показано удовлетворительное согласие результатов моделирования (0,7) с данными, полученными в эксперименте (0,53).

Для культур микроводорослей оценку величины q_{rs} возможно осуществить при анализе экспериментальных данных изменения биохимического состава клеток в темноте. Например, по данным [268], для *A. platensis*, культивируемой при естественном освещении, за ночь происходило уменьшение количества углеводов и липидов, сопряжённое с увеличением содержания белка (см. таблицу 5.1). Резервная биомасса, накопленная за световой день и состоящая из резервных углеводов и жиров, расходуется в ночное время на синтез структурных составляющих клеток.

Таблица 5.1. Изменение общего состава биомассы *A. platensis* в начале и конце светового промежутков времени по данным [268]

Компоненты	Содержание, мг·л ⁻¹		
	Восход	Заход	Восход
Органическое вещество	686	1165	998
Белок	486	666	707
Углеводы	133	394	195
Липиды	66	105	96

Примем, что к моменту окончания темнового периода все резервные составляющие полностью окисляются [73, 206]. Это позволяет нам оценить стехиометрическое соотношение для структурной биомассы *A. platensis*:

$$\text{липиды} : \text{углеводы} : \text{белок} = 0,14 : 0,27 : 1.$$

Отметим, что эти значения остаются постоянными в первое и второе утро эксперимента (при расчёте по первому и третьему столбцу таблицы 5.1). Используя полученное соотношение, возможно рассчитать количество резервных углеводов и липидов к моменту окончания светового периода – 211,74 и 14,55 мг/л соответственно. Таким образом, экономический коэффициент перехода резервной биомассы в структурную, как отношение общего прироста структурных форм к убыли резервных, для культуры *A. platensis* составляет:

$$q_{rs} = \frac{\Delta B_{str}}{\Delta B_{res}} = \frac{59,3}{226,3} \cong 0,26.$$

Аналогичные расчёты для зелёной микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa*, культивируемой в свето-темновом режиме при различных температурах [242], показали, что величина q_{rs} изменяется от 22 до 37 %.

Кроме того, коэффициент q_{rs} может быть косвенно оценён как отношение максимальной эффективности фотосинтеза к максимальной эффективности фотобиосинтеза. Известно, что основным продуктом фотосинтеза являются фосфолирированные сахара. Параллельно с ними могут образовываться азотистые и др. соединения, которые можно рассматривать как резервную часть биомассы. Максимальный КПД фотосинтеза составляет около 30 – 35 % [132]. Продукты фотосинтеза в дальнейшем используются как энергетический и пластический субстрат для биосинтеза. По данным [10] для *Synechococcus elongatus* максимальная эффективность фотобиосинтеза не превышает 15 %. Таким образом, величина q_{rs} составляет около 40 %.

Насыщающая и компенсационная интенсивности света

В моделях, приведённых в данной работе, интенсивность света представлена в нормированном на насыщающую (I_{sat}) виде. Величина I_{sat} может быть определена из конкретных экспериментальных данных. При достижении облучённостью величины I_{sat} скорость образования резервных форм биомассы достигает максимума, при этом соотношение резервная / структурная биомасса также становится максимальным, а доля структурных форм – минимальна.

Величина интенсивности света в "компенсационном пункте" фотосинтеза также может быть определена из экспериментальных данных: при уменьшении светового потока доля структурных форм биомассы (хлорофилла *a*) возрастает, достигая максимума при некоторой интенсивности I_{cp} . Дальнейшее снижение облучённости приводит к преобладанию

катаболических процессов распада биомассы над фотосинтезом и, как следствие, к резкому падению содержания пигментов в клетках микроводорослей [181]. При описании экспериментальных данных интенсивность света I_{cp} также удобно представлять в нормированном на насыщающую виде – i_{cp} . Величина i_{cp} может быть выражена через кинетические параметры культуры (см. модель 1).

Верификация моделей

В качестве примера, рассмотрим экспериментальные данные зависимости относительного содержания хлорофилла a в биомассе *A. platensis* [47] при малых и больших облучённостях на различных источниках света (см. рисунок 5.2 А). Отметим более высокую скорость уменьшения количества хлорофилла a в биомассе спироулины 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. Можно показать, что I_{sat} зависит от количества ключевого регулятора энергообменных реакций F_0 ("лимитирующее звено"), его активности μ_e , и числа молекул макроэрга (АТФ или НАДФ·Н), восстанавливаемых за счёт одного кванта ϕ_e :

$$I_{sat} = \frac{\mu_e \cdot F_0}{\phi_e}.$$

Для культур микроводорослей известно [45, 58], что спектральный состав света во многом определяет не только пигментный, но и биохимический состав биомассы. Следовательно, изменения в спектральном распределении световой энергии неминуемо скажутся на одном из параметров, которые определяют I_{sat} .

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 5.2 В). Данные значения нормирующих множителей следует рассматривать как оценочные, которые могут быть уточнены при большем количестве экспериментальных точек.

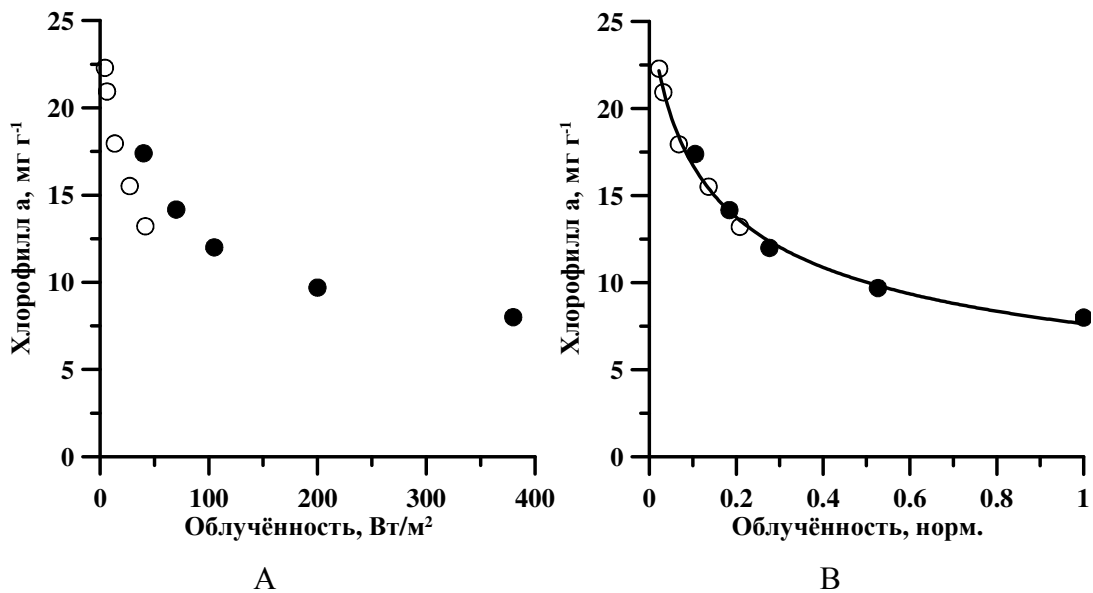


Рисунок 5.2 А – Зависимость содержания хлорофилла *a* от облучённости для плотностатной культуры *A. platensis* для двух типов ламп: $\circ$ – люминесцентные лампы ЛЦ-40, $\bullet$ – галогенная лампа КГ 220-1000-3 [47]. В – нормированные данные (пояснения в тексте), линия – аппроксимация моделью 1 и 3

Аппроксимация данных предложенными моделями позволила определить кинетические коэффициенты уравнений (см. рисунок 5.2 В). Так как область применимости модели 2 – диапазон высокой интенсивности света, для которой количество экспериментальных точек крайне мало, то при математической обработке использовали только уравнения (5.3) и (5.7). Из рисунка 5.2 В видно, что обе предлагаемые модели с одинаковой точностью ($R^2 = 0.99$) описывают экспериментальные значения, причём обе кривые совпадают. В качестве начальных значений для расчётов коэффициентов моделей были использованы величины, приведённые выше. Полученные результаты представлены в таблице 5.2. Количественно все коэффициенты соответствуют ранее определённым диапазонам с некоторыми отклонениями. Для модели 1 отношение максимальной удельной скорости фотосинтеза к удельной скорости распада структур в три раза превышает известные для микроводорослей данные. Более точные значения коэффициентов могут быть получены при большем количестве экспериментальных точек.

Таблица 5.2. Кинетические коэффициенты культуры *A. platensis* при аппроксимации экспериментальных данных [47] моделями 1 и 3

	$\varepsilon_{\min}$	q_{rs}	μ_m / μ_r	μ_r / μ_m	β_{str}	i_{cp}
Модель 1	0.11	0.4	69.44	0.01	25.75	0.02
Модель 3	0.24	0.79	26	0.04	23.05	0.06

В основе всех предложенных в данной работе математических моделей лежит общее представление о разделении фотосинтетических и биосинтетических процессов в клетках низших фотоавтотрофов. Кинетические коэффициенты полученных уравнений можно интерпретировать как видоспецифические. Однако на текущий момент количество накопленного экспериментального материала для плотностатных культур микроводорослей невелико и представлено единичными работами [47, 110, 181]. Это обстоятельство затрудняет возможность точного расчёта данных параметров для различных видов. Учитывая, что форма зависимости содержания хлорофилла от света одинакова практически для всех классов и видов морских микроводорослей [226], и предполагая постоянство коэффициентов моделей (см. таблицу 5.2), запишем приближённое уравнение светозависимого содержания хлорофилла a от облучённости в культурах микроводорослей невысокой плотности [73]:

$$\beta = \frac{\beta_{\text{str}}}{0,487 + \sqrt{0,567 + 6,242(i_0 - 0,06)}}. \quad (5.8)$$

На рисунке 5.3 представлено описание экспериментальных данных приближённым уравнением (5.8) для зелёных морских микроводорослей *Dunaliella tertiolecta* по данным [157] и *Tetraselmis (Platymonas) viridis* по данным [110]. Точность описания по критерию R^2 составила 0,92 и 0,98 соответственно. Доля хлорофилла a в структурной форме биомассы для *T. viridis* составила 2,55 % или 25,5 мг/г, что практически совпадает с расчётом для *A. platensis*. β_{str} для культуры *D. tertiolecta* составила $39,68 \cdot 10^{-16}$ моль на клетку. Аналогичные расчёты для диатомеи *Skeletonema costatum* [181] и зелёной микроводоросли *Chlorella vulgaris* [10] показали более низкую точность описания ($R^2 = 0,8$). Величина β_{str} для данных видов равнялась $11,7 \cdot 10^{-16}$ моль на клетку и 3,48 % соответственно. Таким образом, доля хлорофилла a в структурной биомассе, вероятно, является видоспецифическим коэффициентом, точная оценка которого требует большого объёма экспериментального материала.

Предложенная группа моделей светозависимого содержания хлорофилла a от облучённости основывается на предположении, что хлорофилл a является одной из структурных частей биомассы микроводорослей. Скорости синтеза структурных и резервных форм биомассы заданы линейными сплайнами. В области светового лимитирования скорость образования резервных форм линейно зависит от внешней интенсивности света, поэтому применимость моделей ограничена культурами невысокой оптической плотности. Кроме того, при выводе уравнений предполагается равенство удельных скоростей образования резервных и структурных форм биомассы, что возможно только в стационарном динамическом равновесии проточной культуры. Предлагаемый подход не учитывает возможных процессов фотодеструктивного окисления хлорофилла a [73]. Верификация полученных уравнений для различных вариантов лимитирования позволила оценить величины кинетических

коэффициентов, значения которых в целом соответствуют рассчитанным диапазонам. Недостаточное количество экспериментальных точек не позволяет сделать вывод о предпочтительности той или иной модели. Исходя из общности предлагаемого подхода, сделано предположение о постоянстве кинетических коэффициентов моделей для различных видов микроводорослей. Получено простое приближённое уравнение, которое может быть использовано при оценочных расчётах содержания хлорофилла *a* в зависимости от внешней интенсивности света.

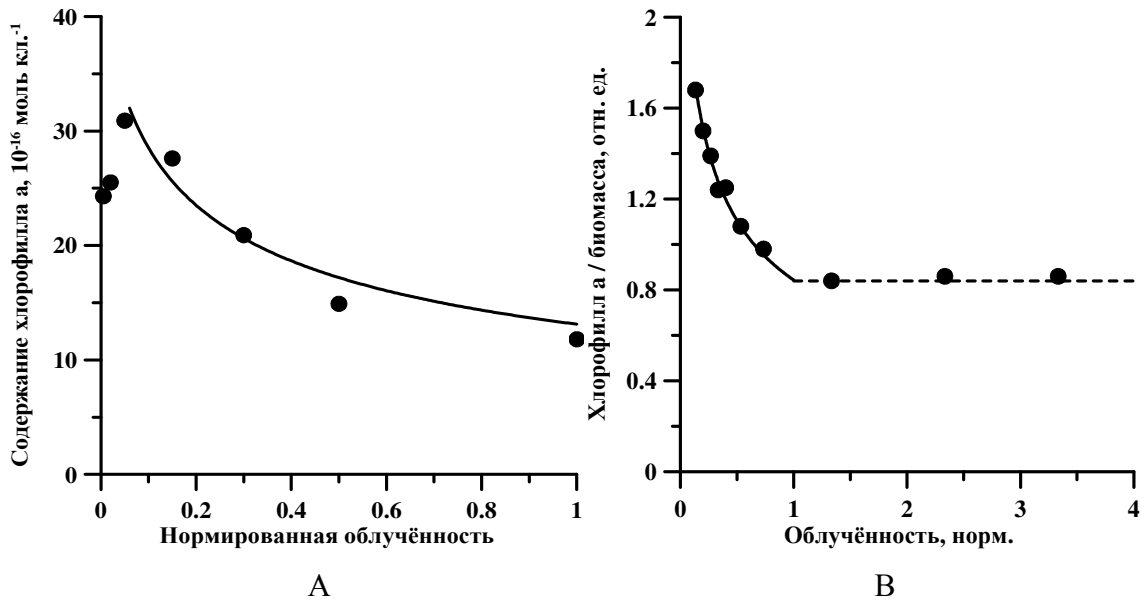


Рисунок 5.3 Зависимость содержания хлорофилла *a* в клетках плотностатной культуры *D. tertiolecta* (A) по данным [181] и *T. viridis* (B) по данным [110]. Сплошная линия – аппроксимация данных уравнением (5.8)

5.2. Удельная скорость роста микроводорослей в плотностате

Для переходных процессов в отсутствие самозатенения клеток, базовая система (4.11), описывающая динамику трансформации структурных и резервных форм биомассы микроводорослей, имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dB_{str}}{dt} = \frac{q_{rs}\mu_{mrs}B_{str}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r B_{str} \\ \frac{dB_{res}}{dt} = \mu_m B_{str} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - \frac{\mu_{mrs}B_{str}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} + q_{sr}\mu_r B_{str}, \end{cases}$$

где B_{str} , B_{res} – структурная и резервная части биомассы; μ_m – максимальная удельная скорость фотосинтеза; i_0 – нормированная на насыщающую внешняя облучённость; ε , ε_{sat} – соотношение и насыщающее соотношение резервная / структурная биомасса; μ_{mrs} – максимальная удельная

скорость преобразования резервной биомассы в структурную; q_{rs} , q_{sr} – эффективность перехода резервной биомассы в структурную и обратно; μ_r – удельная скорость распада структуры.

Биомассу микроводорослей можно рассматривать в виде суммы структурной и резервной форм, а, значит, продуктивность культуры равняется сумме скоростей компонентов:

$$\frac{dB}{dt} = \frac{dB_{str}}{dt} + \frac{dB_{res}}{dt},$$

$$\frac{dB}{dt} = \mu_m B_{str} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - (1 - q_{rs}) \frac{\mu_{mrs} B_{str}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r B_{str} (1 - q_{sr}).$$

Соответственно, удельная скорость роста имеет вид:

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

$$\mu = \frac{\mu_m}{(1 + \varepsilon)} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - (1 - q_{rs}) \frac{\mu_{mrs}}{(1 + \varepsilon) \varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \frac{\mu_r (1 - q_{sr})}{(1 + \varepsilon)}. \quad (5.9)$$

Выражение (5.9) показывает, что удельная скорость роста культуры зависит от действующей интенсивности света, соотношения резервной и структурной биомассы, а также доли структурной биомассы [74]. Можно доказать [118], что для условий стационарного динамического равновесия непрерывной культуры удельная скорость роста микроводорослей в целом равна удельным скоростям структурной и резервной частей. Поэтому для нахождения зависимости удельной скорости роста от интенсивности света для упрощения математических преобразований будем использовать систему:

$$\begin{cases} \mu = \frac{q_{rs} \mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m}{\varepsilon} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon \varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} + \frac{q_{sr} \mu_r}{\varepsilon} \end{cases} \quad (5.10)$$

Решение системы (5.10) позволяет получить искомые зависимости соотношения резервная / структурная биомасса и удельной скорости роста от интенсивности света. Недостатком полученных выражений будет постоянство удельной скорости роста при высоких значениях облучённости. Следовательно, некоторые коэффициенты системы (5.10), которые ранее [117] предполагались постоянными таковыми не являются.

Рассмотрим максимальные удельные скорости фотосинтеза μ_m и преобразования резервной биомассы в структурную μ_{mrs} . По определению, эти параметры пропорциональны общему количеству ключевого фермента (или мультиферментного комплекса) [74, 125]. Если биомасса B содержит ключевой комплекс F_0 в количестве f на единицу структурной

составляющей, а эффективность преобразования энергии макроэргов в химическую энергию биомассы – φ , то для максимальной удельной скорости (см. выражение (4.3)) можно записать:

$$\mu_{max} = \frac{\varphi}{\theta^0} \zeta f \mu_e.$$

где θ_0 – коэффициент перевода энергетических единиц в единицы биомассы (калорийность), ζ – свободная энергия одной молекулы макроэрга, μ_e – активность ключевого фермента.

По сути, определяемая таким образом максимальная удельная скорость не зависит от внешних потоков минерального и энергетического (светового) питания микроводорослей, а определяется содержанием ключевого фермента f , его активностью μ_e , эффективностью преобразования энергии и калорийностью. Так как ключевой фермент является белком, то его долю в структурной биомассе можно считать постоянной ($f = \text{const}$). Постоянство соотношений между структурными частями биомассы микроводорослей подтверждается экспериментальными данными. Например, для цианобактерии *A. platensis* по данным [268] стехиометрическое соотношение для структурных липидов, углеводов и белков составляет 0,14 : 0,27 : 1 соответственно.

В свою очередь, активность каталитического центра зависит от различных причин (например, положение молекулы субстрата относительно каталитического центра в начальный момент взаимодействия, скорость молекулы, локальные физико-химические условия). Для того, чтобы точно описать кинетику субстратзависимой биологической реакции, необходимо знать закон распределения активности. В некоторых случаях количественные закономерности, описывающие скорость субстратзависимых реакций, не зависят от вида распределения активности фермента, а определяются лишь математическим ожиданием этой величины, которое в условиях плотностата можно считать постоянным ($\mu_e = \text{const}$) [19].

Если рассматривать световое ограничение скорости роста микроводорослей, то лимитирующим звеном является скоростью образования фотосинтетических углеводов. Большинство исследователей склоняются к тому, что самой медленной стадией фотосинтеза является активность первого и главного компонента цикла Кальвина РБФК (Rubisco) [78]. Для фотосинтеза величину коэффициента калорийности также можно считать константой. Известно, что калорийность глюкозы составляет 4,2 ккал/г [21].

Снижение удельной скорости фотосинтеза определяется снижением эффективности преобразования световой энергии в химическую энергию углеводов при высоких интенсивностях света, которое сопровождается активацией механизмов нефотохимического тушения [204, 239, 257]. При высокой облучённости происходит накопление восстановленных форм АТФ и НАДФ·Н. При этом избыточная световая энергия приводит к увеличению времени жизни синглетного возбужденного состояния хлорофилла, образованию долгоживущих

триплетных состояний, накоплению протонов в люмене хлоропласта, а также активных форм кислорода, которые и вызывают деструкцию фотосинтетического аппарата [5, 214, 236]. Несмотря на широкое распространение гипотезы о фотодеструктивном окислении пигментов, в некоторых работах она подвергается сомнению. Например, для диатомеи *Th. weissflogii* показано, что скорость распада хлорофилла *a* не зависит от внешней интенсивности света, при этом доля хлорофиллида и других продуктов распада не превышает 2 % клеточного содержания хлорофилла *a* [198]. В таком случае эффективность преобразования световой энергии зависит не от количества пигментов, а от структурной организации лимитирующего звена. Вопрос о локализации этого звена на сегодняшний день остаётся открытым. По некоторым данным это один из компонентов электрон-транспортной цепи, пигмент, который при высокой облучённости переходит в неактивное состояние и "запирает" цепь. Подробно эти вопросы рассмотрены в [114], где на основе вероятностного подхода получены выражения для скорости фотосинтеза и эффективности при различном количестве реакционных центров фотосинтеза, ёмкости "субстратного депо", временной организации потока субстрата и пр.

Таким образом, физиологические механизмы снижения эффективности фотосинтеза могут быть различными, и их выяснение требует детального рассмотрения и не вписывается в рамки данной работы. Для решения поставленной в данной работе задачи используем параметрическое выражение, описывающее кинетику зависимости φ от интенсивности света [114]. Для уницентральной организации лимитирующего звена и 100 % доле продуктивных реакций можно записать упрощённую зависимость:

$$\varphi = \varphi_0 \sum_{q=0}^Q i_0^q / \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q, \quad (5.11)$$

где φ , φ_0 – эффективность и максимальная эффективность фотосинтеза; i_0 – нормированная на насыщающую интенсивность света (приведённая плотность потока квантов на реакционный центр фотосинтеза); Q – ёмкость субстратного депо (количество молекул интермедиатов, которые имеют время жизни сопоставимое или больше времени оборота реакционного центра фотосинтеза).

Если ёмкость субстратного депо равна одной единице субстрата ($Q = 1$), получим:

$$\varphi = \varphi_0 \frac{1 + i_0}{1 + i_0 + i_0^2}.$$

Если в субстратном депо помещается две единицы субстрата:

$$\varphi = \varphi_0 \frac{1 + i_0 + i_0^2}{1 + i_0 + i_0^2 + i_0^3}.$$

Графически зависимость эффективности от приведённой плотности потока квантов при различной ёмкости субстратного депо представлена на рисунке 5.4. С возрастанием ёмкости

субстратного депо, характер кривой кинетической изменяется. При низких интенсивностях света наличие депо позволяет повысить эффективность реакции до максимальной. Аналогичные выводы в [114] получены при возрастании количества лимитирующих звеньев (мультицентральная организация), причём зависимость эффективности реакции от облучённости также может быть описана выражением (5.11).

Отметим, что максимальная удельная скорость преобразования резервной биомассы в структурную μ_{mrs} также будет описываться выражением (4.3). Какой мультиферментный комплекс ограничивает скорость преобразования макромолекулярных форм биомассы у микроводорослей точно неизвестно. Укажем только, что для выяснения конкретного узкого места разработаны подходы, которые помогут выявить его локализацию [81, 100, 131]. Примем, что эффективность данного процесса также является светозависимой, хотя и опосредованно. При высоких облучённостях происходит накопление одного из интермедиатов, что приводит к блокировке синтеза структурной составляющей биомассы. В микробиологии такие механизмы известны как лимитирование скорости реакции избыточной концентрацией субстрата, которые обусловлены взаимодействием фермента с несколькими молекулами субстрата [19].

С учётом (4.3) и (5.11), получим искомые зависимости удельной скорости роста и плотности культуры от интенсивности света для условий плотностата.

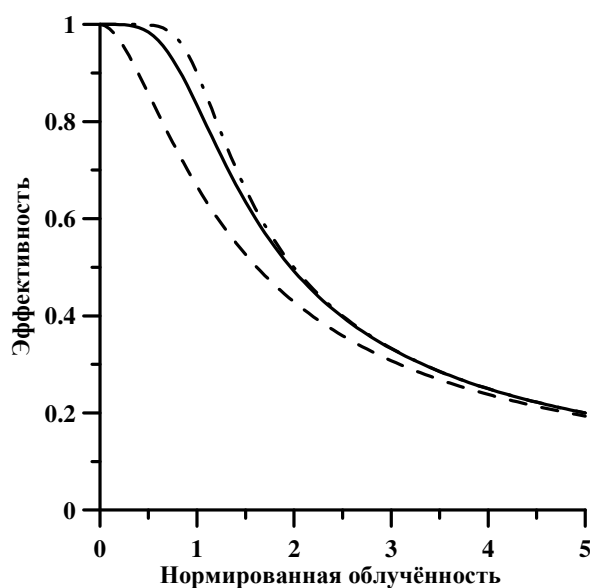


Рисунок 5.4 Зависимость эффективности фотосинтеза от приведённой плотности потока квантов при различной ёмкости субстратного депо: пунктирная линия – $Q = 1$, сплошная – $Q = 4$, штрихпунктирная – $Q = 8$

1. Область зависимости μ и ε от света: $\varepsilon_{\min} \leq \varepsilon \leq \varepsilon_{\text{sat}}, i_{cp} \leq i_0 \leq i_{\text{sat}}$.

Данный диапазон облучённости (от "компенсационного пункта" фотосинтеза – $\varepsilon_{\min}$, i_{cp} , до светового насыщения роста – ε_{sat} , i_{sat}) характеризуется увеличением как удельной скорости роста, так и соотношения резервная / структурная биомасса. Эффективность реакций

фотосинтеза и преобразования макромолекулярных форм биомассы, а также соответствующие удельные скорости можно считать максимальными и постоянными. Система уравнений (5.10), описывающая динамику трансформации структурных и ресурсных форм биомассы микроводорослей, примет вид:

$$\begin{cases} \mu = \frac{\mu_{mrs} q_{rs} \varepsilon}{\varepsilon_{sat}} - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m i_0}{\varepsilon} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} + \frac{q_{sr} \mu_r}{\varepsilon} \end{cases}.$$

Зависимость ε от облучённости:

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

Выражение для удельной скорости роста:

$$\mu = \frac{\mu_{mrs} q_{rs}}{\varepsilon_{sat}} \cdot \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{min}}{q_{rs}} + \frac{\varepsilon_{min} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{cp})} - \frac{\mu_{mrs} q_{rs}}{\varepsilon_{sat}} \cdot \left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{min}}{2q_{rs}} + \mu_r\right). \quad (5.12)$$

В случае режима выращивания, когда происходит стабилизация оптической плотности культуры на максимуме поглощения хлорофилла a (хлорофиллостат), биомасса микроводорослей в фотобиореакторе будет расти с увеличением ε :

$$B = B_{str} + B_{res} = B_{str} + \varepsilon B_{str} = B_{str} (1 + \varepsilon).$$

$$B = B_{str} \left(1 - \frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{min}}{q_{rs}} + \frac{\varepsilon_{min} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{cp})} \right). \quad (5.13)$$

2. Область увеличения ε и снижения μ : $\varepsilon_{sat} \leq \varepsilon \leq \varepsilon_{max}$, $i_{sat} \leq i_0 \leq i_{max} = 1$.

На данном участке в случае постоянной величины эффективности, удельная скорость роста будет постоянна и максимальна, при этом мы наблюдаем линейный рост соотношения резервная / структурная биомасса. Однако, в связи со снижением эффективности согласно выражению (5.11), удельная скорость роста также будет уменьшаться, соотношение ε будет расти нелинейно. По форме кинетических кривых зависимости μ и ε от интенсивности света при достаточном количестве экспериментальных точек можно судить о размере субстратного депо.

Система уравнений (5.10) имеет вид:

$$\begin{cases} \mu = \mu_{mrs} q_{rs} - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m i_0}{\varepsilon} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon} + \frac{q_{sr} \mu_r}{\varepsilon} \end{cases}.$$

Удельная скорость роста определяется из первого уравнения системы с учётом выражения (5.11):

$$\mu = q_{rs}\mu_{\max}^{\text{rs}} \sum_{q=0}^Q i_0^q / \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q - \mu_r. \quad (5.14)$$

Соотношение резервной и структурной биомассы для данного участка растёт вплоть до насыщающего значения:

$$\varepsilon = \frac{\mu_{\max}^{\text{photo}} \sum_{q=0}^Q i_0^q i_0 - \mu_{\max}^{\text{rs}} \sum_{q=0}^Q i_0^q + q_{sr}\mu_r \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q}{q_{rs}\mu_{\max}^{\text{rs}} \sum_{q=0}^Q i_0^q - \mu_r \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q}.$$

Когда интенсивность света достигает максимального значения ($I_0 = I_{0\max}$, $i_0 = 1$), реализуется максимальное значение соотношения резервная / структурная биомасса $\varepsilon_{\max}$, которое далее остаётся постоянным:

$$\varepsilon_{\max} = \frac{\mu_{\max}^{\text{photo}} (Q+1) - \mu_{\max}^{\text{rs}} (Q+1) + q_{sr}\mu_r (Q+2)}{q_{rs}\mu_{\max}^{\text{rs}} (Q+1) - \mu_r (Q+2)}. \quad (5.15)$$

Выражение (5.15) показывает, что $\varepsilon_{\max}$ определяется не только кинетическими коэффициентами, но и структурной организацией лимитирующего звена.

Для хлорофиллостата плотность культуры на данном участке:

$$B = B_{\text{str}} \left(1 + \frac{\mu_{\max}^{\text{photo}} \sum_{q=0}^Q i_0^q i_0 - \mu_{\max}^{\text{rs}} \sum_{q=0}^Q i_0^q + q_{sr}\mu_r \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q}{q_{rs}\mu_{\max}^{\text{rs}} \sum_{q=0}^Q i_0^q - \mu_r \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q} \right). \quad (5.16)$$

3. Облучённость и соотношение резервной и структурной биомассы достигают насыщающих значений $\varepsilon = \varepsilon_{\max}$, $\varepsilon \geq \varepsilon_{\max}$; $i_0 \geq 1$.

На данном интервале удельная скорость роста продолжает снижаться согласно выражению (5.14), наблюдается стабилизация биохимического состава клеток микроводорослей, а также плотности культуры.

Верификация модели.

Рассмотрим экспериментальные данные роста культуры *Tetraselmis (Platymonas) viridis* в плотностате при различном уровне поверхностной освещённости [110]. В эксперименте все физико-химические факторы среды поддерживали в оптимуме для данного вида. Непрерывный процесс обеспечивали путём дискретных сливов (через 0,5 – 4 ч) и доливов свежей питательной среды до первоначального объёма. В опыте стабилизировали оптическую плотность культуры в области красного максимума поглощения хлорофилла а, измеренную относительно поглощения биомассы в целом: $\Delta D_{680} = D_{680} - D_{730}$. Это позволило поддерживать концентрацию хлорофилла

а в культуре постоянной (хлорофиллостат). При изменении поверхностной облучённости плотность культуры через некоторое время (1 – 2 суток) достигала новых стационарных значений. Такой режим позволяет стабилизировать биохимический состав, возрастную структуру популяции клеток, концентрацию метаболитов и др. Интегральный коэффициент поглощения света составлял около 40 % с учётом энергетического спектра лампы, толщина слоя суспензии плоскопараллельного фотобиореактора – 3 см. Величина коэффициента поглощения свидетельствует о том, что все клетки платимонаса находились в одинаковых световых условиях, самозатенением клеток можно пренебречь: известно, что одна клетка поглощает около 40 % падающей световой энергии [135]. Влияние элементов минерального питания на удельную скорость роста культуры можно исключить, так как при проточном режиме культивирования с высокими скоростями протока концентрация биогенов остаётся на довольно высоком уровне [16]. Лимитирование роста водорослей углекислым газом также можно исключить, в виду того, что суспензию непрерывно барботировали газо-воздушной смесью с 3 – 4 % углекислоты со скоростью 6 – 7 л/мин на 1 л культуры. При таких концентрациях CO₂ фотосинтез клеток зелёных водорослей протекает с максимально высокими скоростями [96]. Таким образом, удельная скорость роста μ , плотность культуры B и её биохимический состав определялся только поверхностной облучённостью I_0 [74]. Экспериментальные данные представлены в таблице 1.

Таблица 5.3. Зависимость удельной скорости роста, плотности культуры *T. viridis* и содержания хлорофилла a от поверхностной облучённости в плотностате [110]

$I_0, \text{Вт} \cdot \text{м}^{-2}$	$\mu, \text{ч}^{-1}$	$B, \text{г СВ} \cdot \text{м}^{-2}$	$\beta, \%$
20	0,074	3,38	1,68
30	0,092	3,78	1,50
40	0,090	4,08	1,39
50	0,108	4,58	1,24
60	0,106	4,54	1,25
80	0,097	5,25	1,08
110	0,092	5,79	0,98
200	0,071	6,76	0,84
350	0,050	6,60	0,86
500	0,035	6,60	0,86

Анализируя данные таблицы 5.3, можно сделать вывод, что с ростом поверхностной облучённости происходит увеличение удельной скорости роста и биомассы культуры в целом,

при этом доля хлорофилла a снижается. Ранее нами была проанализирована кинетика содержания хлорофилла a в биомассе, предложена упрощённая модель (5.8), описывающая зависимость содержания хлорофилла a от облучённости для любого вида микроводорослей, определена насыщающая интенсивность света, которая составила $155 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$. Однако насыщение по удельной скорости роста происходит при значительно более низкой облучённости – $50 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$. Это свидетельствует о том, что насыщение по μ и насыщение по β определяются различными лимитирующими звеньями в цепи фотобиосинтеза.

В контексте предлагаемого в данной работе двухкомпонентного подхода, ограничение скорости роста культуры связано с лимитированием скорости фотосинтеза или скоростью ферментативного преобразования резервных форм биомассы в структурные компоненты. Таким образом, для диапазона малых облучённостей ($i_{cp} \leq i_0 \leq i_{sat}$), удельная скорость роста возрастает и описывается выражением (5.12). Далее μ снижается в связи с уменьшением эффективности преобразования световой энергии. Для интенсивностей света выше насыщающих i_{sat} зависимость μ от i описывается выражением (5.14).

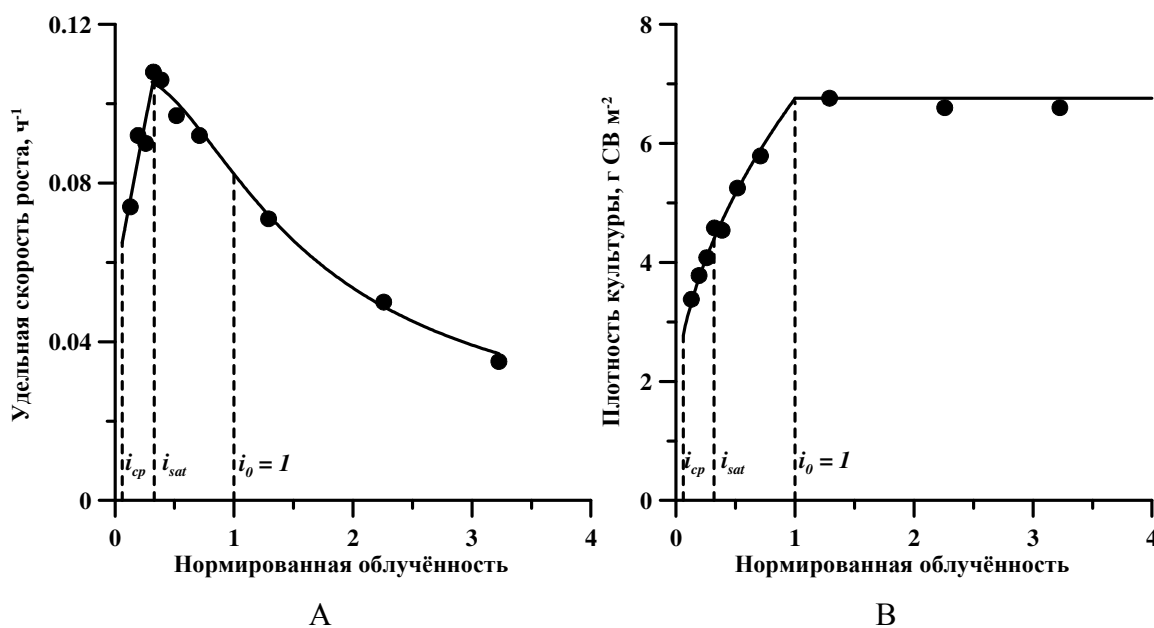


Рисунок 5.5 Зависимость удельной скорости роста (А) и плотности хлорофиллостатной культуры *T. viridis* (В) от облучённости [110]. Линия – аппроксимация экспериментальных данных выражениями (5.12 – 5.14, 5.16). Пунктирные линии показывают точки смены лимитирующего фактора

На рисунке 5.5 представлены аппроксимации выражениями (7 – 9, 11) экспериментальных данных, приведённых в таблице 5.3. Значения кинетических коэффициентов получены ранее (см. таблице 5.2). Пунктирными линиями отмечены точки переключения лимитирующих факторов: "компенсационного пункта" – $I_{cp} = 9,3$, насыщения удельной скорости роста – $I_{sat} =$

50, стабилизации биохимического состава и плотности культуры – $I_{max} = 155 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$. По результатам аппроксимации определена ёмкость субстратного депо $Q = 2$. Полученные значения Q и остальных коэффициентов модели могут рассматриваться как оценочные ввиду небольшого количества экспериментальных точек.

5.3. Заключение к главе 5

Используя общепринятые положения о разделении световой и темновой стадий фотобиосинтеза, предложены выражения, позволяющие описывать зависимости удельной скорости роста микроводорослей, соотношения резервная / структурная биомасса и плотности культуры, содержания хлорофилла a от интенсивности света для плотностата [73, 74]. Полученная модельная форма световой кривой, в целом, соответствует известным экспериментальным данным. 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. Диапазоны сверхвысоких (выше $500 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$) и малых облучённостей (ниже "компенсационного пункта" фотосинтеза) находятся за границей физиологической нормы и в данной работе не рассматривались. Максимальные удельные скорости фото- и биосинтеза можно считать постоянными только в области невысокой интенсивности света, при которой эффективность преобразования световой энергии максимальна [125]. Уменьшение удельной скорости роста при высоких значениях облучённости связано со снижением ϕ , которое сопровождается активацией механизмов нефотохимического тушения. В случае метаболического ограничения роста, эффективность преобразования резервной биомассы в структурную также зависит от света, хотя и опосредованно. Световая зависимость эффективности фото- или биосинтеза описывается вероятностной моделью, учитывающей структурную организацию лимитирующего звена. Физиологические механизмы снижения эффективности фотобиосинтеза могут быть различными, и их выяснение требует отдельного рассмотрения.

ГЛАВА 6

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ АЗОТИСТЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КЛЕТКАХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В последние годы резко возросло количество публикаций по изучению влияния азота на рост и биохимический состав микроводорослей в природе и культуре [259, 260]. Это связано с множеством национальных программ по поиску возобновляемых источников энергии, одним из которых рассматриваются микроводоросли. Причём повышенное внимание уделяется их углеводному и липидному составу, основному сырью для производства биотоплива, и использованию микроводорослей в качестве кормовых добавок при выращивании моллюсков и рыб. Выяснилось, что доля углеводов и жиров в клетках микроводорослей возрастает при дефиците азота в среде [205]. Большинство экспериментальных исследований по оценке влияния азота на рост и биохимический состав микроводорослей проведено на культурах. В это же время стала бурно развиваться аквакультура ценных пород рыб, появилась потребность в пигментах и полиненасыщенных жирных кислотах (имеющих микроводорослевое происхождение), которые стимулируют рост и выживаемость личинок рыб, повышают качество конечной продукции [161]. Вместе с тем, медицинские исследования показали важную роль полиненасыщенных жирных кислот для здоровья человека, особенно, $\omega 3$ и $\omega 6$ кислот [171].

6.1. Кинетика поглощения азота клеткой

Рассмотрим скорость поступления растворённого в питательной среде азота (концентрация N в среде) в клетки микроводорослей. В соответствии с предложенным в главе 4 подходом, азот, находящийся в клетках, можно представить в виде двух основных форм: структурной и резервной [71, 127]. К структурной части относим азот, входящий в структуру клеточной массы (N_{str}). Эта часть биомассы в основном представлена белками. Сюда же относим и небелковые, но входящие в структуры формы азота (например, коферменты). 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) [246]. Такое представление полностью согласуется с концепцией Друпа о том, что скорость роста микроорганизмов зависит от внутриклеточной концентрации лимитирующего субстрата [173].

Внутриклеточная концентрация азота N_{cell} (отнесенная к объёму культуры), равна сумме:

$$N_{cell} = N_{str} + N_{res}.$$

Общий баланс азота в культуре определяется в соответствии с законом сохранения массы:

$$N_0 = N + N_{str} + N_{res},$$

где N_0 – начальная концентрация азота в среде.

Последнее выражение, несмотря на очевидную простоту, отражает фундаментальный закон сохранения азота в закрытой системе: на рисунке 6.1 представлена динамика концентрации нитратного азота в среде и структурного азота при накопительном культивировании *Dunaliella salina*. Структурный азот рассчитан делением концентрации белка на 6,25 [203]. Из представленных на рисунке данных видно, что на восьмые сутки роста культуры концентрация азота в среде стала близкой к нулю, но рост продолжался ещё двое суток, вплоть до исчерпания внутриклеточного резерва. Весь азот в нитратной форме, с точностью до 0,5 %, к моменту достижения максимальной биомассы превратился в структурный.

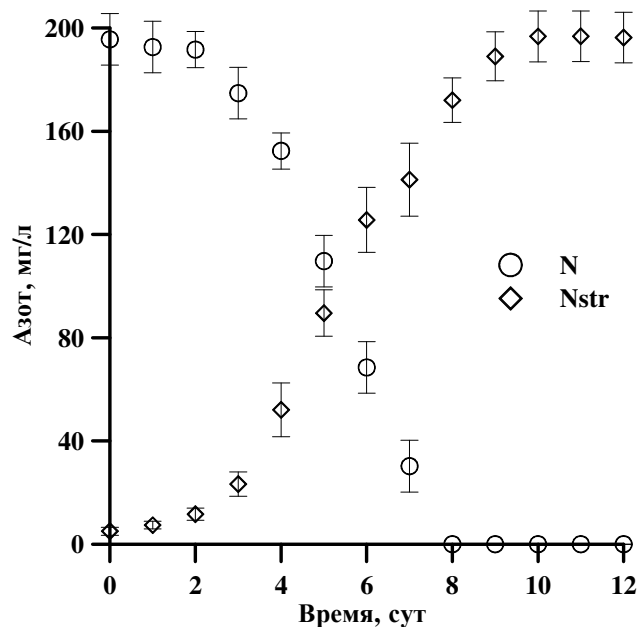


Рисунок 6.1 Динамика концентрации нитратного азота в среде и структурного азота при культивировании *D. salina*

Скорость поступления азота в клетки будет определяться количеством транспортных систем (F), их активностью (μ_N) и приведённой плотностью потока молекул (λ) из внешней среды:

$$\left(\frac{dN_{cell}}{dt} \right)^{in} = \mu_N F \begin{cases} \lambda, \lambda \leq 1; \\ 1, \lambda \geq 1. \end{cases}$$

Приведённая плотность потока молекул субстрата, попадающих в клетки за счёт диффузии или транспортной системы клеток, пропорциональна (коэффициент k) концентрации данного вещества во внеклеточной среде культуры [125]:

$$\lambda = kN.$$

При некоторой концентрации N_1 в среде, поток становится единичным, и величину приведённой плотности потока азота в клетку можно выразить через эту величину, а уравнение для скорости поступления азота в клетку записать в виде:

$$\lambda = 1, kN_1 = 1, k = \frac{1}{N_1}, \lambda = \frac{N}{N_1}.$$

$$\left(\frac{dN_{cell}}{dt} \right)^{in} = \mu_N F \frac{1}{N_1} \begin{cases} N, N \leq N_1; \\ N_1, N \geq N_1. \end{cases}$$

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 [127]. В результате имеем уравнение зависимости скорости транспорта азота из внешней среды в клетки микроводорослей:

$$\left(\frac{dN_{cell}}{dt} \right)^{in} = \mu_{Nm} N_{str} \frac{1}{N_1} \begin{cases} N, N \leq N_1; \\ N_1, N \geq N_1. \end{cases}$$

6.2. Кинетика трансформации форм азота внутри клетки

Скорость синтеза структурной составляющей биомассы и, соответственно, расхода резервного азота будет зависеть от его концентрации, активности (μ_{sin}) и количества ключевого фермента (выраженного через долю структурного азота f_{sin}), контролирующего скорость образования структурных форм биомассы. Произведение $\mu_{sin} f_{sin} = \mu_m$ представляет собой максимальную удельную скорость включения азота в структуру клетки или синтеза структурных компонентов. В итоге имеем:

$$\frac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str} \frac{1}{N_{res1}} \begin{cases} N_{res}, N_{res} \leq N_{res1}; \\ N_{res1}, N_{res} \geq N_{res1}. \end{cases}$$

Скорость изменения концентрации резервного азота будет равна разности между скоростью поступления азота в клетку и скоростью его расхода на синтез структур:

$$\frac{dN_{res}}{dt} = \left(\frac{dN_{cell}}{dt} \right)^{in} - \frac{dN_{str}}{dt}.$$

В результате имеем систему уравнений, описывающую динамику внутриклеточных переходов одних форм азота в другие:

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

Используя полученную систему уравнений можно оценить не только ростовые характеристики микроводорослей, но и решить обратную задачу – найти зависимость форм азотистых соединений в биомассе клеток от внешних концентраций азота в среде и скорости их роста.

Дополним систему уравнений ростовой характеристикой микроводорослей. Если μ – удельная скорость роста, которая ограничена азотом, а B – плотность культуры выраженная концентрацией клеток или концентрацией биомассы, то скорость роста:

$$\frac{dB}{dt} = \mu B.$$

В результате имеем:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = \mu(N_{str}, N_{res}) \cdot B, \\ \frac{dN}{dt} = -\left(\frac{dN_{str}}{dt} + \frac{dN_{res}}{dt}\right), \\ \frac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str} \frac{1}{N_{res1}} \begin{cases} N_{res}, N_{res} \leq N_{res1}; \\ N_{res1}, N_{res} \geq N_{res1}; \end{cases}, \\ \frac{dN_{res}}{dt} = \mu_{Nm} N_{str} \frac{1}{N_1} \begin{cases} N, N \leq N_1; \\ N_1, N \geq N_1; \end{cases} - \mu_m N_{str} \frac{1}{N_{res1}} \begin{cases} N_{res}, N_{res} \leq N_{res1}; \\ N_{res1}, N_{res} \geq N_{res1}; \end{cases}. \end{cases} \quad (6.1)$$

где $\mu(N_{str}, N_{res})$ – удельная скорость роста культуры, зависящая от соотношения структурных и резервных форм азота, сут⁻¹; N – концентрация азота в среде, г/л; N_{res1} , N_1 – насыщающие концентрации резервного и азота в среде, при которых скорость достигает максимального значения; μ_{Nm} – максимальная удельная скорость поступления азота в клетки, сут⁻¹; μ_m – максимальная удельная скорость включения азота в структуру клетки (или синтеза структурных компонентов), сут⁻¹.

Фактически, полученная система уравнений является искомой динамической моделью роста и трансформации структурных и резервных форм азотистых соединений в клетках микроводорослей в дифференциальной форме [127]. Решение системы при заданных условиях позволит получить интегральные зависимости концентрации различных форм азота от времени, а значит, даст возможность рассчитать кинетические характеристики μ_{Nm} , μ_m , которые являются видоспецифическими коэффициентами.

Предложенная математическая модель, является логическим продолжением наших предыдущих исследований кинетики ассимиляции азота клетками микроводорослей. Введённая

ранее величина истинной потребности микроводорослей в лимитирующем субстрате (см. главу 1) есть динамическая характеристика, которая изменяется в широком диапазоне в зависимости от потока азота из внешней среды [65]. Эти изменения можно объяснить, разделив внутриклеточный азот на структурный и резервный: в условиях недостатка азота его внутриклеточный пул (резервная составляющая) будет исчерпан.

6.3. Моделирование динамики азотистых соединений в накопительной культуре

Система (6.1) позволяет описать изменение различных форм азотистых соединений в клетке и в среде. Зависимость скоростей процессов от концентраций лимитирующего субстрата была задана не гиперболой Михаэлиса-Ментен, а в виде линейных сплайнов. Чем лучше организована метаболическая система, тем ближе форма зависимости скорости роста от потока субстрата к идеальной, т. е. к уравнению ломаной, впервые предложенной Блекманом (см. главу 4). Кроме того, при использовании уравнения ломаной чётко определяется граница смены лимитирующих факторов. Отметим, что (6.1) может быть использована только для культур фотоавтотрофных организмов, использующих неорганические источники азота в качестве пластического субстрата для построения белковых структур, при этом энергетику роста определяют световые условия, в которых находятся клетки.

Получим интегральные решения предложенной модели (6.1) для нелимитированного и лимитированного азотом роста накопительной культуры микроводорослей. Для этого используем экспериментальные данные роста культур одноклеточных водорослей при одновременном измерении азота в среде.

Скорость роста культуры в конечном счёте определяется не количеством того или иного субстрата в среде, а соотношением резервных и структурных форм биомассы внутри клетки. Обозначим через $\epsilon_{r/s}$ и $\epsilon_{N/s}$ отношение концентрации резервного азота и концентрации внеклеточного азота к структурному:

$$\epsilon_{r/s} = \frac{N_{\text{res}}}{N_{\text{str}}}, \epsilon_{N/s} = \frac{N}{N_{\text{str}}}. \quad (6.2)$$

С учётом (6.2) систему (6.1) можно переписать в виде:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = \mu(N_{str}, N_{res}) \cdot B, \\ \frac{dN}{dt} = -\left(\frac{dN_{str}}{dt} + \frac{dN_{res}}{dt}\right), \\ \frac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str} \frac{1}{\epsilon_{r/s}^{sat}} \begin{cases} \epsilon_{r/s}, \epsilon_{r/s} \leq \epsilon_{r/s}^{sat}; \\ \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{r/s} \geq \epsilon_{r/s}^{sat}; \end{cases}, \\ \frac{dN_{res}}{dt} = \mu_{Nm} N_{str} \frac{1}{\epsilon_{N/s}^{sat}} \begin{cases} \epsilon_{N/s}, \epsilon_{N/s} \leq \epsilon_{N/s}^{sat}; \\ \epsilon_{N/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} \geq \epsilon_{N/s}^{sat}; \end{cases} - \mu_m N_{str} \frac{1}{\epsilon_{r/s}^{sat}} \begin{cases} \epsilon_{r/s}, \epsilon_{r/s} \leq \epsilon_{r/s}^{sat}; \\ \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{r/s} \geq \epsilon_{r/s}^{sat}; \end{cases}. \end{cases} \quad (6.3)$$

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

Таким образом, форма зависимости макромолекулярного состава биомассы микроводорослей от азота определяется соотношением значений притока азота извне и синтеза структурных компонентов клеток. Система (6.3), позволяет описать динамику изменения структурных и резервных форм биомассы в зависимости от величины соотношений $\epsilon_{r/s}$ и $\epsilon_{N/s}$ для накопительной культуры микроводорослей [71].

Отметим, что процесс преобразования резервных форм в структурные является энергозависимым. Согласно литературным данным [246, 258], 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. Следовательно, коэффициент максимальной удельной скорости синтеза структурных компонентов – светозависимый параметр (см. рисунок 6.2).

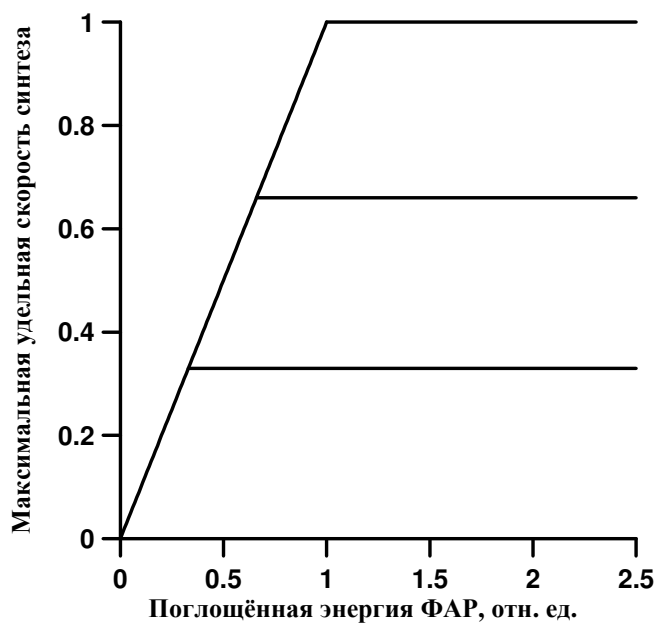


Рисунок 6.2 Зависимость максимальной удельной скорости синтеза биомассы от количества поглощённой энергии

6.3.1. Экспоненциальный рост ($\epsilon_{r/s} \geq \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} \geq \epsilon_{N/s}^{sat}$)

Рассмотрим рост культур микроводорослей в условиях избытка азота в культуральной среде. Такие условия обычно реализуются либо в непрерывной культуре при полном минеральном обеспечении клеток, либо наблюдаются при небольших концентрациях клеток в начале накопительного культивирования. Здесь необходимо заметить, что в общем случае величина удельной скорости зависит от световых условий, в которых находятся клетки микроводорослей. В данной работе, учитывая невысокую оптическую плотность рассматриваемых культур, световые условия можно считать неизменными, а удельную скорость роста – максимальной.

Используя (6.3), запишем систему дифференциальных уравнений, описывающих данные условия:

$$\begin{cases} \frac{dB}{dt} = \mu_m B, \\ \frac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str}, \\ \frac{dN_{res}}{dt} = (\mu_{Nm} - \mu_m) N_{str}, \\ \frac{dN}{dt} = -\mu_{Nm} N_{str}. \end{cases}$$

Первое и второе уравнение системы имеют простые решения в виде экспоненциального роста со временем при начальных условиях: $t = 0, B = B_0, N_{str} = N_{str0}$:

$$B = B_0 e^{\mu_m t},$$

$$N_{str} = N_{str0} e^{\mu_m t}.$$

С учётом этих решений третье и четвёртое уравнение системы примут вид:

$$\begin{cases} \frac{dN_{res}}{dt} = (\mu_{Nm} - \mu_m) N_{str0} e^{\mu_m t}, \\ \frac{dN}{dt} = -\mu_{Nm} N_{str0} e^{\mu_m t}. \end{cases}$$

После интегрирования при начальных условиях: $t = 0, N = N_0, N_{res} = N_{res0}$, получим:

$$N_{res} = N_{res0} + \frac{(\mu_{Nm} - \mu_m)}{\mu_m} N_{str0} (e^{\mu_m t} - 1),$$

$$N = N_0 - \frac{\mu_{Nm}}{\mu_m} N_{str0} (e^{\mu_m t} - 1).$$

Окончательно, система уравнений, описывающая динамику плотности культуры и различных форм азота в отсутствие ограничений роста, имеет вид:

$$\begin{cases} B = B_0 e^{\mu_m \cdot t}, \\ N_{\text{str}} = N_{\text{str}0} e^{\mu_m \cdot t}, \\ N_{\text{res}} = N_{\text{res}0} + \frac{(\mu_{Nm} - \mu_m)}{\mu_m} N_{\text{str}0} (e^{\mu_m \cdot t} - 1), \\ N = N_0 - \frac{\mu_{Nm}}{\mu_m} N_{\text{str}0} (e^{\mu_m \cdot t} - 1). \end{cases} \quad (6.4)$$

Система (6.4) описывает динамику неограниченного азотом роста культуры микроводорослей при неизменных световых условиях [127].

Для верификации (6.4) были использованы накопительные кривые роста зелёной галофильной микроводоросли *Dunaliella salina* в плоскопараллельных фотобиореакторах толщиной 5 см при поверхностной освещённости 20 клк, обеспечиваемой лампами ДРЛ-700. Также проводились параллельные измерения общего белка и нитратного азота в среде (см. рисунок 6.3). Количество структурного азота в клетках *D. salina* рассчитано путём деления концентрации общего белка на 6,25 [203].

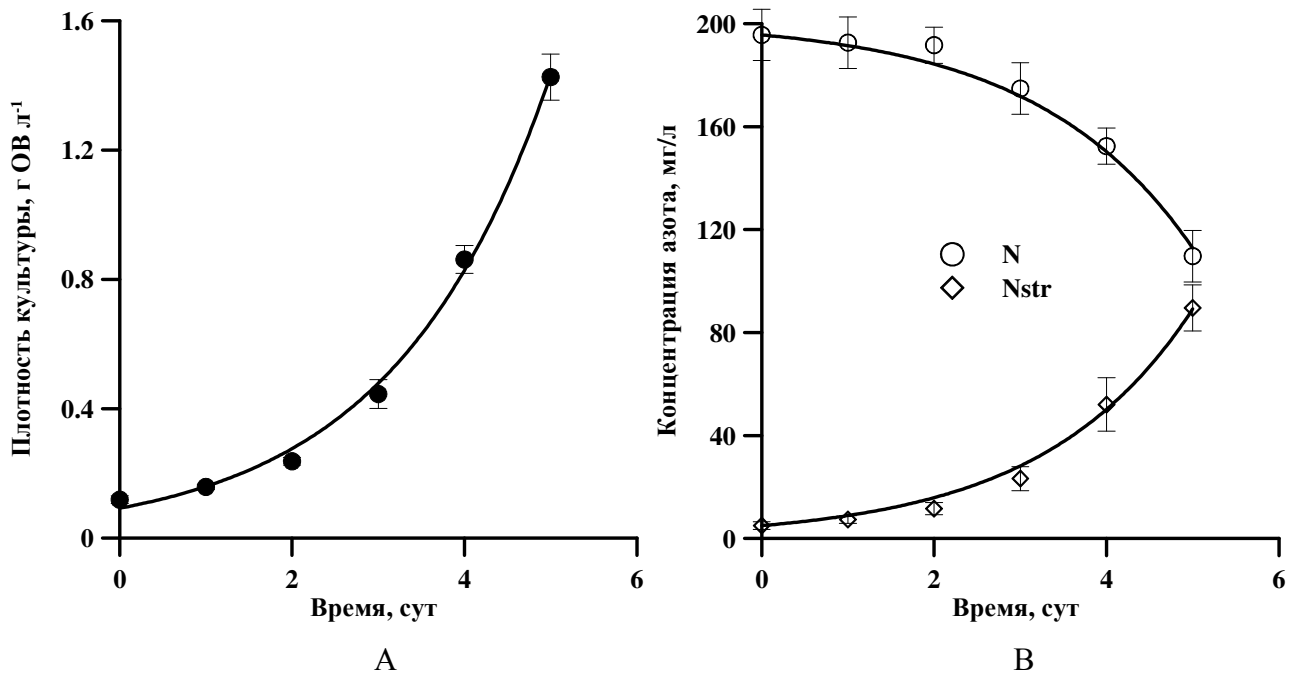


Рисунок 6.3 Динамика плотности культуры (А) и концентрации азота в среде и структурного азота (В) при культивировании *D. salina*. Линии – аппроксимация ($R^2 = 0,98$) экспериментальных данных моделью для нелимитированного роста (6.4)

Анализируя (6.4), 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 в клетках микроводорослей не изменяется, свидетельствуя о

постоянстве относительного содержания белка. Верификация (6.4) позволила определить неизвестные видоспецифические параметры модели: так максимальная удельная скорость синтеза структурных компонентов μ_m у *D. salina* составила $0,55 \text{ сут}^{-1}$; максимальная удельная скорость поступления азота из среды в клетку μ_{Nm} составила $0,42 \text{ сут}^{-1}$. Полученные значения удельных скоростей можно рассматривать только как оценочные, так как для уточнения расчётов необходимо большее количество экспериментальных точек.

Для сравнения рассмотрим данные работы [203] по выращиванию *Scenedesmus obliquus* в плоскопараллельном фотобиореакторе при облучённости $420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. На рисунках 5.3 и 5.4 представлена динамика плотности культуры и нитратного азота в среде.

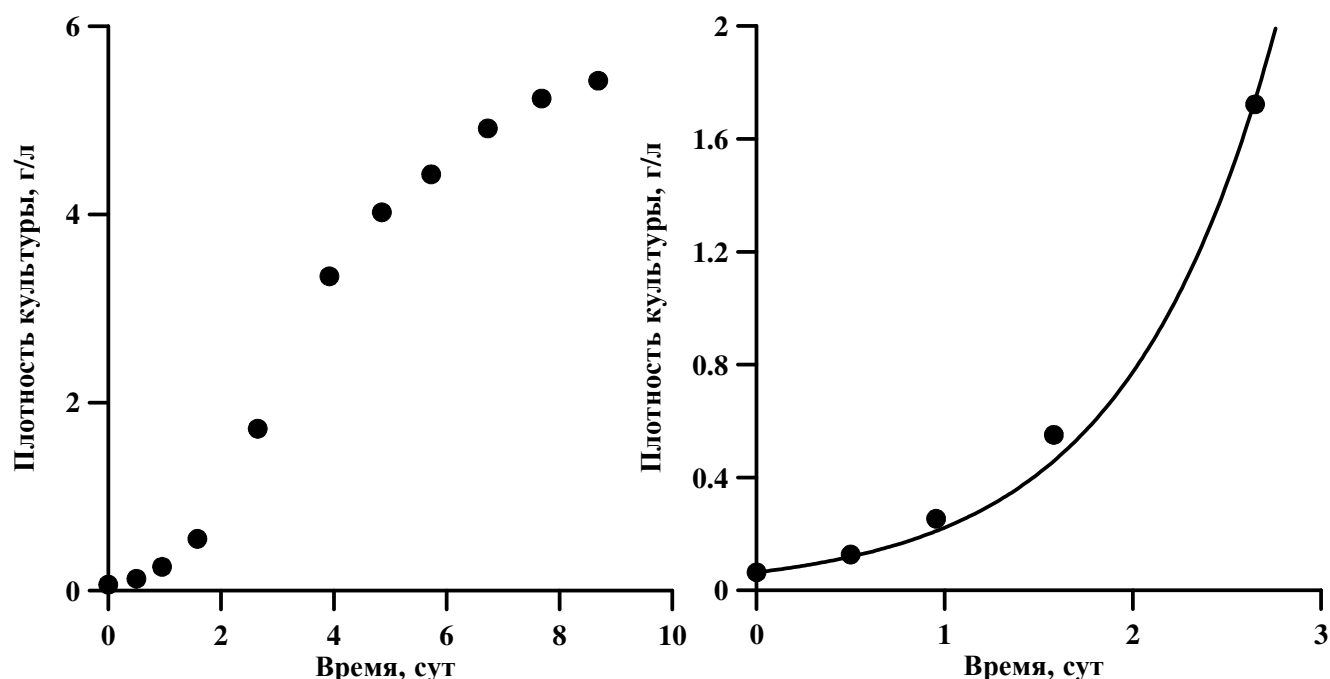


Рисунок 6.4. Динамика плотности культуры *Scenedesmus obliquus* по данным [203]. Линия – аппроксимация ($R^2 = 0,99$) экспериментальных данных моделью для нелимитированного роста (6.4)

Расчёт кинетических коэффициентов модели по данным [203] показал, что максимальная удельная скорость синтеза структурных компонентов μ_m у *S. obliquus* составила $1,25 \text{ сут}^{-1}$; максимальная удельная скорость поступления азота из среды в клетку μ_{Nm} – $1,37 \text{ сут}^{-1}$. Сравнивая полученные значения с результатами для *D. salina*, отметим, что оба коэффициента модели являются светозависимыми, что подтверждает теоретические расчёты [127].

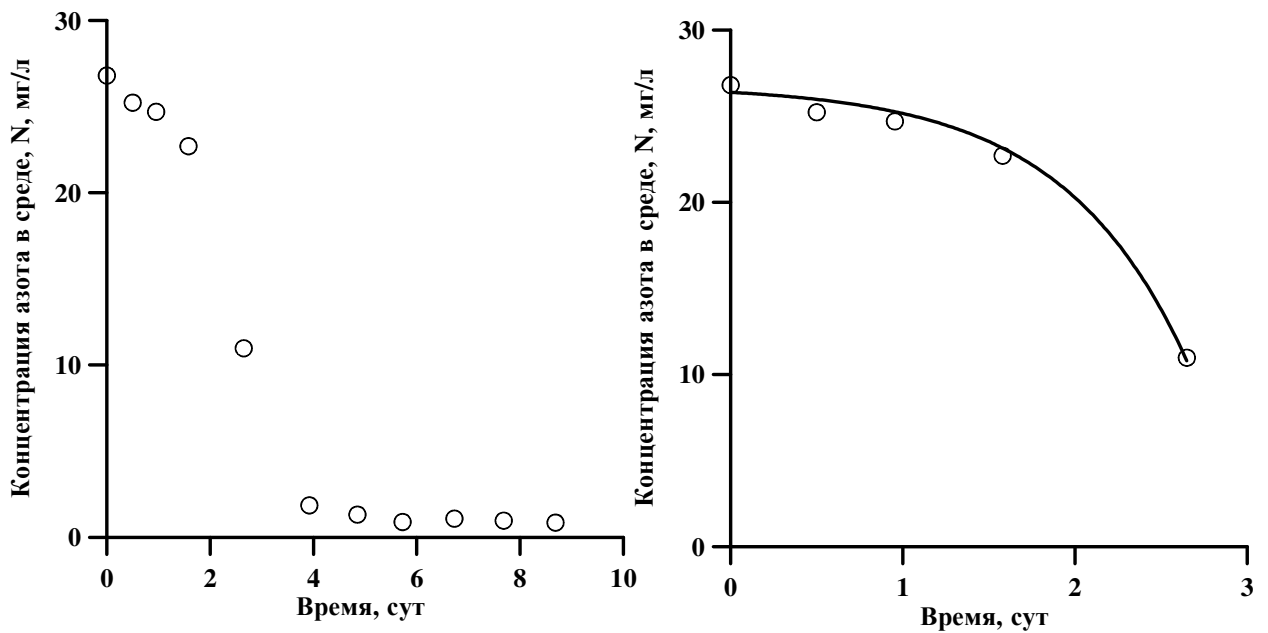


Рисунок 6.5 Динамика концентрации азота в среде при культивировании *Scenedesmus obliquus* по данным [203]. Линия – аппроксимация ($R^2 = 0,99$) экспериментальных данных моделью для нелимитированного роста (6.4)

Однако при расчёте по нашим данным коэффициент максимальной удельной скорости поступления азота из среды ниже удельной скорости синтеза структуры, что говорит об исчерпании резервных форм азота в клетках *D. salina*. Напротив, при анализе данных [203] коэффициент μ_{Nm} превышает μ_m , следовательно, в клетках *S. obliquus* происходит накопление резервного азота. Очевидно, что эти процессы определяются начальным содержанием азота в клетках микроводорослей, которое в свою очередь зависит от предыстории культуры.

6.3.2. Анализ модели нелимитированного азотом роста

Система уравнений (6.4) отображает экспоненциальный рост плотности культуры, всех форм внутриклеточного азота, а также уменьшение концентрации азота в среде. Аналогичные решения для экспоненциального участка могут быть получены на основе понятия истинной и наблюдаемой потребности (см. главу 1). Рассмотрим упрощённую модель динамики субстрата в среде для экспоненциальной фазы роста.

В процессе роста клетка непрерывно выделяет метаболиты в среду. Распад биомассы за счёт дыхания культуры приводит к снижению скорости роста и увеличению потребности. При этом распавшаяся биомасса посредством её минерализации служит источником минерального питания. Минеральные элементы могут либо повторно использоваться в биосинтезе, либо безвозвратно теряться, переходя в нерастворимые соединения, которые не могут быть задействованы биосинтетическим аппаратом клетки. Также возможен вариант, когда только

часть минерализованного субстрата повторно вовлекается в биосинтез [125]. Оценим скорость возвращения субстрата dS_r/dt . Очевидно, что эта величина будет прямо пропорциональна количеству распавшейся за счёт дыхания биомассы, а, следовательно, для скоростей справедливо равенство:

$$\frac{dS_r}{dt} = \alpha \cdot Y_s^0 \cdot \frac{dB_r}{dt},$$

где α – безразмерный коэффициент возврата субстрата в биосинтетические процессы.

Скорость распада биомассы равна произведению удельной скорости дыхания μ_r на саму биомассу B , получим:

$$\frac{dS_r}{dt} = \alpha \cdot Y_s^0 \cdot \mu_r \cdot B.$$

Итак, балансовое уравнение для динамики субстрата имеет вид:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_s^0 \cdot \frac{dB_s}{dt} + \frac{dS_r}{dt}. \quad (6.5)$$

Оно отображает, что концентрация субстрата падает за счёт расхода на синтез биомассы и одновременно происходит возврат субстрата из распавшейся биомассы. Найдём выражение для наблюдаемой потребности:

$$\frac{dB_s}{dt} = \mu_0 \cdot B,$$

$$\frac{dS}{dt} = -Y_s^0 \cdot \mu_0 \cdot B + \alpha \cdot Y_s^0 \cdot \mu_r \cdot B,$$

$$\frac{dS}{dt} = (\alpha \cdot \mu_r - \mu_0) \cdot Y_s^0 \cdot B.$$

$$Y_s = Y_s^0 \cdot \frac{\mu_0 - \alpha \cdot \mu_r}{\mu}.$$

Учитывая, что удельная скорость биосинтеза μ_0 есть сумма удельных скоростей роста μ и дыхания μ_r , получим:

$$Y_s = Y_s^0 \cdot \frac{\mu + \mu_r \cdot (1 - \alpha)}{\mu}. \quad (6.6)$$

Анализируя выражение (6.6), можно рассмотреть следующие крайние случаи:

1. Происходит полное возвращение субстрата в среду, т. е. $\alpha = 1$. Потерь субстрата за счет дыхания не будет, а наблюдаемая и истинная потребности будут равны.

2. Субстрат не возвращается в среду, т. е. $\alpha = 0$. В этом случае наблюдаемая потребность будет выше истинной, так как происходит потеря субстрата, а единица биомассы не образуется:

$$Y_s = Y_s^0 \cdot \frac{\mu + \mu_r}{\mu}.$$

Экспоненциальная фаза характеризуется постоянством удельной скорости роста, причем здесь эта величина максимальна и равна μ_m . Уравнение роста культуры в дифференциальной форме имеет вид:

$$\frac{dB}{dt} = \mu_m \cdot B = (\mu_0 - \mu_r) \cdot B.$$

Скорость синтеза биомассы определяется как:

$$\frac{dB_s}{dt} = \mu_0 \cdot B.$$

Преобразуем уравнение (6.6):

$$\frac{Y_s^0}{Y_s} = \frac{\frac{dB}{dt}}{\frac{dB_s}{dt}} = \frac{(\mu_0 - \mu_r) \cdot B}{\mu_0 \cdot B} = \frac{\mu_0 - \mu_r}{\mu_0}.$$

Т. е. истинная потребность определяется отношением удельных скоростей роста и биосинтеза:

$$Y_s^0 = Y_s \cdot \frac{\mu_m}{\mu_0}.$$

Разделим левую и правую часть на отношение удельных скоростей:

$$Y_s = Y_s^0 \cdot \frac{\mu_0}{\mu_m}.$$

Теперь мы можем получить зависимость ассимиляции субстрата от времени. Учитывая (6.5) и экспоненциальный рост плотности культуры, запишем для экспоненциальной фазы:

$$\frac{dS}{dt} = -Y_s^0 \cdot \mu_0 \cdot B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}.$$

Интегрируя последнее выражение при начальных условиях $S = S_0$ при $t = 0$, получим:

$$S = S_0 - Y_s^0 \frac{\mu_0}{\mu_m} B_0 (e^{\mu_m \cdot t} - 1).$$

Запишем максимальную удельную скорость биосинтеза как сумму удельных скоростей роста и дыхания: $\mu_0 = \mu + \mu_r$. Тогда окончательное выражение для динамики субстрата на экспоненциальной фазе записывается в следующем виде:

$$S = S_0 - Y_s^0 \frac{\mu_m + \mu_r}{\mu_m} B_0 (e^{\mu_m \cdot t} - 1). \quad (6.7)$$

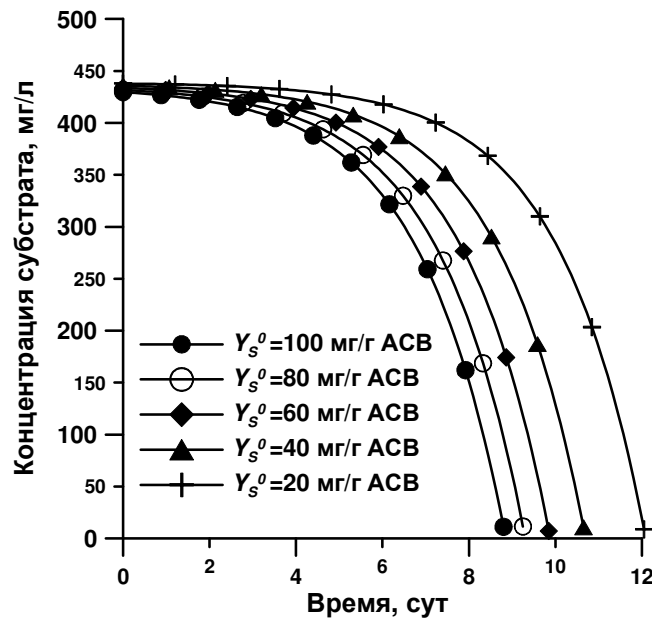


Рисунок 6.6. Семейство кривых, построенных по уравнению (6.7) для различных значений истинной потребности

Уравнение (6.7) отражает изменение концентрации субстрата в среде при условии экспоненциального роста культуры микроводорослей. При известных кинетических характеристиках роста (максимальной удельной скорости роста и удельной скорости дыхания) и начальных условиях (B_0 и S_0) можно прогнозировать динамику концентрации субстрата в среде. На рис. 6.6 представлено семейство кривых, рассчитанных по уравнению (6.7) при различных значениях действительной потребности (значения коэффициентов – $S_0 = 440$ мг/л, $\mu_m = 0,5$ сут⁻¹, $\mu_r = 0,1$ сут⁻¹). Очевидно, что форма кривых обуславливается ростовыми характеристиками культуры.

Сравнивая уравнения (6.4) и (6.7), можно отметить их эквивалентность. И в первом и во втором случае динамика концентрации лимитирующего субстрата в среде описывается экспоненциальной зависимостью:

$$S = S_0 + a - a \cdot e^{\mu_m \cdot t},$$

где a – обобщённый коэффициент.

Разница состоит только в определении обобщённого параметра a :

$$a = Y_s^0 \cdot B_0 \cdot \frac{\mu_m + \mu_r}{\mu_m} \text{ – для уравнения (6.7),}$$

$$a = N_{str0} \cdot \frac{\mu_{Nm}}{\mu_m} \text{ – для уравнения (6.4).}$$

В (6.7) произведение истинной потребности на начальное значение биомассы, по сути, есть начальная клеточная концентрация лимитирующего субстрата (азота). Модель (6.4)

уточняет этот параметр: коэффициент отображает не весь клеточный азот, а только его структурную часть. Второй сомножитель определяется соотношением удельных скоростей синтеза и роста биомассы для уравнения (6.7) и транспорта азота и его преобразования в структуру. При расчётах путём аппроксимации экспериментальных данных это соотношение сильно варьирует, что говорит о необходимости использования большего количества экспериментальных точек. Также обе модели применимы только в случае строго экспоненциального роста. Максимальные скорости синтеза биомассы, строго говоря, не могут быть реализованы в условиях накопительной культуры вследствие постоянно изменяющегося светового обеспечения. Наличие системы контроля плотности культуры – плотностат, позволяет исследовать влияние главного фактора среды – световых условий.

6.3.3. Лимитированный рост культуры, концентрация азота в среде меньше насыщающей ($\epsilon_{r/s} \geq \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} < \epsilon_{N/s}^{sat}$)

В некоторый момент времени t_{Nl} поток азота из среды в клетку становится меньше единичного, при этом соотношение $\epsilon_{N/s}$ станет ниже насыщающего. Это приведёт к уменьшению скорости поступления азота в клетку, а, следовательно, к снижению скорости образования резервных форм азота. Однако вплоть до некоторого момента времени t_{res1} соотношение $\epsilon_{r/s}$ будет выше насыщающего. В таких условиях система (6.3) запишется в виде:

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = -\left(\frac{dN_{str}}{dt} + \frac{dN_{res}}{dt}\right), \\ \frac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str}, \\ \frac{dN_{res}}{dt} = \mu_{Nm} N_{str} \frac{\epsilon_{N/s}}{\epsilon_{N/s}^{sat}} - \mu_m N_{str}. \end{cases}$$

С учётом (6.2) последняя система упростится:

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = -\left(\frac{dN_{str}}{dt} + \frac{dN_{res}}{dt}\right), \\ \frac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str}, \\ \frac{dN_{res}}{dt} = \frac{\mu_{Nm}}{\epsilon_{N/s}^{sat}} N - \mu_m N_{str}. \end{cases}$$

В общем случае для нахождения интегральных решений последней системы необходимо учитывать то, что видоспецифичные коэффициенты модели μ_m и μ_{Nm} , согласно рисунку 6.2, будут изменяться вследствие уменьшения средней пространственной облучённости. Для условий накопительной культуры мы можем дать только примерное уравнение, которое предполагает, что на небольших временных промежутках световые условия, в которых

находятся клетки, не претерпевают значительных изменений. Определим зависимость концентрации азота в среде от времени, считая μ_{Nm} постоянной величиной:

$$\begin{aligned}\frac{dN}{dt} &= -\frac{\mu_{Nm}}{\epsilon_{N/s}^{sat}} N, \\ \int_{N_1}^N \frac{dN}{N} &= -\frac{\mu_{Nm}}{\epsilon_{N/s}^{sat}} \int_{t_{N1}}^t dt, \\ N &= N_1 \exp\left(-\frac{\mu_{Nm}}{\epsilon_{N/s}^{sat}} (t - t_{N1})\right),\end{aligned}\tag{6.8}$$

где N_1 – насыщающая концентрация азота в среде и соответствующий момент времени t_{N1} .

Уравнение (6.8) носит приближённый характер и применимо для описания динамики азота в среде только для временного диапазона от t_{N1} до t_{res1} – момент времени, когда концентрация резервных форм азота снизилась до насыщающей. Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что концентрация азота в среде экспоненциально снижается, что подтверждается экспериментальными данными (см. рис. 6.7).

6.3.4. Лимитированный рост культуры, концентрация резервного азота меньше насыщающей ($\epsilon_{r/s} < \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} < \epsilon_{N/s}^{sat}$)

При уменьшении соотношения резервного азота ниже $\epsilon_{N/s}^{sat}$ будет наблюдаться ограничение скорости образования как резервного, так и структурного азота. В таких условиях система (5.3), записанная для различных форм азота, принимает вид:

$$\begin{cases} \frac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str} \frac{\epsilon_{r/s}}{\epsilon_{r/s}^{sat}}, \\ \frac{dN_{res}}{dt} = \mu_{Nm} N_{str} \frac{\epsilon_{N/s}}{\epsilon_{N/s}^{sat}} - \mu_m N_{str} \frac{\epsilon_{r/s}}{\epsilon_{r/s}^{sat}}. \end{cases}$$

Как и в предыдущем случае, для условий накопительной культуры система не имеет интегральных решений в элементарных функциях, т. к. μ_m и μ_{Nm} светозависимы. Только для условий стационарного динамического равновесия непрерывной культуры, вследствие равенства всех удельных скоростей, систему дифференциальных уравнений можно превратить в алгебраическую. Однако для небольших временных промежутков, когда коэффициенты μ_m и μ_{Nm} можно считать постоянными, динамика азота в среде запишется в виде:

$$N = N_2 \exp\left(-\frac{\mu_{Nm}}{\epsilon_{N/s}^{sat}} (t - t_{res1})\right),\tag{6.9}$$

где N_2 – концентрация азота в среде, при которой $\epsilon_{r/s} = \epsilon_{r/s}^{sat}$.

Уравнение (6.9) по форме совпадает с (6.8), концентрация азота снижается экспоненциально, но для этих двух случаев константы μ_{Nm} будут различны.

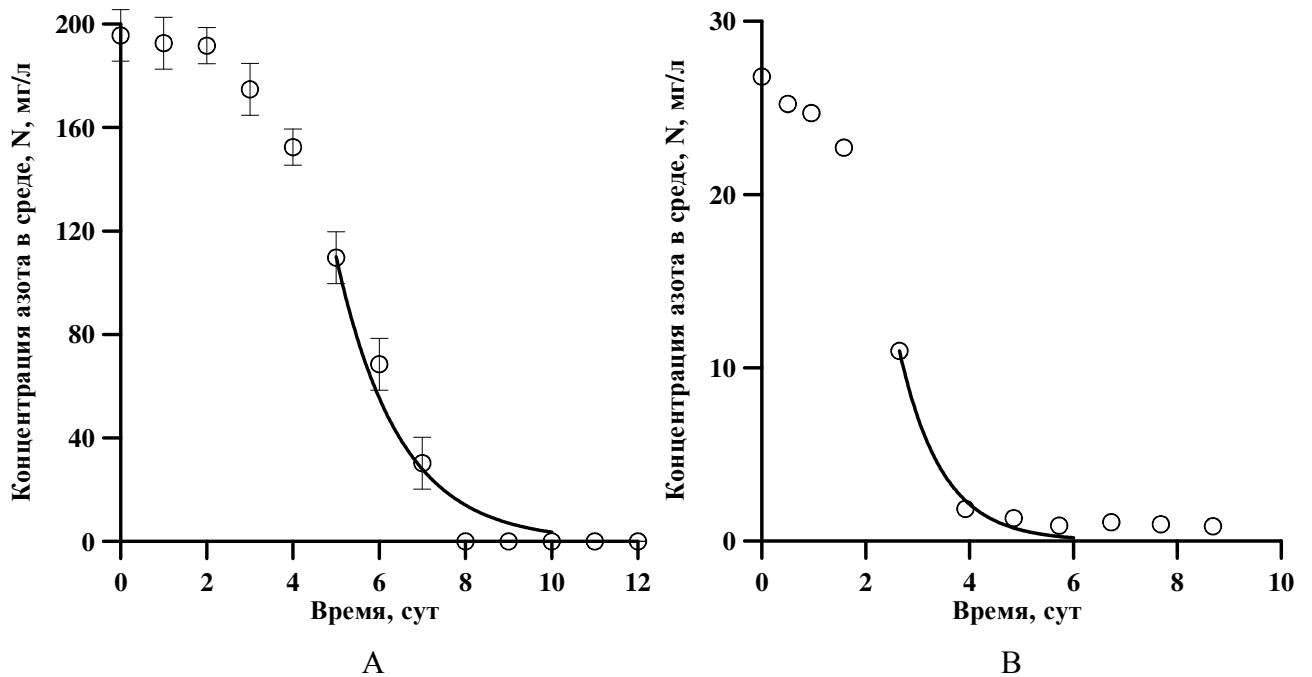


Рисунок 6.7. Динамика концентрации азота в среде при культивировании *Dunaliella salina* (А) и *Scenedesmus obliquus* (В) [203]. Линия – аппроксимация ($R^2 = 0,96$) экспериментальных данных моделью для лимитированного роста (6.8) или (6.9)

6.3.5. Лимитированный рост культуры, концентрация азота в среде равна нулю ($\epsilon_{r/s} < \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{N/s} = 0$)

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 приросло 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 может происходить только за счёт резервного азота. В этом случае система (6.3) с учётом (6.2) примет следующий вид:

$$\begin{cases} \frac{dN_{str}}{dt} = \frac{\mu_m}{\epsilon_{r/s}^{sat}} \cdot N_{res}, \\ \frac{dN_{res}}{dt} = -\frac{\mu_m}{\epsilon_{r/s}^{sat}} \cdot N_{res}. \end{cases}$$

Таким образом, скорость образования структурного азота равна скорости расхода резервного азота. Запишем общее балансовое уравнение, которое при нулевой концентрации азота в среде примет вид:

$$N_0 = N_{\text{str}} + N_{\text{res}},$$

где N_0 – начальная концентрация азота в среде.

Подставляя значение N_{res} в первое уравнение системы, можно получить зависимость концентрации структурных форм азота от времени:

$$N_{\text{str}} = N_0 - (N_0 - N_{\text{str}1}) \cdot \exp\left(-\frac{\mu_m}{\epsilon_{r/s}^{\text{sat}}} \cdot (t - t_1)\right), \quad (6.10)$$

где $N_{\text{str}1}$ – концентрация структурных форм азота к моменту окончания азота в среде t_1 .

Верификация уравнения (6.10) представлена на рисунке 6.8. Можно показать, что концентрация резервных форм азота экспоненциально снижается.

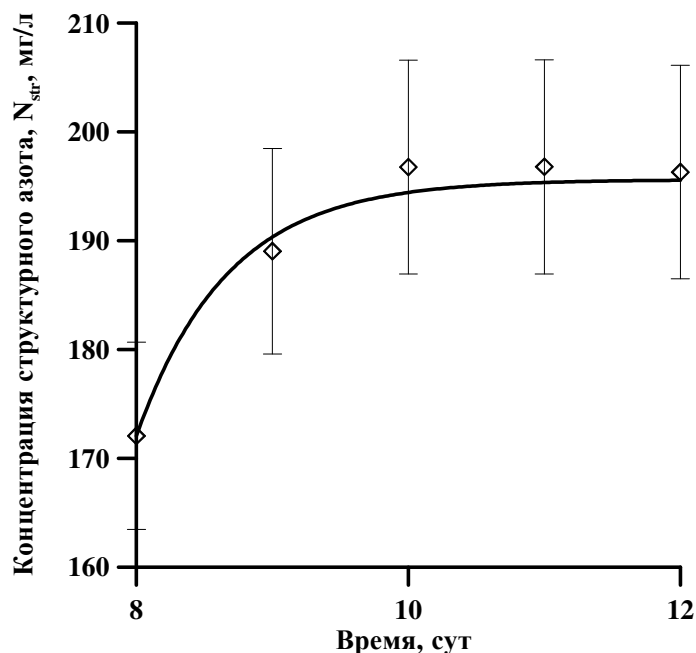


Рисунок 6.8 Динамика концентрации структурного азота при культивировании *Dunaliella salina*. Линия – аппроксимация ($R^2 = 0,98$) экспериментальных данных моделью (6.10)

Таким образом, получена группа математических моделей динамики различных форм азота в культуре микроводорослей для условий лимитированного и нелимитированного азотом роста. Отметим, что введение понятий соотношения резервных и структурных форм биомассы внутри клетки $\epsilon_{r/s}$ и $\epsilon_{N/s}$ позволило преобразовать систему (6.1) в форму (6.3), что в дальнейшем привело к возможности получения простых частных решений в элементарных функциях, так как интегральные решения (6.1) в элементарных функциях не выражаются [127]. Каждое из приведённых уравнений показало высокое ($R^2 \geq 0,96$) с экспериментальными данными по росту и ассимиляции азота культурами *D. salina* и *S. obliquus*. Следует отметить, что все коэффициенты уравнений имеют биологический смысл, следовательно, аппроксимация экспериментальных данных позволяет определить такие видоспецифичные параметры как максимальная удельная скорость синтеза структуры и поглощения азота клетками, а также

насыщающие значения содержания различных форм азота. Знание этих величин позволит в дальнейшем разрабатывать модели управления ростом и накоплением белка в клетках микроводорослей.

6.4. Моделирование динамики азотистых соединений в хемостате

Исследования влияния факторов среды на рост и биосинтез культур микроводорослей проводятся при различных режимах их выращивания: накопительном и проточном. При моделировании влияния факторов среды на скорость роста микроводорослей в накопительной культуре необходимо учитывать постоянно изменяющиеся условия, в которых находятся клетки. Даже для небольших плотностей, когда клетки не затеняют друг друга, а количество биогенных элементов в среде позволяет обеспечить нелимитированный рост, происходит адаптация культуры микроводорослей к постоянному освещению. Адаптация выражается в изменении концентраций резервных и структурных форм биомассы.

При вмешательстве экспериментатора в процессы роста в любой фазе развития накопительной культуры, например, посредством её разбавления питательной средой, картина роста будет зависеть от величины этого разбавления и используемой среды. Если снижать промежуток времени между разбавлениями, уменьшая при этом коэффициент разбавления так, чтобы не изменилась удельная скорость потока, то в пределе мы получим непрерывную культуру, получившую название хемостат [240]. Достоинством использования хемостата при моделировании влияния тех или иных факторов на скорость роста является возможность стабилизации всех внешних условий. Также при стационарном динамическом равновесии, когда удельная скорость роста равна удельной скорости потока питательной среды, не будут изменяться биохимический состав клеток микроводорослей и размерная структура популяции.

Моделирование кинетики ассимиляции биогенных элементов микроводорослями базируется на классических подходах Михаэлис-Ментен, Моно, Друпэ. Скорость поглощения азота, фосфора и других веществ в зависимости от их концентрации в питательной среде S , задаётся уравнением Михаэлис-Ментен [159]. Зависимость удельной скорости роста μ от концентрации биогенных элементов в питательной среде в хемостате задается уравнением Моно [160, 178]. Скорость субстратзависимого роста микроводорослей определяется, в конечном счёте, не концентрацией биогенного субстрата вне клетки, а его внутриклеточным содержанием Q . Многочисленными данными показано, что удельная скорость роста культуры микроводорослей при лимитировании азотом в различных формах определяется исключительно величиной Q [151]. Поглощённый клетками азот в форме нитратов преобразуется в цитоплазме в нитриты, далее в хлоропластах образуется амоний, глутамин, глутамат, который и является

субстратом для дальнейшего синтеза аминокислот. Соотношение различных компонентов метаболизма азота, например, глутамин/глутамат, используется как показатель N-стресса клеток микроводорослей [186]. Зависимость удельной скорости роста от Q описывается моделью Друпа [173], которая основана на предположении о пропорциональности скорости поглощения элемента из среды и его внутриклеточной концентрации. Модель Друпа не позволяет объяснить зависимость максимальной удельной скорости роста и минимальной квоты от различных факторов среды, в первую очередь, от температуры, облучённости культуры, и др. Известно, что лимитирование роста микроводорослей азотом приводит не только к исчерпанию всех внутриклеточных резервов, но и к перестройке фотосинтетического аппарата, катаболизма молекул хлорофилла [62]. Недостаток азота в условиях избытка световой энергии приводит к образованию в клетках микроводорослей липидов, углеводов и других безазотистых соединений. Современные представления о механизмах ассимиляции нитратов микроводорослями достаточно хорошо изучены. Так в их транспорте в клетки зелёных водорослей участвуют три группы ферментов-переносчиков, которые локализованы на клеточной мембране [246, 258]. Активность переносчиков зависит от температуры, pH среды, кроме того, для их функционирования необходима энергия в виде АТФ, либо НАДФ·Н.

В предыдущем параграфе предложена модель динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей и для конкретных случаев обеспеченности азотом в накопительной культуре *Dunaliella salina* найдены частные интегральные решения. Однако недостатком предложенных решений является постулирование постоянства коэффициентов модели: максимальных удельных скоростей транспорта азота в клетку μ_{Nm} и синтеза структуры μ_m . В общем случае видоспецифичные коэффициенты μ_m и μ_{Nm} будут меняться вследствие изменения средней пространственной облучённости при увеличении плотности культуры.

Получить частные решения модели (6.3) в условиях стационарного динамического равновесия хемостата при различной обеспеченности азотом.

6.4.1. Общая модель динамики азотистых соединений в хемостате

Основным свойством динамически равновесного непрерывного роста микроводорослей является равенство удельных скоростей всех внутриклеточных составляющих. Для получения такого роста необходима неизменность внешних условий, в которых находятся клетки. Эти условия можно обеспечить непрерывной подачей лимитирующего элемента питания в околосклеточную среду, для восполнения биогенов, используемых на рост клеток. Следовательно, систему (6.3) необходимо дополнить уравнением, отражающим скорость подачи лимитирующего вещества. Скорость подачи азота выразим через удельную скорость протока среды (ω) и его концентрацию в питающей среде (N_0). Используем те же обозначения

величин для непрерывного процесса роста, но с надстрочным индексом (*). В случае устойчивого непрерывного роста система (6.3) для удельных скоростей принимает вид [71]:

$$\begin{cases} \mu^* = \omega = \frac{dN_0}{N_0 dt} = \frac{dN^*}{N^* dt} = \frac{dB^*}{B^* dt}, \\ \mu^* = \frac{dN_{str}^*}{N_{str}^* dt} = \mu_m \frac{1}{\epsilon_{r/s}^{sat}} \begin{cases} \epsilon_{r/s}^*, \epsilon_{r/s}^* \leq \epsilon_{r/s}^{sat}; \\ \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{r/s}^* \geq \epsilon_{r/s}^{sat}; \end{cases}, \\ \mu^* = \frac{dN_{res}^*}{N_{res}^* dt} = \mu_{Nm} \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{1}{\epsilon_{N/s}^{sat}} \begin{cases} \epsilon_{N/s}^*, \epsilon_{N/s}^* \leq \epsilon_{N/s}^{sat}; \\ \epsilon_{N/s}^{sat}, \epsilon_{N/s}^* \geq \epsilon_{N/s}^{sat}; \end{cases} - \mu_m \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{1}{\epsilon_{r/s}^{sat}} \begin{cases} \epsilon_{r/s}^*, \epsilon_{r/s}^* \leq \epsilon_{r/s}^{sat}; \\ \epsilon_{r/s}^{sat}, \epsilon_{r/s}^* \geq \epsilon_{r/s}^{sat}; \end{cases}. \end{cases} \quad (6.11)$$

(6.11) описывает рост и соотношение форм азотистых соединений в клетке и внеклеточной среде в хемостате при единственном лимитирующем факторе – азоте.

6.4.2. Предельные характеристики непрерывной культуры

Рассмотрим случай непрерывной культуры при высоких концентрациях азота в среде и клетке. Система (6.11) редуцируется до вида:

$$\begin{cases} \mu_m = \omega_m = \frac{d\mathcal{B}^{*m}}{\mathcal{B}^{*m} dt} = \frac{dN^{*m}}{N^{*m} dt} = \frac{dN_{str}^{*m}}{N_{str}^{*m} dt} = \frac{dN_{res}^{*m}}{N_{res}^{*m} dt} = \frac{dN_0}{N_0 dt}, \\ \mu_m = \omega_m; (\epsilon_{r/s}^{sat} = \epsilon_m), \\ \mu_m = \omega_m = \mu_{Nm} \frac{1}{\epsilon_m} - \mu_m \frac{1}{\epsilon_m}; (\epsilon_{N/s}^* \geq \epsilon_{N/s}^{sat}, \epsilon_{r/s}^{sat} = \epsilon_m). \end{cases} \quad (6.12)$$

Второе уравнение системы (6.12) накладывает ограничение на удельную скорость протока среды. Она не может быть выше максимальной величины ω_m . В противном случае произойдет вымывание клеток из системы культивирования:

$$\omega = \mu^* \leq \mu_m = \omega_m.$$

Рассмотрим второе уравнение системы (6.11), которое накладывает ограничения на содержание резервных форм азота в клетке. Оно не может быть максимального значения ϵ_m , т. к. удельная скорость роста непрерывной культуры не может быть выше максимальной:

$$\epsilon_{r/s}^* \leq \epsilon_{r/s}^{sat} = \epsilon_m.$$

Величина максимальной удельной скорости роста зависит от лимитирующего фактора, не связанного с внешней концентрацией азота. При этом ω_m будет определять соотношение форм внутриклеточного азота. Из третьего уравнения редуцированной системы (6.12) находим эту связь:

$$\epsilon_m = \frac{N_{res}^{*m}}{N_{str}^{*m}} = \frac{\mu_{Nm} - \mu_m}{\mu_m}.$$

$$N_{res}^{*m} = N_{str}^{*m} \cdot \frac{\mu_{Nm} - \mu_m}{\mu_m},$$

$$N_{str}^{*m} = N_{res}^{*m} \frac{\mu_m}{\mu_{Nm} - \mu_m}.$$

Из последних двух соотношений следует, что стационарные концентрации резервных и структурных форм азота не изменяются, а, следовательно, биохимический состав клеток постоянен [71]. Этот факт отображает суть нелимитированного роста культуры микроводорослей.

6.4.3. Внутриклеточное содержание азота

Найдём внутриклеточное содержание азота при максимальной скорости протока:

$$N_{cell}^{*m} = N_{str}^{*m} + N_{res}^{*m} = (1 + \varepsilon_m) N_{str}^{*m} = \frac{1 + \varepsilon_m}{\varepsilon_m} N_{res}^{*m}.$$

Важной характеристикой является доля структурных форм азота в его общем внутриклеточном содержании θ . При максимальной скорости протока эта величина будет минимальна θ_{min} :

$$\theta_{min} = \frac{N_{str}^{*m}}{N_{str}^{*m} + N_{res}^{*m}} = \frac{1}{1 + \varepsilon_m}.$$

θ может быть выражена через максимальные кинетические характеристики и позволяет вычислить максимальную удельную скорость транспорта азота в клетки микроводорослей:

$$\theta_{min} = \frac{1}{1 + \varepsilon_m} = \frac{1}{1 + \frac{\mu_{Nm} - \mu_m}{\mu_m}} = \frac{\mu_m}{\mu_{Nm}},$$

$$\mu_{Nm} = \frac{\mu_m}{\theta_{min}} = \mu_m \cdot (1 + \varepsilon_m). \quad (6.13)$$

Для реализации максимального содержания азота в клетках необходимо, чтобы внеклеточная концентрация азота была выше или равной её единичному значению N_1 , при этом поток азота в клетку больше либо равен насыщающему:

$$\varepsilon_{N/s}^{sat} = \frac{N_1}{N_{str}^{*m}} = \varepsilon_m \cdot \frac{N_1}{N_{res}^{*m}}.$$

При максимальной скорости протока концентрация азота на входе непрерывной культуры N_0 должна быть выше или равной сумме единичных значений внеклеточного и внутриклеточного содержания:

$$N_0 \geq N_1 + N_{cell}^m \geq N_1 + \frac{1 + \varepsilon_m}{\varepsilon_m} N_{res}^* \geq N_1 + (1 + \varepsilon_m) \cdot N_{str}^*,$$

$$N_0 \geq \varepsilon_{N/s}^{sat} \cdot N_{str}^* + (1 + \varepsilon_m) \cdot N_{str}^* \geq (1 + \varepsilon_m + \varepsilon_{N/s}^{sat}) \cdot N_{str}^*.$$

Граничным условием нелимитированного азотом роста микроводорослей в непрерывной культуре является равенство:

$$N_{0min} = (1 + \varepsilon_m + \varepsilon_{N/s}^{sat}) \cdot N_{str}^* = \frac{\varepsilon_{N/s}^{sat}}{\varepsilon_m} \cdot N_{res}^* + \frac{\varepsilon_m}{1 + \varepsilon_m} N_{res}^*.$$

Увеличение концентрации азота на входе непрерывной культуры выше этой границы не приведет к увеличению скорости роста, но при значительном превышении может ингибировать рост.

6.4.4. Лимитирование роста азотом

При лимитировании роста микроводорослей внутренний $\varepsilon_{r/s}$ и внешний $\varepsilon_{N/s}$ потоки азота меньше единичных (насыщающих) значений. В таких условиях система (6.11) будет иметь вид:

$$\begin{cases} \mu^* = \omega = \frac{dN_0}{N_0 dt} = \frac{dN^*}{N^* dt} = \frac{dB^*}{B^* dt}, \\ \mu^* = \mu_m \frac{\varepsilon_{r/s}^*}{\varepsilon_{r/s}^{sat}} = \frac{\mu_m}{\varepsilon_m} \cdot \varepsilon_{r/s}^*, \\ \mu^* = \mu_{Nm} \frac{1}{\varepsilon_{r/s}^*} \frac{\varepsilon_{N/s}^*}{\varepsilon_{N/s}^{sat}} - \mu_m \frac{1}{\varepsilon_{r/s}^{sat}} = \frac{\mu_{Nm}}{\varepsilon_{N/s}^{sat}} \frac{\varepsilon_{N/s}^*}{\varepsilon_{r/s}^*} - \frac{\mu_m}{\varepsilon_m}. \end{cases} \quad (6.14)$$

Рассмотрим зависимость удельной скорости расхода азота при синтезе структурных составляющих клеток. Из второго уравнения системы (6.14) следует, что стационарное содержание резервных форм азота в клетке прямо пропорционально удельной скорости роста стационарной непрерывной культуры:

$$\frac{\mu^*}{\mu_m} = \frac{\varepsilon_{r/s}^*}{\varepsilon_m}. \quad (6.15)$$

Внешний и внутренний потоки азота также взаимосвязаны. Найдём эту связь, приравнявая второе и третье уравнение системы (6.14):

$$\varepsilon_{N/s}^* = \frac{\mu_m \varepsilon_{N/s}^{sat}}{\mu_{Nm} \varepsilon_m} \cdot \left((\varepsilon_{r/s}^*)^2 + \varepsilon_{r/s}^* \right),$$

$$\varepsilon_{r/s}^* = -\frac{1}{2} + \sqrt{\frac{1}{4} + \frac{\mu_{Nm} \cdot \varepsilon_m}{\mu_m \cdot \varepsilon_{N/s}^{sat}} \cdot \varepsilon_{N/s}^*}.$$

На рисунке 6.9 представлена теоретическая кривая зависимости внешнего и внутреннего потоки азота. Для простоты соотношение удельных скоростей и насыщающих констант принято за единицу.

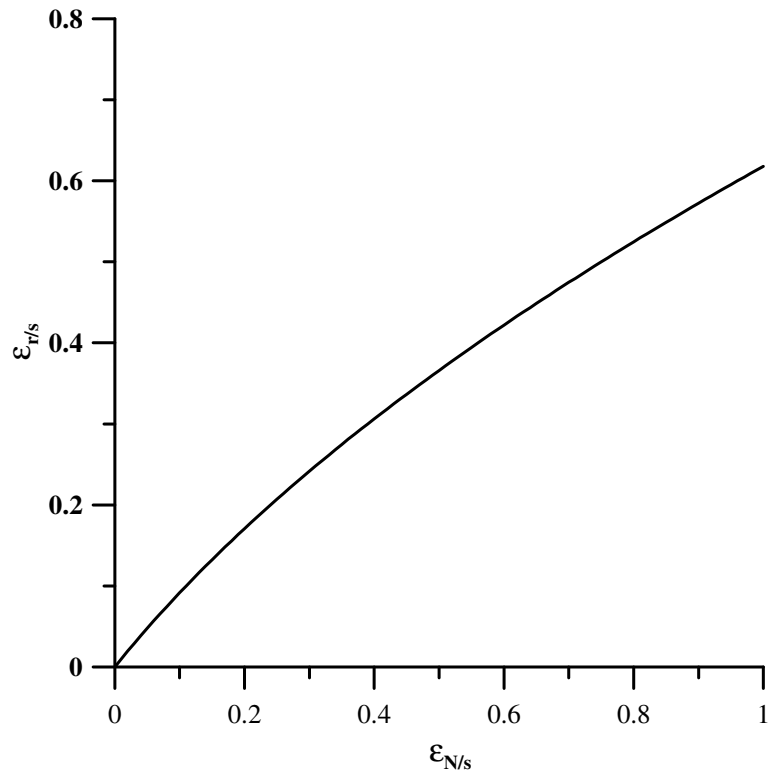


Рисунок 6.9 Зависимость содержания резервных форм азота от соотношения внеклеточного азота к структурному (внешнего потока азота)

Третье уравнение системы (6.14), с учётом (6.15), позволяет выявить взаимосвязь удельной скорости роста и внешнего потока азота:

$$\mu_{1,2}^* = -\frac{\mu_m}{2 \cdot \epsilon_m} + \sqrt{\left(\frac{\mu_m}{2 \cdot \epsilon_m}\right)^2 + \frac{\mu_{Nm} \mu_m}{\epsilon_{N/s}^{sat} \epsilon_m} \cdot \epsilon_{N/s}^*}.$$

6.4.5. Внутриклеточное содержание азота лимитированной культуры

Концентрация структурного и резервного азота будет зависеть от удельной скорости протока ω :

$$\mu^* = \frac{\mu_m}{\epsilon_m} \cdot \frac{N_{res}^*}{N_{str}^*} = \omega,$$

$$N_{str}^* = \frac{\mu_m}{\epsilon_m \omega} \cdot N_{res}^*,$$

$$N_{res}^* = \frac{\epsilon_m \omega}{\mu_m} \cdot N_{str}^*.$$

Определим внутриклеточное содержание азота:

$$N_{cell}^* = N_{str}^* + N_{res}^* = N_{str}^* + \frac{\epsilon_m \omega}{\mu_m} \cdot N_{str}^* = N_{str}^* \cdot \left(1 + \frac{\epsilon_m \omega}{\mu_m}\right) = N_{res}^* \cdot \left(1 + \frac{\mu_m}{\epsilon_m \omega}\right).$$

Доля структурных форм азота в общеклеточном содержании также будет зависеть от ω :

$$\theta = \frac{N_{str}^*}{N_{cell}^*} = \frac{\mu_m}{\mu_m + \varepsilon_m \omega}.$$

Последнее уравнение показывает, что доля структурных форм азота гиперболически снижается с ростом величины удельной скорости протока за счёт увеличения концентрации резервных форм. Графически зависимость доли структурных форм азота от удельной скорости протока среды представлена на рисунке 6.10.

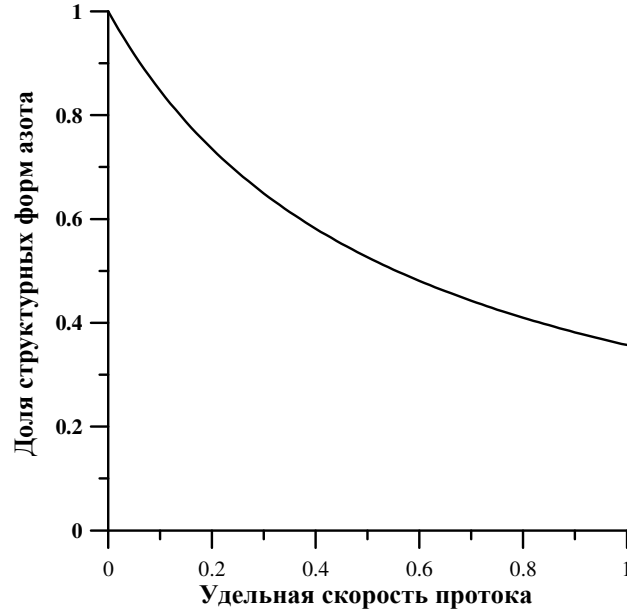


Рисунок 6.10. Зависимость доли структурных форм азота от удельной скорости протока среды

6.4.6. Зависимость удельной скорости роста от внутриклеточного содержания азота культуры

Для практического применения удобно рассматривать зависимость удельной скорости роста культуры микроводорослей от доли структурного азота, которая следует из последнего уравнения:

$$\mu = \frac{\mu_m}{\varepsilon_m} \cdot \frac{1 - \theta}{\theta}. \quad (6.16)$$

Для верификации (6.16) рассмотрим экспериментальные данные, представленные на рисунке 1.4 (см. главу 1). Доля структурных форм азота θ численно равна отношению минимальной квоты q_{min} к Q , так как минимальное клеточное содержание азота будет наблюдаться при исчерпании всех резервных составляющих. Поэтому для нахождения доли структурных форм для каждой температуры константу q_{min} разделим на клеточную квоту. На рисунке 6.11 (А, В, С) представлена аппроксимация уравнением (6.16) экспериментальных данных [189]. 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 μ_m . Аппроксимация позволила определить коэффициенты модели: максимальную удельную скорость роста, максимальное клеточное содержание резервных форм азота, минимальную долю структурных форм. Полученные результаты подтверждают ранее полученные результаты (см. главу 4.4) для *Scenedesmus* sp.: максимальная удельная скорость роста зависит от температуры и описывается в виде ломаной. Значения максимального содержания резервных форм азота с учётом (6.13) позволяют определить величины максимальной удельной скорости поступления азота в клетки для *Scenedesmus* sp. Результаты представлены в таблице 6.1. Отметим, что величина μ_{Nm} также зависит от температуры.

Таблица 6.1. Кинетические коэффициенты культуры *Scenedesmus* sp. при различных температурах, рассчитанные с помощью аппроксимации уравнением (6.16) данных [189]

Температура, °C	Максимальная удельная скорость роста, сут ⁻¹	Максимальная удельная скорость поступления азота в клетки, сут ⁻¹	Максимальное содержание резервных форм азота	Минимальная доля структурных форм азота
11	0.5	1	1	0.5
16	0.82	1.52	0.84	0.54
20, 25	1.13	3.05	1.64	0.37

6.4.7. Зависимость удельной скорости роста от внешней концентрации азота

Предлагаемая модель (6.11) позволяет найти связь удельной скорости роста с концентрацией азота в среде. Для этого необходимо переписать систему уравнений (6.11) через концентрации структурных, резервных форм и концентрацию азота в среде:

$$\begin{cases} \mu = \mu_m \frac{N_{res}}{N_{res1}}, \\ \mu = \mu_{Nm} \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{N}{N_1} - \mu_m \frac{N_{str}}{N_{res}} \frac{N_{res}}{N_{res1}}. \end{cases} \quad (6.17)$$

Первое уравнение системы (6.17), показывает, что удельная скорость роста микроводорослей линейно зависит от концентрации резервных форм азота в области лимитированного роста. На рисунке 6.11 D представлена аппроксимация экспериментальных данных [189] данным уравнением. N_{res} есть разница между клеточной Q и минимальной квотой q_{min} . Согласно (6.17), удельная скорость роста равна нулю при исчерпании всех резервных форм азота и достигает максимального значения μ_m при некоторой насыщающей концентрации N_{res1} .

Данные параметры зависят от температуры, так как определяются активностью ферментов, которые участвуют в ассимиляции и преобразовании азота [150].

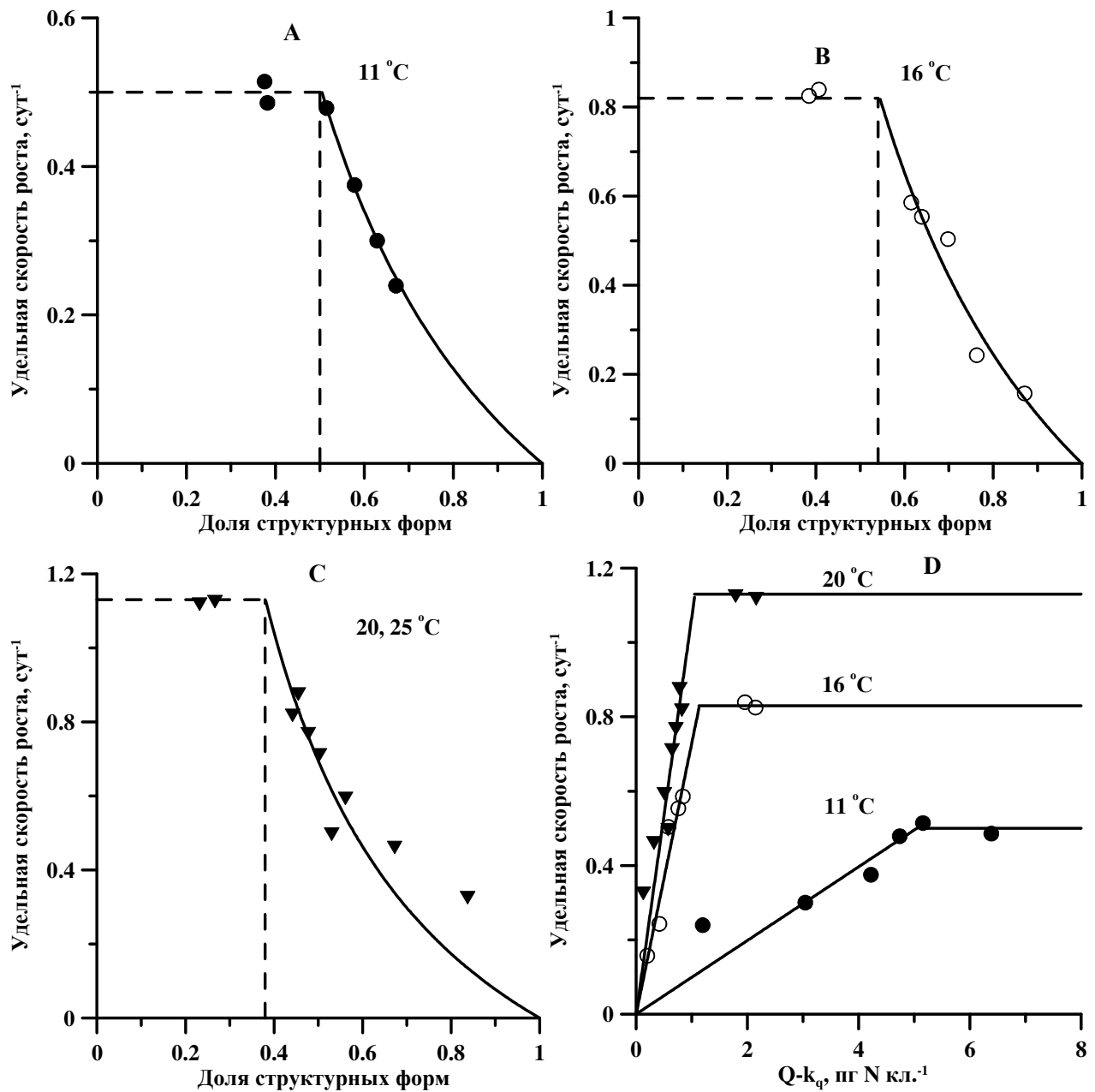


Рисунок 6.11. Зависимость удельной скорости роста *Scenedesmus* sp. от доли структурных форм азота при различных температурах по данным [189]. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (6.16). Значения коэффициентов в тексте

Третье уравнение системы (6.17) позволяет выявить взаимосвязь удельной скорости роста и концентрации азота во внешней среде:

$$\mu^* = \mu_{Nm} \frac{1}{\varepsilon^*} \frac{N^*}{N_1} - \mu_m \frac{1}{\varepsilon^*} \frac{N_{res}^*}{N_{res1}}.$$

Приравняем второе и третье уравнение системы (6.17), найдем взаимосвязь величины ε^* с концентрацией азота в среде:

$$\varepsilon^* = \frac{\mu_{Nm} N_{res1}}{\mu_m N_1} \frac{N^*}{N_0 - N^*}.$$

Подставляя значение ε^* , получим:

$$\mu^* = \frac{\mu_m \mu_{Nm} \cdot (N_0 - N^*) N^*}{\mu_{Nm} N_{res1} N^* + \mu_m N_1 \cdot (N_0 - N^*)},$$

Так как разница между концентрацией азота на входе N_0 и в среде N^* равна его концентрации в клетке N_{cell} , окончательно получим:

$$\mu^* = \frac{\mu_m N^*}{\frac{\mu_m}{\mu_{Nm}} N_1 + \frac{N_{res1}}{N_{cell}} N^*}. \quad (6.18)$$

Уравнение (6.18) отображает гиперболическую зависимость μ от N^* и по форме идентично модели Моно. Очевидно, что (6.18) будет работать только при постоянной клеточной концентрации N_{cell} , неизменных световых и температурных условиях, которые определяют активности ферментов (μ_m и μ_{Nm}), участвующих в поглощении и метаболизме азота в клетках микроводорослей. В литературе использование уравнения Моно при описании кинетики зависимости скорости роста микроводорослей от концентрации субстрата практически не встречается, обычно предпочтение отдается модели Друпэ. Однако в хемостате, когда клетки находятся в постоянных физико-химических условиях среды, при этом происходит стабилизация их биохимического состава, использование гиперболической зависимости μ от N^* допустимо.

6.5. Заключение к главе 6

В разделе рассмотрена кинетика различных форм азота в клетках микроводорослей в хемостате. В соответствии с предлагаемым подходом к моделированию фотобиосинтеза (см. глава 4), 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. Следует подчеркнуть, что скорости линейно зависят не от концентрации нитратов в среде, а от приведённой плотности потока азота на единицу ключевого ферментного комплекса, участвующего в ассимиляции нитратов и их дальнейшем преобразовании [125]. Полученные частные решения общей системы (6.3) позволяют описать зависимость удельной скорости роста от доли структурных форм азота в его внутриклеточном содержании (6.16), а также от концентрации азота в среде (6.18). Выражение (6.16) описывает многочисленные литературные данные зависимости удельной скорости роста от внутриклеточного содержания азота. В отличие от подхода Друпэ,

выражение (6.16) показывает, что удельная скорость роста культуры зависит от доли структурных форм азота, а не от общеклеточной квоты. Кроме того, предлагаемый подход позволяет определить большее число кинетических параметров культуры микроводорослей: максимальные удельные скорости поступления азота в клетки, включения в структуру, максимальное содержание резервных форм азота, минимальную долю структурных форм азота в общеклеточном содержании.

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 [166, 168]. В его основе лежит основополагающий закон оптики Бугера-Ламберта-Бера, согласно которому оптическая плотность поглощающего раствора прямо пропорциональна концентрации растворённого вещества:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot C},$$

где I , I_0 – интенсивность плоской монохроматической выходящей и падающей на слой вещества l световой волны, ε – коэффициент экстинкции, зависящий от свойств растворённого вещества, C – концентрация растворенного вещества.

В клетках низших фотоавтотрофов основная доля поглощённого света приходится на фотосинтетические пигменты. Помимо этого, свет поглощают и рассеивают и другие структурные компоненты. Поглощение света структурными элементами клеток, не связанное с пигментами, называется неспецифическим [106]. Коэффициент экстинкции ε (коэффициент ослабления света) определяется как поглощенной, так и рассеянной световой энергией. В литературе выделяют неспецифическое рассеяние, которое происходит на самих клетках, а также специфическое – обусловленное фотосинтетическими пигментами [79]. При необходимости получить именно величину поглощения суспензии клеток используют прибор со специальной приставкой – интегрирующей сферой (ИС), направляющей рассеянные лучи на регистрирующий элемент. Однако даже при использовании ИС, спектры поглощения микроводорослей могут содержать вклад рассеяния, что приводит к необходимости введения поправочных коэффициентов [79]. Исследование влияния рассеяния света на величину оптической плотности культуры представляется отдельной работой и далее рассматриваться не будет.

По определению, оптическая плотность раствора на данной длине волны прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества:

$$D = \varepsilon \cdot l \cdot C.$$

Применительно к культуре микроводорослей, оптическая плотность на длине волны неспецифического поглощения, например 750 нм, прямо пропорциональна концентрации клеток в растворе, или биомассе B :

$$D_{750} = \varepsilon \cdot l \cdot B.$$

При постоянстве коэффициента экстинкции ε и фиксированном оптическом пути l , получим линейную взаимосвязь оптической плотности культуры с биомассой микроводорослей:

$$D_{750} = k \cdot B.$$

Однако, вследствие высокой гетерогенности культуры микроводорослей, а также для культур высокой плотности, наблюдаются значительные отклонения от линейной зависимости между оптической плотностью и биомассой микроводорослей [27]. На рисунке 7.1 представлена кривая зависимости оптической плотности культуры спироулины *Arthrospira platensis* от её биомассы. Как следует из рисунка, кривая не описывается линейной зависимостью во всем диапазоне данных. В области небольших концентраций клеток, примерно до 0,9 г/л и 0,6 ед. опт. пл., кривая достаточно хорошо описывается линейным уравнением. При нулевом значении биомассы величина оптической плотности также должна равняться нулю, однако полученные результаты свидетельствуют о том, что при нулевой биомассе оптическая плотность должна составлять около 0,03 единиц. Следовательно, даже при малых концентрациях клеток культур микроводорослей применимость закона Бугера-Ламберта-Бера вызывает множество вопросов [124].

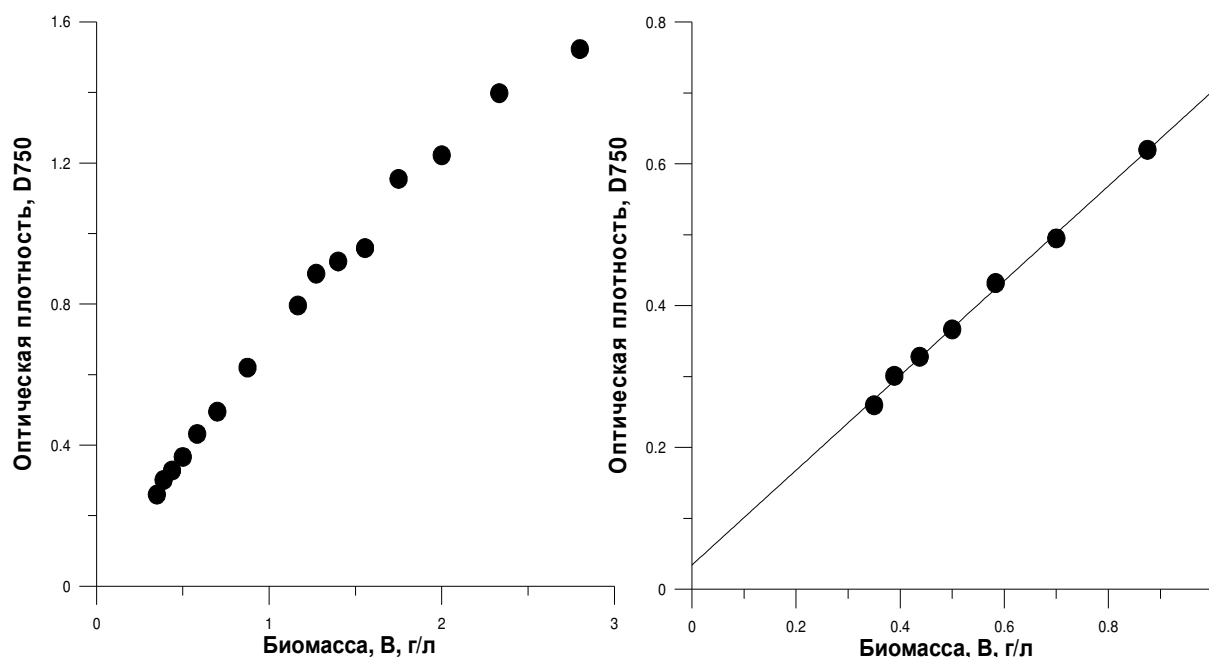


Рисунок 7.1 Зависимость оптической плотности культуры *A. platensis* от её биомассы. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением линейной регрессии

Следует отметить, что величина оптической плотности, указанная на рисунке 7.1 рассчитана как отрицательный десятичный логарифм пропускания. Так как любой оптический прибор определяет именно величину пропускания света, которое есть отношение проходящей

световой энергии к падающей, следовательно, при работе с культурами микроводорослей, при определения величины оптической плотности необходимо использовать иную зависимость между D и T , нежели в виде десятичного логарифма.

Пусть дана плоскопараллельная кювета, 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 [114], 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 [124]:

$$I_n = I_0 \cdot \alpha \cdot \frac{dS}{S},$$

$$I_{np} = I_0 - I_n.$$

Подставим первое выражение во второе и определим I_{np} :

$$I_{np} = I_0 - \frac{I_0 \cdot \alpha \cdot dS}{S}.$$

Вынесем I_0 за скобки и получим:

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

Далее правую и левую часть разделим на I_0 :

$$\frac{I_{np}}{I_0} = 1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S}.$$

Так как $\frac{I_{np}}{I_0} = T$, где T – коэффициент пропускания, последнее выражение запишем в виде:

$$T = 1 - \frac{\alpha \cdot dS}{S}.$$

Аналогично, если в кювете находится не одна, а монослой из n клеток, получим:

$$\frac{I_{np}}{I_0} = 1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S} \quad (7.1)$$

Выражение (7.1) получено для монослоя клеток микроводорослей. В реальных условиях для разбавленных культур микроводорослей, в которых клетки не затеняют друг друга, величина коэффициента пропускания будет также определяться согласно (7.1). В (7.1) отношение числа клеток к площади поверхности кюветы называется поверхностной

концентрацией. Помножив числитель и знаменатель на длину кюветы l , получим зависимость пропускания от биомассы:

$$T = 1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot l \cdot dS}{S \cdot l},$$

$$T = 1 - \alpha \cdot B \cdot l \cdot dS.$$

Так как α , l , dS постоянные величины (при условии неизменности размеров клеток), то обозначим их произведение некой константой k :

$$T = 1 - k \cdot B. \quad (7.2)$$

Последнее выражение аналогично закону Бугера-Ламберта-Бера для малых концентраций клеток. Учитывая, что:

$$D = -\lg(T),$$

$$T = 10^{-D} = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot B},$$

при малых значениях биомассы можно разложить последнее выражение в ряд Тейлора в окрестностях нуля:

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot B} \cong 1 - \varepsilon \cdot l \cdot B + \frac{1}{2} \varepsilon \cdot l \cdot B^2 - \dots$$

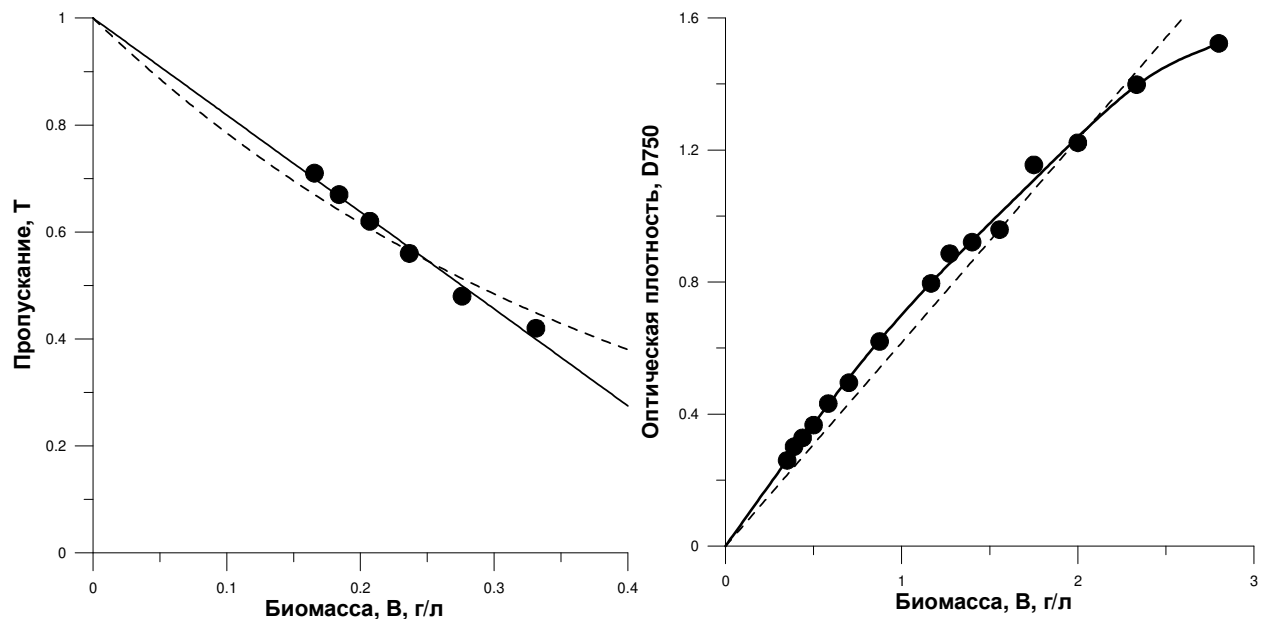


Рисунок 7.2 Зависимость пропускания и оптической плотности культуры *A. platensis* от её биомассы. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (7.2) и (7.7) соответственно. Пунктирная линия – расчёт по уравнению Бугера-Ламберта-Бера

Ограничившись только первым членом последовательности, получим линейное уменьшение пропускания с ростом плотности культуры. На рисунке 7.2 представлено описание экспериментальных данных зависимости пропускания от биомассы спироулины при малых значениях биомассы.

Если в кювете находится более одного слоя клеток микроводорослей, то поглощённая энергия второго слоя будет определяться долей проходящей энергии первого слоя. Получим выражение для нахождения оптической плотности и коэффициента пропускания для нескольких слоев. Согласно (7.2), проходящая энергия для первого слоя:

$$I_{np1} = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right).$$

Учитывая, что клетки в кювете распределены равномерно, запишем выражение для поглощенной энергии вторым слоем:

$$I_{n2} = \frac{I_{np1} \cdot \alpha \cdot n \cdot dS}{S}.$$

Интенсивность проходящего света через второй слой будет иметь вид:

$$I_{np2} = I_{np1} - I_{n2}.$$

$$I_{np2} = I_{np1} \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right) = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^2. \quad (7.3)$$

Соотношение (7.3) дает возможность определить интенсивность прошедшего света через второй слой. Очевидно, что для третьего слоя мы получим выражение аналогичное (7.3), только в третьей степени. Для k слоев это выражение будет выглядеть так:

$$I_{npk} = I_0 \cdot \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^k. \quad (7.4)$$

Чтобы найти коэффициент пропускания T , левую и правую часть разделим на I_0 :

$$\frac{I_{npk}}{I_0} = T = \left(1 - \frac{\alpha \cdot n \cdot dS}{S}\right)^k. \quad (7.5)$$

Как и в предыдущем случае, перейдем от поверхностной к объёмной концентрации клеток, помножив левую и правую часть уравнения на длину кюветы. Так как α , l , dS постоянные величины, то обозначим их некоторой константой j . Следовательно, выражение примет вид:

$$T = (1 - j \cdot B)^k. \quad (7.6)$$

Предложенный подход позволяет объяснить то, что для культур микроводорослей линейная зависимость между оптической плотностью и биомассой микроводорослей не всегда выполняется. Взаимосвязь величины оптической плотности, которую показывает любой оптический прибор, с биомассой микроводорослей можно записать следующим образом:

$$D = -\lg T.$$

Подставляя (7.6) в последнее уравнение, получим нелинейную зависимость между величиной оптической плотности и биомассой микроводорослей:

$$D = -\lg(1 - j \cdot B)^k.$$

Для упрощения обработки экспериментальных данных, разложим последнее выражение в ряд Тейлора при малых значениях биомассы:

$$D = -\lg(1 - j \cdot k \cdot B + \frac{1}{2} \cdot j^2 \cdot k \cdot (k-1) \cdot B^2 - \frac{1}{6} \cdot j^3 \cdot k \cdot (k-1) \cdot (k-2) \cdot B^3 + \dots).$$

Вводя обобщенные коэффициенты, окончательно получим:

$$D \cong -\lg(1 - a \cdot B + b \cdot B^2 - c \cdot B^3). \quad (7.7)$$

На рисунке 7.2 представлена аппроксимация зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей уравнением (7.7). Отметим, что предложенная модель с заданной степенью точности описывает отклонения от линейного закона зависимости оптической плотности культуры микроводорослей от ее биомассы. Уравнение (7.7) является довольно упрощённым, так как не учитывает изменение размеров и содержания биохимических компонентов клеток микроводорослей в процессе роста культуры. Тем не менее, предложенный подход позволяет с достаточно высокой точностью описывать зависимость пропускания и оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей.

7.2. Линейный рост микроводорослей в плотных культурах

Лабораторные исследования роста микроводорослей обычно проводятся с использованием простейших систем культивирования: плоскопараллельные, цилиндрические закрытые или открытые фотобиореакторы. Обычно при культивировании микроводорослей в плоскопараллельных системах кривая роста накопительной культуры характеризуется наличием линейного участка (линейная фаза роста) [235]. Этот участок имеет относительно большую протяженность во времени, а плотность культуры иногда увеличивается в десятки раз. Например, на рисунке 7.3 представлены накопительные кривые роста *P. purpureum* и *A. platensis* при различной поверхностной облучённости в 2 см фотобиореакторах. Возможно, линейный участок накопительной кривой роста микроводорослей является результирующей относительно большого количества воздействующих факторов, которые приводят к кажущемуся постоянству скорости роста. В приведённом примере лимитирующим скорость роста фактором не может являться минеральное питание, т. к. использовали концентрированные питательные среды, культуры барботировали газовой смесью с 3 % CO₂. Единственным внешним лимитирующим фактором являются световые условия, в которых находятся клетки микроводорослей. Наиболее вероятным представляется, что изменяющиеся световые условия по-разному воздействуют на скорости синтеза тех или иных биохимических

составляющих клеток, приводя в итоге к постоянству скорости роста [128]. В литературе механизм линейного роста описан только для культур гетеротрофов [77].

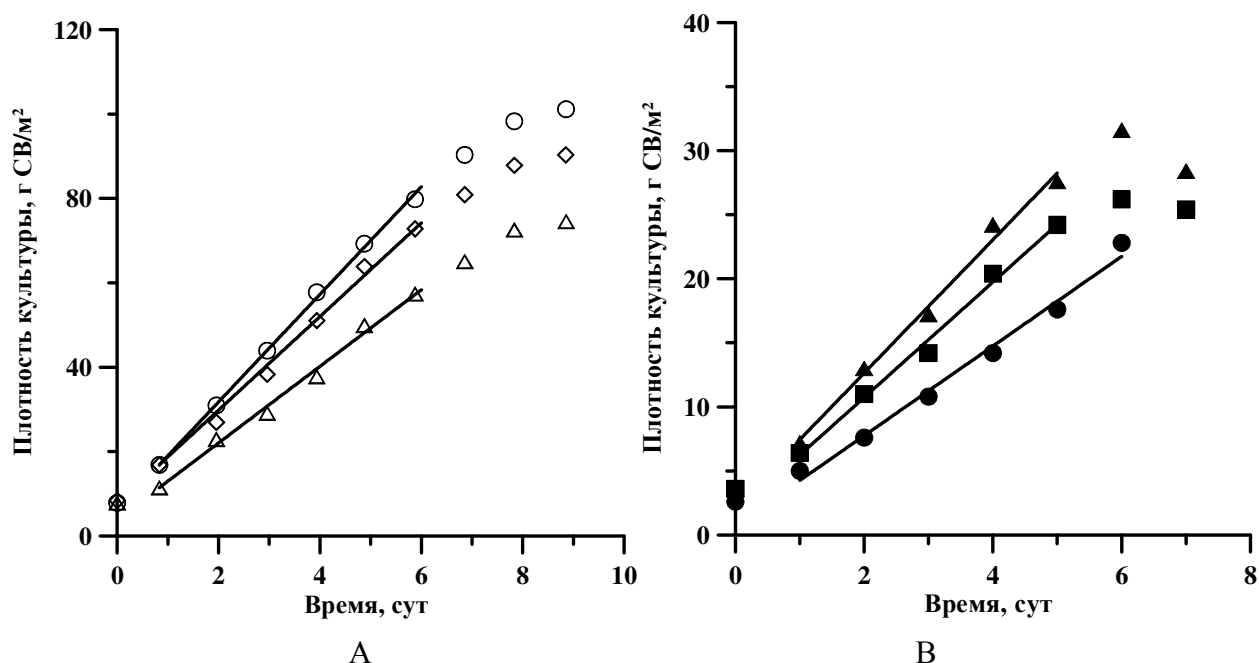


Рисунок 7.3 А – накопительные кривые роста *P. purpureum* при различной облучённости: ○ – 15 клк; ◇ – 10 клк; △ – 5 клк. В – накопительные кривые роста *A. platensis* при различной облучённости: ▲ – 8,3 клк; ■ – 6,5 клк; ● – 4,5 клк

Независимо от механизма, обеспечивающего линейный рост, постоянство скорости роста позволяет относительно простыми способами управлять биохимическим составом получаемой биомассы в довольно широком диапазоне. Это свойство очень удобно в практическом плане, т. к. без потери продуктивности можно выбрать такую плотность непрерывной культуры, при которой на выходе будет получена биомасса с заданным биохимическим составом.

Исходя из вышесказанного, необходимо получить зависимость синтеза биомассы микроводорослей и содержания биохимических компонентов в клетках микроводорослей в границах линейного участка накопительной кривой роста [128].

Ранее показано (см. главу 4), что нормированные скорости роста, в случае светового лимитирования, определяются приведённой плотностью потока энергетического субстрата λ_i :

$$P_{norm} = \mu_{norm} = \lambda_i,$$

$$\lambda_i = \frac{\varphi_e \cdot I_n}{\mu_e \cdot F_0},$$

где μ_{norm} – нормированная удельная скорость синтеза биомассы (безразмерная величина); I_n – плотность потока квантов фотосинтетически активной радиации (ФАР), поглощаемых культурой, квант/(м²·с); φ_e – число молекулы макроэрга, восстанавливающихся за счёт одного кванта, мол./квант; μ_e – активность ключевого комплекса, регулирующего энергообмен в

клетке, 1/с; F_0 – число ключевых регуляторов энергообмена, приходящееся на единицу освещаемой поверхности культуры, мол./м².

Таким образом, учитывая пропорциональность хлорофилла a и ключевого мультиферментного комплекса, удельная скорость синтеза биомассы обратно пропорциональна концентрации хлорофилла a :

$$\mu_{\text{норм}} = \frac{\Phi_e \cdot \alpha \cdot I_0}{\mu_e \cdot f \cdot \pi}, \quad (7.8)$$

где α – коэффициент поглощения света, I_0 – облучённость поверхности фотобиореактора, Вт·м⁻², f – коэффициент пропорциональности между F_0 и π , π – концентрация хлорофилла a , мг·м⁻².

Выражение (7.8) показывает, что удельная скорость синтеза биомассы определяется поверхностной облучённостью, коэффициентом поглощения света и концентрацией хлорофилла a . Остальные параметры, входящие в выражение (7.8) в условиях светолимитирования можно считать постоянными (см. главу 5).

Зависимость коэффициента поглощения от концентрации хлорофилла a представлена на рисунке 7.4 А. 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 $0,015$ – удельное поглощение, м²·мг⁻¹ для *A. platensis*, *T. viridis* и *P. purpureum* соответственно.

Таким образом, при поверхностной концентрации хлорофилла a 1 мг·м⁻² клетки поглощают около 2 % падающего света.

В общем случае, вследствие высокой гетерогенности культуры микроводорослей, а также рассеяния света в культурах высокой плотности, наблюдаются значительные отклонения от линейной зависимости между оптической плотностью и биомассой. Применимость уравнения Бугера-Ламберта-Бера при определении биомассы микроводорослей по оптической плотности культуры вызывает множество вопросов. Более точно зависимость α от поверхностной концентрации хлорофилла a описывается уравнением, которое может быть получено на основе подхода, рассмотренного в разделе 7.1:

$$\alpha \cong \frac{k\pi + (k\pi)^2}{1 + k\pi + (k\pi)^2}. \quad (7.9)$$

Как видно на рисунке 7.4 для высоких концентраций хлорофилла выражение (7.9) с более высокой точностью ($R^2=0,999$) описывает кривую коэффициента поглощения по сравнению с законом Бугера-Ламберта-Бера. По литературным данным известно, что данный параметр определяется спектральным составом света, и варьирует от 0.005 до 0.03 м²·мг⁻¹ для различных систематических групп низших фотоавтотрофов [9].

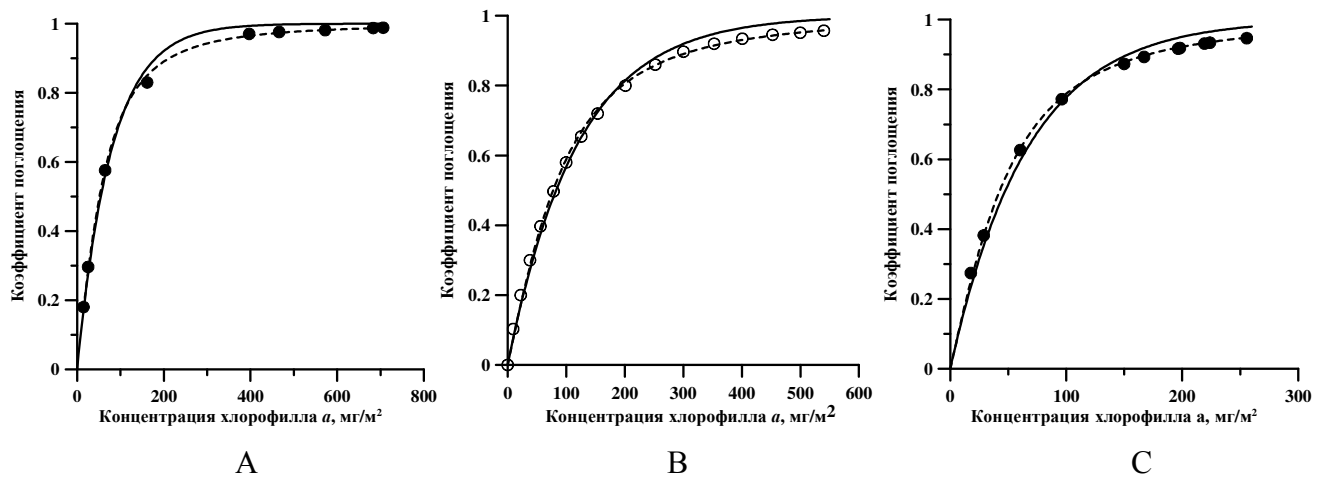


Рисунок 7.4 Зависимость коэффициента поглощения от концентрации хлорофилла a культуры *A. platensis* (А), *T. viridis* (В) по данным [112] и *P. purpureum* (С). Линия – аппроксимация экспериментальных данных законом Бугера-Ламберта-Бера, пунктирная линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (7.9). Значения коэффициентов в тексте

Полученные результаты позволяют учесть изменение коэффициента поглощения света с ростом плотности культуры. Например, для линейного участка накопительной кривой получить выражение зависимости удельной скорости роста культуры *A. platensis* от концентрации хлорофилла a [75]:

$$\mu = \mu_m \frac{\Phi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{\pi} - \mu_r, \quad (7.10)$$

где $\mu_m = 1 \text{ сут}^{-1}$ – максимальная удельная скорость роста, определённая на экспоненциальной фазе; $I_0 = 16 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ – облучённость поверхности фотобиореактора; $\mu_r = 0,06 \text{ сут}^{-1}$ – удельная скорость эндогенного расхода биомассы.

На рисунке 7.5 А представлена аппроксимация экспериментальных данных выражением (7.10). Результаты моделирования подтверждают ранее высказанное предположение, что удельная скорость роста культуры на линейном участке накопительной кривой определяется количеством поглощённой биомассой энергии на единицу хлорофилла [75, 128].

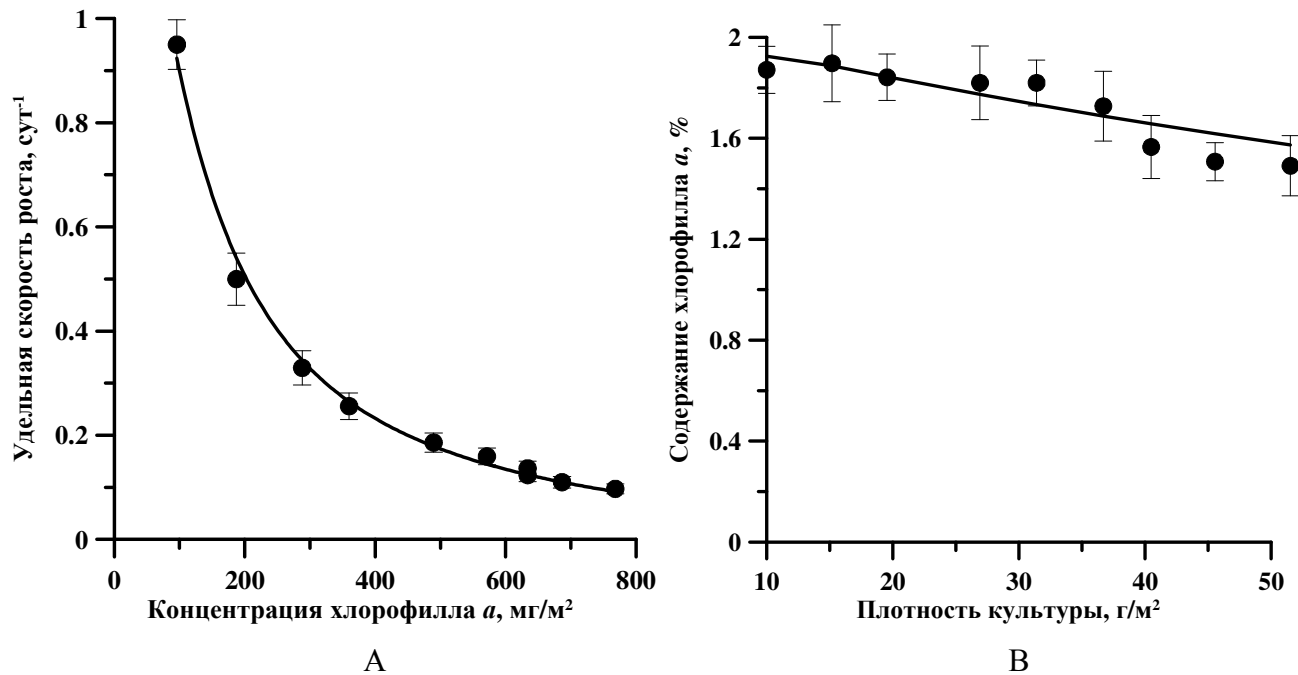


Рисунок 7.5 А – зависимость удельной скорости роста от концентрации хлорофилла *a* накопительной культуры *A. platensis*. Линия – аппроксимация экспериментальных данных выражениями (7.10). В – Зависимость относительного содержания хлорофилла *a* от плотности культуры *A. platensis* на линейной фазе роста. Линия – расчётная кривая по выражению (7.13)

Покажем, что постоянство продуктивности кроме световых условий связано с изменением биохимического состава клеток *A. platensis*. По определению, продуктивность равна произведению удельной скорости на биомассу:

$$P = \mu \cdot B. \quad (7.11)$$

Поставляя (7.10) в (7.11), получим:

$$P = \mu_m \cdot \frac{\Phi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{\pi} \cdot B - \mu_r \cdot B.$$

При любых экспериментальных исследованиях биохимического состава культуры микроводорослей основным параметром является содержание того или иного компонента в биомассе, выраженное в долях или в процентах от сухого веса. Так относительное содержание хлорофилла *a* запишется в виде:

$$\beta = \frac{\pi}{B}.$$

Окончательно, продуктивность культуры имеет вид:

$$P = \mu_m \cdot \frac{\Phi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{\beta} - \mu_r \cdot B. \quad (7.12)$$

Для линейной фазы роста продуктивность культуры постоянна: $P = P_m$. Из (7.12) следует, что это возможно только в случае уменьшения β :

$$\mu_m \cdot \frac{\Phi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{\beta} = P_m + \mu_r \cdot B,$$

$$\beta = \mu_m \cdot \frac{\Phi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.017 \cdot \pi}}{P_m + \mu_r \cdot B}. \quad (7.13)$$

Выражение (7.13) показывает, что с ростом плотности культуры микроводорослей, относительное содержание хлорофилла a (а значит и общего белка и других структурных компонентов биомассы) гиперболически снижается. На рисунке 7.5 Б представлена зависимость относительного содержания хлорофилла a от плотности культуры и расчётная кривая с учётом определённых ранее видоспецифических параметров выражения (7.13).

Таким образом, установлена количественная взаимосвязь удельной скорости роста культуры и концентрации хлорофилла a . Показано, что постоянство продуктивности на линейном участке накопительной кривой обусловлено снижением доли структурных компонентов биомассы [75].

7.3. Расчёт максимальной продуктивности культуры микроводорослей в условиях естественного освещения

Известно, что при выращивании микроводорослей в условиях естественного освещения, наблюдается суточные колебания скорости роста культуры и продукции основных биохимических компонентов (белков, жиров, углеводов). В течение светового периода (днём) в клетках микроводорослей наблюдается накопление полисахаридов и липидов, а в ходе темнового (ночью) – падение их содержания. При этом до настоящего времени не выявлены количественные закономерности между параметрами фотопериода, скоростью роста и биосинтеза липидов, углеводов и белков [219]. Параметр продуктивности (скорости роста) культуры можно рассматривать как обобщенную характеристику её физиологического состояния, так как он включает в себя всю совокупность биосинтетических и биоконверсионных процессов в клетках микроводорослей. Исследование суточной динамики продуктивности в зависимости от количества световой энергии является первым шагом для разработки теоретических основ роста микроводорослей в условиях естественного освещения.

На сегодняшний день установлены количественные зависимости трансформации вещества и энергии в клетках микроводорослей в условиях циркадных ритмов как для фитопланктона [42], так и для искусственных систем [277]. Массово микроводоросли, как правило, выращивают в открытых и закрытых фотобиореакторах под открытым небом, что

обуславливает суточную ритмику роста и биосинтеза. Как следствие, большинство работ в этой области носят прикладной биотехнологический характер.

Для примера оценим максимальную продуктивность одного из массовых объектов альготехнологии – дуналиеллы солоноводной *D. salina*, которая культивируется в промышленных масштабах с конца прошлого века. В литературе приводятся немногочисленные данные о продуктивности дуналиеллы в условиях открытых бассейнов. Так в работе [193] указывается, что средне годовая продуктивность культуры составила 1,65 г СВ/(м²·сут), а продукция β-каротина – 0,1 г/(м²·сут) для условий проточной культуры, 10 см глубины бассейна, 0,7 – 0,9 млн. кл./мл. Максимальная продуктивность составила около 3 г СВ/(м²·сут) и продукция β-каротина – 0,3 г/(м²·сут), при этом максимальный приток солнечной радиации в области ФАР составлял около 12 МДж/(м²·сут) в июне месяце в районе юго-западной Испании. По данным [121] продуктивность дуналиеллы достигает 3,59 г СВ/(м²·сут) при её выращивании в условиях центрального Крыма. Так как широты Италии и Испании характеризуются более высоким (в 1,6 раза) притоком суммарной солнечной радиации по сравнению с Крымом в районе г. Севастополя [28], то, соответственно, продуктивность дуналиеллы в Крыму должна быть примерно в 1,5 раза ниже, нежели в Испании. Однако на практике мы видим, что продуктивность в условиях Крыма более чем в 2 раза превышает полученную в [193]. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что скорость роста дуналиеллы в работе [193] ограничена не световыми условиями, а другими факторами среды. Следовательно, возникает вопрос об оценке максимально возможной, предельной скорости роста дуналиеллы, которая может быть ограничена только световыми условиями [155].

Наблюдаемая скорость роста культуры микроводорослей определяется разностью между валовой продуктивностью и скоростью эндогенного расхода биомассы. Валовая продуктивность P_0 определяется притоком энергии ФАР, коэффициентом поглощения, а также эффективностью её утилизации (КПД фотобиосинтеза). При расчёте будем считать, что вся энергия поглощается суспензией микроводорослей, т. е. коэффициент поглощения света равен единице. При плотности культуры превышающей 0,5 г СВ/л, и глубиной бассейна не менее 10 см, такое предположение близко к истине [219]. Таким образом, выражение для определения P_0 имеет вид:

$$P_0 = \eta \cdot \frac{E}{R},$$

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

Согласно литературным данным, КПД фотобиосинтеза определяется количеством приходящей световой энергии и имеет сложный характер зависимости от поверхностной

облучённости [10]. В современной литературе отсутствуют сведения о КПД фотобиосинтеза культуры *D. salina*. Поэтому для расчётов воспользуемся данными работы [110] для зелёной микроводоросли *Tetraselmis viridis*, характеризующуюся схожим набором фотосинтетических пигментов (см. рисунок 7.6).

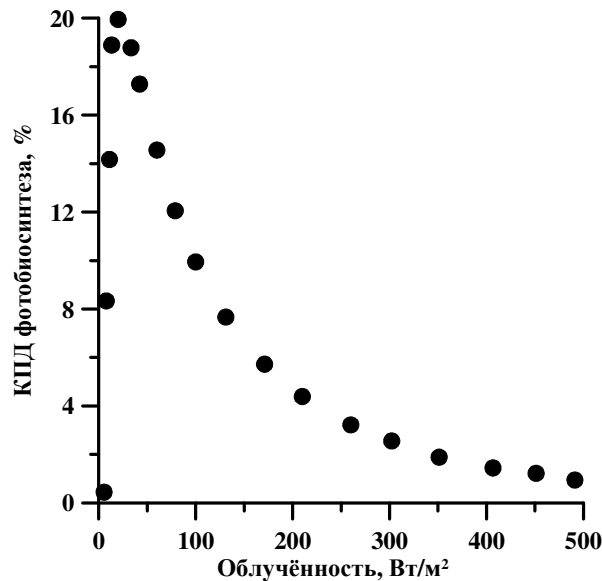


Рисунок 7.6 Зависимость КПД фотобиосинтеза *T. viridis* от облучённости [110]

При расчёте валовой продуктивности *D. salina* используем среднее за световой день значение КПД, которое составило:

$$\eta = \frac{\int_5^{491} \eta(E)}{491 - 5} \cong 5,58 \text{ \%}.$$

Оценим суммарное количество энергии в области ФАР, попадающее на поверхность бассейна в течение светового дня. Спектральный состав солнечной радиации представлен на рисунке 7.7 [53]. Для наших условий (г. Севастополь) максимальная высота солнцестояния составляет около 68 градусов 22 июня (день летнего солнцестояния).

Для определения количества полной энергии ФАР, приходящейся на поверхность бассейна, необходимо перевести определяемую датчиком [138] освещённость в энергетические единицы облучённости. Для этого используем соотношение [3]:

$$E_0 = 1,464 \cdot 10^{-3} \cdot N \cdot E_v,$$

где E_0 – облучённость, Вт/м²; E_v – освещённость поверхности, лк, N – отношение величин полной и определяемой люксметром световой энергии.

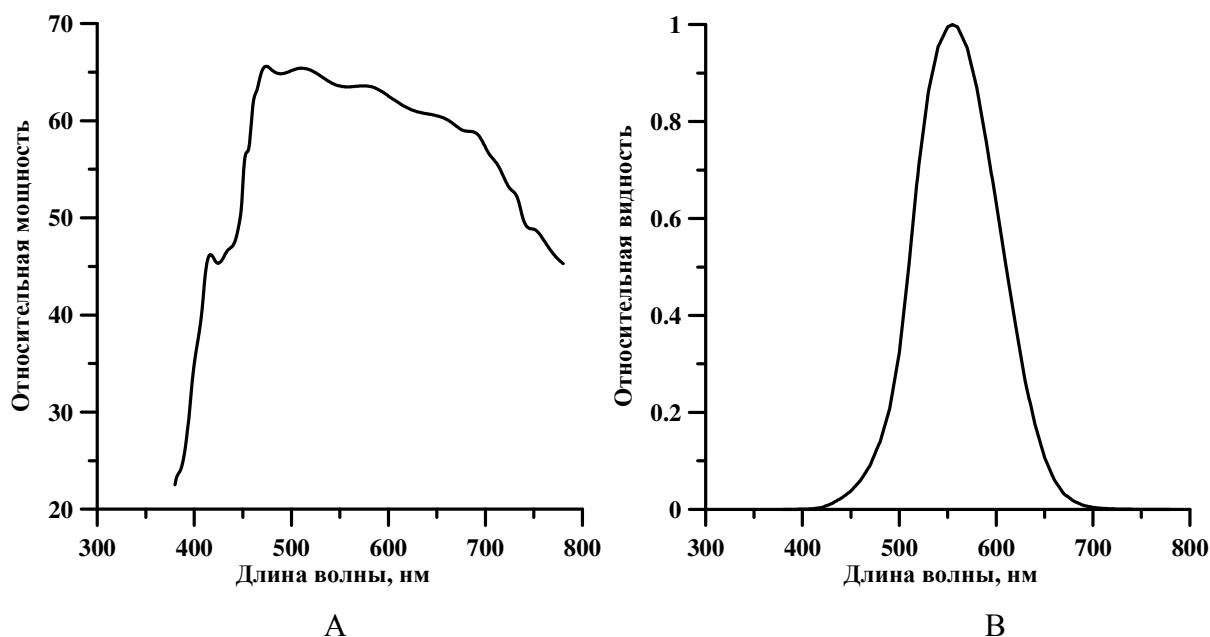


Рисунок 7.7. А – Распределение энергии в солнечном свете в области ФАР в районе г. Севастополя 22.06.2018 г. [53]. В – спектр чувствительности люксметра

Для нахождения N , вычислим долю энергии δ_i , которая высвечивается на каждой длине волны. Для этого просуммируем все величины относительной мощности излучения, далее для каждой длины волны разделим относительную мощность на полученную сумму. Умножая δ_i соответствующее значение относительной видности, определим количество определяемой люксметром световой энергии. С учетом указанных спектров (см. рисунок 7.8), величина N составляет 3,04. Таким образом, при максимальной за световой день освещённости в 85,57 клк на поверхность бассейна падает:

$$E_0 = 1,464 \cdot 10^{-3} \cdot 3,04 \cdot 85570 = 380,84 \text{ Вт/м}^2.$$

Изменение облучённости в течение суток представлено на рисунке 7.8. Суммарная энергия, падающая за световой день на поверхность бассейна, составляет 10,38 МДж/м². Полученное значение примерно на 15 % ниже, чем для широты Испании или Италии, где максимальный приток солнечной радиации в области ФАР составляет около 12 МДж [193].

Средняя калорийность R 1 г биомассы *D. salina*, как и многих других видов микроводорослей, составляет около 5 ккал или 20,86 кДж [10, 155]. Отметим, что калорийность биомассы определяется её биохимическим составом (соотношением белков, жиров и углеводов), который может варьировать в широких пределах и определяется условиями роста. Например, в таблице 7.1 представлены экспериментальные данные изменения биохимического состава линейно растущей культуры *T. viridis* при полном минеральном обеспечении по данным [87 – 90].

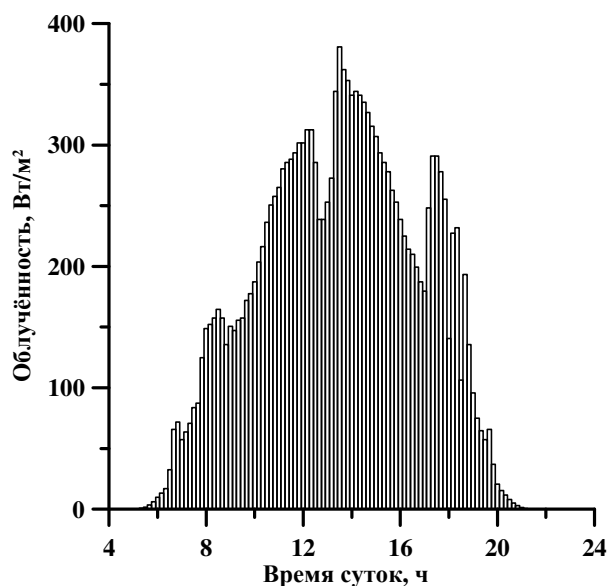


Рисунок 7.8 Зависимость облучённости поверхности бассейна в диапазоне ФАР от времени суток в районе г. Севастополя 22.06.2018 г

Таблица 7.1. Изменение биохимического состава биомассы *T. viridis* в проточном режиме на разных плотностях при полном минеральном обеспечении по данным [87 – 90]

Биомасса, г·л ⁻¹	Белок, г·л ⁻¹	Углеводы, г·л ⁻¹	Липиды, г·л ⁻¹
0,64	0,26	0,162	0,066
0,70	0,28	0,297	0,072
0,82	0,30	0,388	0,130
0,90	0,32	0,408	0,155
1,00	0,34	0,388	0,290
1,10	0,35	0,451	0,285
1,20	0,37	0,533	0,330

В эксперименте авторы стабилизировали плотность культуры на различном уровне и определяли содержание белков, липидов и углеводов [87 – 90]. Считая калорийности белков, жиров и углеводов постоянными и равными 5,6, 9,3 и 4,2 ккал г⁻¹ соответственно [7, 20], определим суммарную калорийность биомассы *T. viridis*. На рисунке 7.9 представлена зависимость калорийности от плотности культуры *T. viridis*.

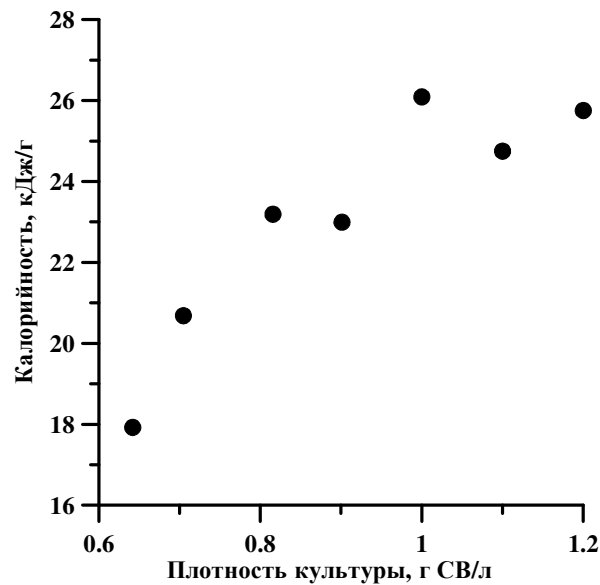


Рисунок 7.9 Зависимость калорийности от плотности культуры *T. viridis*

Полученные результаты свидетельствуют о том, что калорийность *T. viridis* изменялась в диапазоне от 18 до 26 кДж г⁻¹ и зависела от плотности культуры. Очевидно, что чем меньше калорийность биомассы микроводорослей, тем выше будет максимальная продуктивность культуры. Поэтому для оценки максимального значения продуктивности будем использовать вышеуказанное среднее значение калорийности, составляющее около 21 кДж г⁻¹ [219]. 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, составит:

$$P_0 = 0,558 \cdot \frac{10385,91}{20,86} \cong 27,8 \text{ г СВ}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут}).$$

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 [2, 157]. Ночную потерю биомассы можно выразить как долю от биомассы в конце светового периода:

$$\text{НПБ} = \frac{B_L - B_D}{B_L} \cdot 100\%,$$

где B_L – плотность культуры в конце предыдущего светового периода (г СВ/л), B_D – плотность биомассы в конце темнового периода (г СВ/л).

В рамках эксперимента по культивированию *D. salina* в условиях естественного светового режима в регионе г. Севастополя было проведено исследование суточной динамики накопления биомассы. НПБ в среднем составила около 5 % от биомассы как на основании измерений оптической плотности культуры, так и на основании измерений сырого и сухого веса [157].

Таким образом, максимальная наблюдаемая продуктивность *D. salina* составит около 26 г СВ/(м²·сут) [219].

Согласно литературным данным, максимальная продуктивность микроводорослей для условий естественного освещения достигает 21 г СВ/(м²·сут) [149]. Для *D. salina* эта величина составляет по разным данным 3 – 3,5 г СВ/(м²·сут) [121, 193]. Вероятно, снижение продуктивности обусловлено лимитированием её роста биогенными элементами среды. Реализация максимально возможной скорости роста *D. salina* осуществима только в искусственных условиях биотехнологических комплексов с высоким уровнем обеспеченности минеральным питанием. Продуктивность *D. salina* в 26 г СВ/(м²·сут) можно рассматривать как некий ориентир при организации промышленных производств в условиях южных регионов России [155, 219].

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

Рассмотрим плотную культуру микроводорослей, находящуюся в открытом плоскопараллельном бассейне при естественном освещении. Для таких условий используем предложенную ранее двухкомпонентную модель, базовым положением которой является рассмотрение фотоавтотрофного роста микроводорослей в виде двухстадийного процесса [76]. Первой стадией является собственно фотосинтез, в результате которого за счёт световой энергии происходит ассимиляция минерального углерода и превращение его в резервную (фондовую) биомассу B_{res} . На второй стадии происходит биосинтез клеточных структур B_{str} за счёт энергии, выделяющейся при окислении полисахаридов. С учётом заданных условий, базовая система уравнений, описывающая динамику трансформации структурных и ресурсных форм биомассы микроводорослей при фотоавтотрофном росте, имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dB_{str}}{dt} = q_{rs} \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{str} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat}; \\ \varepsilon_{sat}; \varepsilon \geq \varepsilon_{sat}; \end{cases} - \mu_r B_{str}, \\ \frac{dB_{res}}{dt} = \frac{\mu_m}{I_{sat}} B_{str} \begin{cases} I, I < I_{sat}; \\ I_{sat}; I \geq I_{sat}; \end{cases} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{str} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat}; \\ \varepsilon_{sat}; \varepsilon \geq \varepsilon_{sat}; \end{cases}, \end{cases} \quad (7.14)$$

где μ_m – максимальная удельная скорость фотосинтеза; I – средняя пространственная освещённость; I_{sat} – насыщающая средняя пространственная освещённость; μ_{mrs} – максимальная удельная скорость преобразования резервной биомассы в структурную; ε – соотношение резервная / структурная биомасса, ε_{sat} – насыщающее соотношение резервная / структурная биомасса; q_{rs} – экономический коэффициент перехода резервной биомассы в структурную; μ_r – удельная скорость распада структуры.

Предположим, что культура уже находится в условиях динамического лимитирования по свету, при этом минеральное обеспечение и температурные условия не являются лимитирующими факторами. Второе уравнение системы (7.14) показывает, что убыль резервных форм биомассы есть ферментативный процесс, причём доля ключевого ферментного комплекса постоянна и выражена через B_{str} . В дальнейшем не будем рассматривать случай, когда скорость преобразования резервной биомассы в структурную максимальна и не зависит от ε . Это возможно в случае резкого переноса клеток микроводорослей с высокой облучённости на низкую. При таких условиях величина B_{str} будет расти экспоненциально. В контексте данной работы подобный процесс исключён, так как за ночь вся резервная биомасса распадается [268]. С учётом обозначенных ограничений базовая система уравнений (7.14) упростится:

$$\begin{cases} \frac{dB_{str}}{dt} = q_{rs} \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{res} - \mu_r B_{str}, \\ \frac{dB_{res}}{dt} = \frac{\mu_m}{I_{sat}} B_{str} I - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{res}, \end{cases} \quad (7.15)$$

В условиях интенсивного перемешивания суспензии действующее значение интенсивности света определяется средней пространственной освещённостью I . В естественных условиях на величину I влияют интенсивность солнечного света и плотность культуры. Строго говоря, поглощение света при фотосинтезе осуществляется различными фотосинтетическими пигментами. Первичное преобразование поглощенной световой энергии в энергию химических связей макроэргов происходит в реакционных центрах П700 и П680. Поэтому будем считать, что величина средней пространственной освещённости будет убывать с увеличением концентрации хлорофилла a . Считая долю хлорофилла a в структурной биомассе постоянной, можно констатировать обратную зависимость среднестранственной облучённости и структурной биомассы [76].

Изменение в течение дня интенсивности солнечного света в области ФАР в общем случае может быть математически описано косинусом [142]. Для летнего солнцестояния на рисунке 7.10 представлено изменение облучённости поверхности горизонтального фотобиореактора, расположенного на широте г. Севастополь. Будем считать, что в интервал времени от восхода солнца (около 5:00) до 6:30 значения интенсивности света были ниже компенсационного пункта фотосинтеза, и не приводят к росту резервной биомассы. 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:

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

где k – коэффициент согласования единиц размерности.

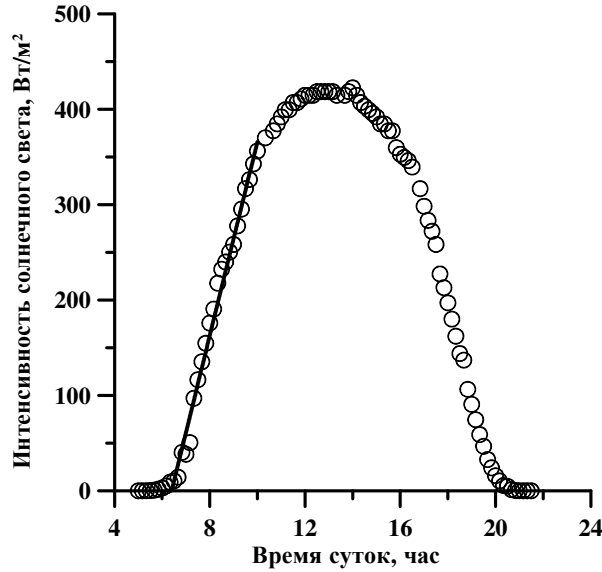


Рисунок 7.10 Изменение суточной интенсивности света на поверхности горизонтального фотобиореактора для широты г. Севастополя 21 июня 2020 г. Аппроксимация экспериментальных данных линейным сплайном. Значения коэффициентов в тексте

Для удобства вычислений примем, что начальный момент времени соответствует половине седьмого утра. Окончательно, система уравнений, описывающая рост культуры микроводорослей в утренние часы имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dB_{str}}{dt} = q_{rs} \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{res} - \mu_r B_{str}, \\ \frac{dB_{res}}{dt} = \mu_m \frac{10+100 \cdot t}{k} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{res}. \end{cases} \quad (7.16)$$

Значения констант, входящих в систему (7.16), могут сильно варьировать и являются видоспецифичными коэффициентами, значения которых рассмотрены в главе 5. Аналитические решения системы (7.16) для временного промежутка от 6:30 до 10 с начальными условиями $B_{res}(6,5) = 0$, $B_{str}(6,5) = 1$ и с подстановкой значений вышеперечисленных констант имеют следующий вид:

$$\begin{cases} B_{res} = 1,2e^{-2t} + 3t - 1,2, \\ B_{str} = 251e^{-0,1t} - 0,5e^{-2t} + 24t - 250. \end{cases} \quad (7.17)$$

Общая биомасса культуры может быть найдена как сумма первого и второго уравнений системы (7.17). На рисунках 7.11 и 7.12 представлена динамика резервной, структурной, общей биомассы микроводорослей, а также соотношения ε . Анализ полученных результатов показывает, что рост плотности культуры микроводорослей в первые часы после восхода солнца происходит только из-за накопления резервной части биомассы. В таких условиях

абсолютные значения структурной части биомассы за 4 часа практически не изменяются, причём первые несколько часов после восхода солнца наблюдается её снижение. Подобные данные получены и при культивировании микроводорослей при искусственном освещении, когда за несколько часов после включения света концентрация белка (структурная часть) не изменяется [165]. Величина ε увеличивается с течением времени, что свидетельствует о происходящих в клетках микроводорослей изменениях соотношений биохимических составляющих.

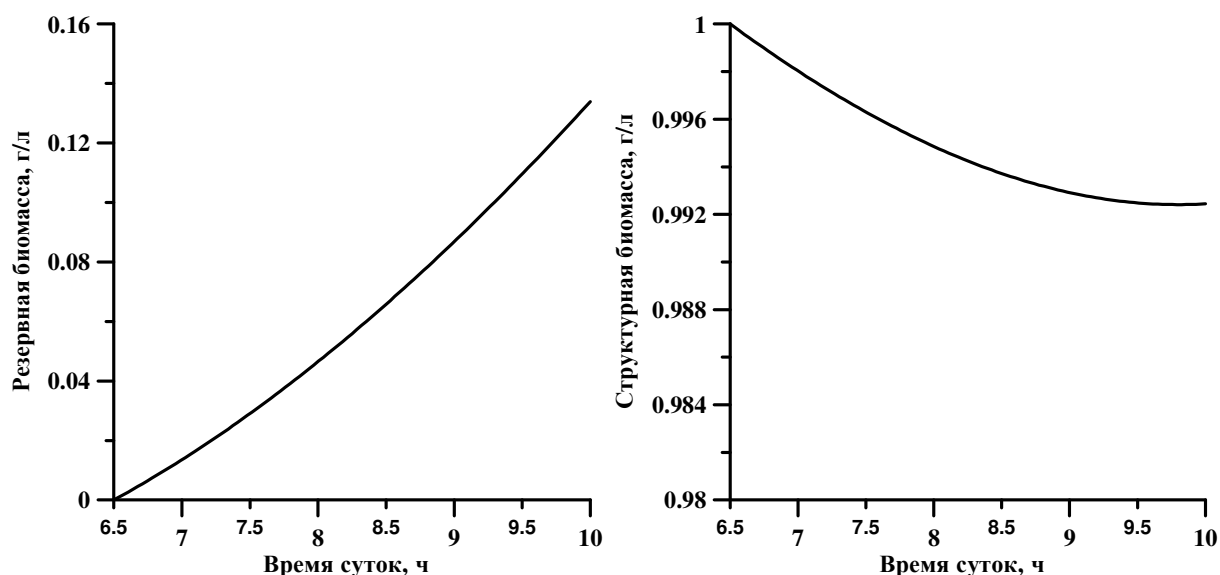


Рисунок 7.11 Динамика резервных и структурных составляющих биомассы микроводорослей в утренние часы после восхода солнца

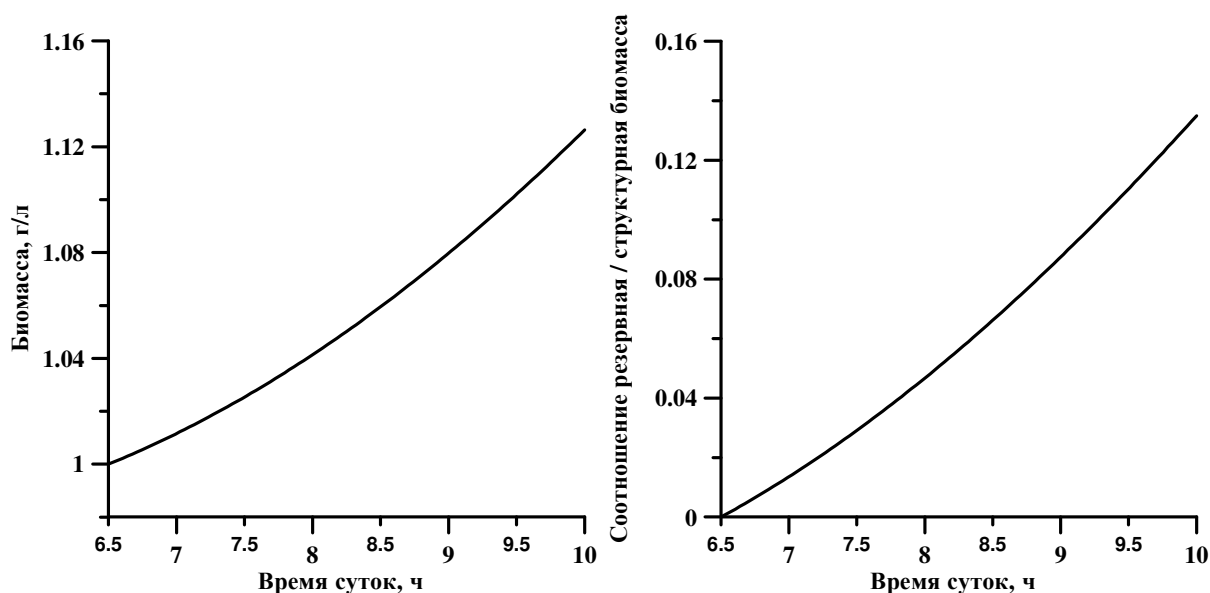


Рисунок 7.12 Динамика суммарной биомассы микроводорослей и соотношения резервная / структурная биомасса в утренние часы после восхода солнца

Таким образом, результаты моделирования показывают, что после восхода солнца рост микроводорослей в плотной культуре обусловлен только увеличением резервной части биомассы, структурная часть при этом за четыре часа практически не изменяется [76]. Синтез структурных компонентов биомассы, в т. ч. и деление клеток, происходит в течение последующего светового дня и даже в ночные часы [165, 206, 267].

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

Эффективность ассимиляции углерода является одним из важнейших видоспецифических характеристик микроводорослей. Известно, что содержание растворённого углекислого газа в среде оказывает существенное влияние на продуктивность культуры. При автотрофном выращивании снабжение водорослей углеродом обычно осуществляется с помощью газовой смеси (воздух + CO₂). Различные режимы подачи углекислоты в жидкую фазу направлены на поддержание оптимальной концентрации углерода в доступной форме в среде. Когда рост микроводорослей неограничен минеральным питанием и светом, недостаток углерода является основным лимитирующим фактором. Таким образом, подбор оптимального способа подачи углерода в культуральную среду для конкретной культуры и фотобиореактора при отсутствии минерального и светового лимитирования является определяющим для получения интенсивной культуры микроводорослей [34]. Представляется актуальным провести сравнительную оценку предельной продуктивности с экспериментально полученными значениями продуктивности при увеличении поверхности соприкосновения фаз воздух-жидкая среда. С практической точки зрения, неоправданно высокий расход углекислоты при выращивании микроводорослей ведёт к удорожанию получаемой биомассы. Выходом из такой ситуации может служить создание благоприятных условий, способствующих растворению углекислого газа, содержащегося в воздухе, в форме, оптимальной для использования клетками микроводорослей (увеличение удельной площади соприкосновения жидкой и газообразной фаз).

Проведём предельную оценку продуктивности культуры морских микроводорослей при использовании в качестве источника углерода CO₂ воздуха, скорость подачи которого составляла 1 л/мин на 1 л культуры. Учитывая, что объёмная концентрация углекислого газа в атмосферном воздухе составляет 0,03 % [94] объём CO₂, проходящий через 1 л культуры за сутки составит:

$$V(\text{CO}_2) = 0,432 \text{ л/сут.}$$

Считая условия нормальными и учитывая молярную массу CO_2 , получим эквивалент по массе углекислого газа, проходящего через 1 л культуры за сутки:

$$m(\text{CO}_2) = 0,849 \text{ г/сут.}$$

Рассчитав массовую долю углерода в CO_2 ($w = 0,273$), получим массу углерода в подаваемом воздухе на 1 л культуры в сутки:

$$m(\text{C}) = 0,231 \text{ г/сут.}$$

Считая условия для растворения CO_2 идеальными (углекислый газ полностью переходит в культуральную жидкость) и содержание углерода в биомассе микроводорослей составляет 50 % [57], получим предельное значение продуктивности с 1 л культуры в сутки:

$$P_m = 0,463 \text{ г сухой биомассы на литр в сутки.}$$

Аналогичные расчёты можно провести для определения минимального количества воздуха, необходимого для выращивания 1 грамма биомассы микроводорослей: учитывая, что содержание углерода в биомассе примерно 50 %, следовательно, необходимо подать 0,5 г чистого углерода, или, учитывая долю углерода в углекислом газе, 1,83 г CO_2 . Объём CO_2 определим с учетом известной молярной массы для нормальных условий:

$$V(\text{CO}_2) = 0,933 \text{ л.}$$

Таким образом, минимальный объём воздуха, который необходимо подать в фотобиореактор для выращивания 1 г биомассы микроводорослей примерно составляет:

$$V(\text{воздуха}) = 0,933/0,0003 = 3111 \text{ л.}$$

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 являются лимитирующими факторами. Для верификации полученных значений максимальной продуктивности, рассмотрим накопительные кривые роста красной морской микроводоросли *P. purpureum* в 2 см фотобиореакторах и поверхностной освещённости 13 клк (см. рисунок 7.13).

Следует отметить, что в обоих вариантах наблюдалось лимитирование роста порфиридиума углеродом, так как световые условия, температурные и условия минерального обеспечения были оптимальными для роста. Аппроксимация линейной фазы роста уравнением:

$$B = B_l + P_m \cdot t,$$

в обоих вариантах позволила определить величину максимальной продуктивности, которая в первом случае составила $0,1 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, а во втором – $0,4 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$. Величина максимальной удельной скорости роста во втором варианте составила $0,4 \cdot \text{сут}^{-1}$.

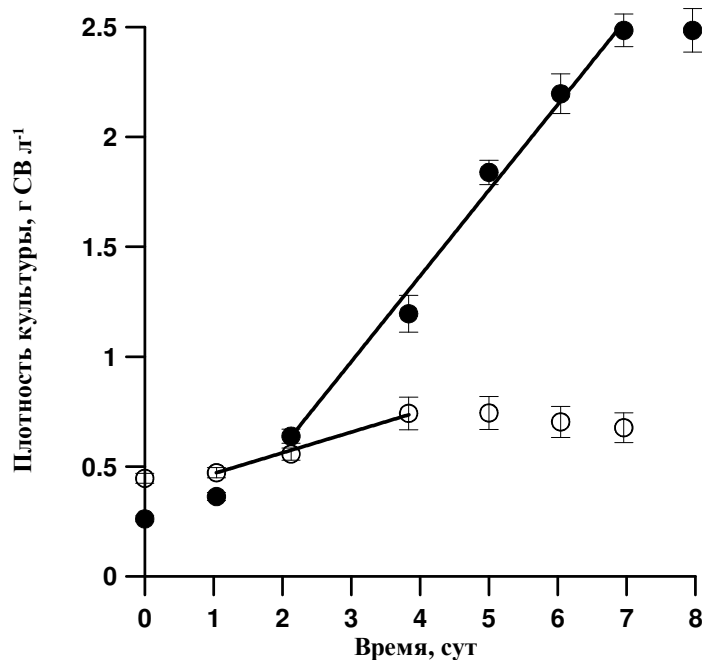


Рисунок 7.13 Накопительные кривые роста *P. purpureum* при различных способах подачи воздуха в фотобиореактор. ○ – барботаж через капилляр, ● – барботаж через аквариумный распылитель воздуха. Линия – аппроксимация линейной фазы роста. Значения коэффициентов в тексте

Определим эффективность поглощения углекислоты клетками *P. purpureum*. С точки зрения терминологии, для нашего случая корректно употребление термина "фиксация" углерода, который подразумевает не только поглощение (ассимиляцию), но и преобразование из неорганической в органическую форму [30]. С учетом определенной скорости подачи воздуха (1,25 л/мин) коэффициент фиксации углекислого газа для первого случая составил:

$$k_A = 0,1 / (1,25 \cdot 0,463) = 0,17 = 17 \, \%.$$

Для второго случая:

$$k_B = 0,4 / (1,25 \cdot 0,463) = 0,95 = 69 \, \%.$$

Таким образом, оценка предельной продуктивности культур микроводорослей при их выращивании на атмосферном воздухе (1 л/мин воздуха на 1 л культуры) показала, что максимальная продуктивность составляет 0,46 г СВ с 1 л культуры в сутки [34]. Экспериментально показано, что при интенсивном культивировании *P. purpureum* на распыляемом атмосферном воздухе максимальная продуктивность составила 0,4 г СВ с 1 л культуры в сутки, а средняя за 7 суток выращивания – 0,26 г СВ с 1 л культуры в сутки (при скорости продувки 1,25 л/мин). При увеличении удельной поверхности соприкосновения фаз воздух-жидкая среда значительная часть углекислого газа растворяется и используется культурой для её роста.

7.6. Заключение к главе 7

В данной главе рассмотрен рост плотных культур микроводорослей в условиях лимитирования по свету и газовому обеспечению. Несмотря на то, что в таких условиях происходит постоянное изменение биохимического состава биомассы, наблюдаемая скорость роста культуры остаётся постоянной. Основные параметры, которые позволяют описать рост плотной культуры микроводорослей это максимальная продуктивность, калорийность биомассы, коэффициент поглощения света, фиксации углерода. Данные величины следует рассматривать как некоторые обобщённые коэффициенты физиологического состояния культуры, включающие всю совокупность биосинтетических и биоконверсионных процессов в клетках.

В общем случае для описания динамики плотности культуры необходимо учитывать зависимость коэффициента поглощения света от хлорофилла *a* или другого структурного компонента биомассы. Такая зависимость может быть получена на основе классического закона Бугера-Ламберта-Бера, либо из предлагаемой модели зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей (см. раздел 7.1). В качестве примера, получены частные решения для условий естественного освещения и полного поглощения падающей световой энергии.

Результаты моделирования свидетельствуют о том, что рост микроводорослей в плотной культуре обусловлен увеличением резервной и структурной части биомассы, но с различными скоростями. В условиях естественного освещения структурная часть при этом за первые часы после восхода солнца практически не изменяется. Независимо от механизмов поглощения света или фиксации CO₂, постоянство продуктивности культуры позволяет разрабатывать алгоритмы управления фотобиосинтезом, получения биомассы заданного биохимического состава и калорийности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе многолетних экспериментальных исследований роста накопительных культур микроводорослей различных систематических групп, установлено, что на кривой роста обычно присутствуют так называемые "изломы" – резкое изменение продуктивности культуры или продукции одного из биохимических компонентов биомассы, которые можно объяснить только сменой лимитирующего фактора. Указанное обстоятельство вынуждает нас к разделению кривой роста на несколько фаз, участков, причём динамика плотности культуры на каждом участке описывается своим уравнением, для получения которого необходимо задать зависимость скорости синтеза биомассы от конкретного лимитирующего субстрата. На первом этапе (глава 3) зависимость продуктивности от *концентрации лимитирующего субстрата* была задана линейными сплайнами. Выбор в пользу линейных сплайнов обусловлен рядом причин: 1. Возможность точного расчёта точки переключения лимитирующих факторов; 2. В области лимитированного роста при малых концентрациях субстрата углы наклона различных кинетических моделей близки к линейной зависимости; 3. Значительное упрощение математических формул, возможность получения простых интегральных выражений, описывающих динамику роста накопительной культуры в той или иной фазе. На основе такого подхода, показано, что в общем виде накопительную кривую роста необходимо разделять минимум на два участка: область нелимитированного и лимитированного роста. Для каждого участка предложено простое уравнение, позволяющее описать динамику плотности культуры (раздел 3.1), которые по форме аналогичны моделям, приводимым в литературе [107, 115], разница состоит лишь в интерпретации коэффициентов модели. Полученные уравнения в силу простоты математической записи удобно использовать при составлении прогнозов роста культуры в заданных условиях. Область применения таких моделей также ограничена только лимитированным ростом биомассы при условии отсутствии притока субстрата извне, т. е. для закрытой системы [50]. Однако даже в таком случае накопительные кривые для некоторых субстратов могут сильно различаться. Например, при лимитировании роста цианопрокариоты *A. platensis* азотом стационарная фаза практически отсутствует, и культура переходит в фазу отмирания. В случае лимитирования углеродом на стационарной фазе наблюдаются периодические колебания биомассы и pH культуральной среды. Учитывая современные знания об особенностях ассимиляции и дальнейшего метаболизма азота и углерода [249, 258], предложены уравнения, описывающие динамику роста культуры *A. platensis* при лимитировании данными биогенными элементами (разделы 3.2 – 3.4). Таким образом, показана принципиальная возможность применения линейных сплайнов при моделировании динамики

плотности накопительной культуры микроводорослей [156]. К существенным недостаткам предложенного подхода, которые значительно снижают границы применимости моделей, следует отнести предположение о постоянстве биохимического состава биомассы, которое выражается в постоянстве одного из параметров моделей – экономического коэффициента, что противоречит экспериментальным данным [194, 203]. Для учёта изменения биохимического состава биомассы в процессе роста накопительной культуры в разделе 3.5, на основе классических представлений о фотодеструкции, предложена модель, описывающую динамику относительного содержания основных фотосинтетических пигментов. Это позволило рассчитать видоспецифические параметры, на основе которых получены выражения, которые позволяют прогнозировать величину содержания пигментов при заданных условиях.

Таким образом, использование линейных сплайнов при описании кинетики субстратзависимого роста микроводорослей позволило получить несколько динамических моделей, описывающих рост биомассы и содержание основных фотосинтетических пигментов в ней. Одним из существенных недостатков является предположение о неизменности биохимического состава клеток. Кроме того, другие параметры моделей, в общем случае, также нельзя считать постоянными. Например, максимальная удельная скорость синтеза биомассы будет зависеть от облучённости культуры, т. к. для преобразования любого неорганического субстрата необходима энергия в виде АТФ [132]. Если рассмотреть процесс изменения содержания пигментов в клетках микроводорослей, то базовая гипотеза о фотодеструкции в некоторых работах экспериментально не подтверждается и подвергается сомнению [198]. Авторами цитируемой работы экспериментально показано, что доля продуктов распада хлорофилла *a* составляет около 2 % от общего количества хлорофилла для широкого диапазона облучённости. 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. Скорость метаболической реакции при субстратном лимитировании (особенно ярко это иллюстрируется при световом лимитировании) определяется не концентрацией, а величиной потока субстрата на ключевой мультиферментный комплекс с учётом его структурной организации [114]. Вышесказанное приводит к необходимости разработки новых универсальных принципов моделирования фотобиосинтеза

микроводорослей в культуре, которые, оперируя простым математическим аппаратом, позволят описать рост микроводорослей с заданной точностью.

Для достижения поставленной задачи разработан двухкомпонентный подход для моделирования фотобиосинтеза микроводорослей в культуре (глава 4), в основе которого лежит рассмотрение фотоавтотрофного роста микроводорослей в виде двухстадийного процесса. Первой стадией является собственно фотосинтез, в результате которого за счёт световой энергии происходит ассимиляция минерального углерода и превращение его в полисахариды [102]. Эти углеводы не являются структурными компонентами клеток, а представляют собой энергетический и углеродный резерв для всех последующих метаболических реакций. На второй стадии происходит биосинтез клеточных структур за счёт энергии, выделяющейся при окислении полисахаридов. При этом процесс окисления сопровождается образованием "скелетного" углерода, из которого формируются все структурные образования в клетках. Таким образом, биомасса микроводорослей является суммой структурной и резервной составляющих. Такой подход не противоречит современным моделям роста культур микроводорослей, которые также представляют биомассу как сумму двух или более составляющих [189]. Например, в работе [129] представлена трёхкомпонентная модель, описывающая динамику основных биохимических компонентов биомассы при световом или субстратном лимитировании. Широкое распространение получили двухкомпонентные DEB-модели, которые базируются на положении, что поглощённая энергия клеткой энергия преобразуется в резервную биомассу [232]. В дальнейшем пул резервной биомассы расходуется на процессы биосинтеза структуры клетки и процессы поддержания.

В отличие от классического подхода, основывающегося на представлениях ферментативной кинетики, скорость образования резервной и структурной форм биомассы были заданы линейными сплайнами и выражены через приведённые потоки энергетического или пластического субстрата на ключевой мультиферментный комплекс (раздел 4.4). Вопрос о локализации такого комплекса в клетке по-прежнему остаётся открытым. Если рассматривать световое ограничение скорости роста микроводорослей, то лимитирующим звеном является скоростью образования фотосинтетических углеводов. Большинство исследователей склоняются к тому, что самой медленной стадией фотосинтеза является активность главного компонента цикла Кальвина – РБФК (Rubisco) [78]. Для верификации предложенного двухкомпонентного подхода продемонстрирована возможность применения линейных сплайнов при описании мгновенных фотосинтетических кривых, ассимиляции нитратов, зависимости удельной скорости роста культуры от температуры (раздел 4.5).

Предложенный двухкомпонентный подход позволил исследовать механизмы влияния света на содержание хлорофилла *a* – ключевого параметра, лежащего в основе расчёта

первичной продукции в Мировом океане (глава 5). Важнейшим предположением модели является то, что хлорофилл *a* относится к структурным формам биомассы. Конечно, такую гипотезу можно подвергать сомнению. С другой стороны, известно, что у эукариотических видов микроводорослей хлорофилл *a* образует с белками комплекс, который представляет собой структурный компонент хлоропластов. Прокариотические микроводоросли также содержат хлорофилл *a* в виде комплекса с белками, которые сосредоточены в специализированных структурных компартментах [137]. Для различных условий лимитирования рассмотрено три частных решения базовой системы, описывающих зависимость содержания хлорофилла *a* от внешней интенсивности света (раздел 5.1). Равенство удельных скоростей образования резервных и структурных форм биомассы накладывает условие применимости полученных уравнений только в стационарном динамическом равновесии плотностатной культуры. Верификация полученных уравнений для *Arthrospira platensis* позволила оценить величины кинетических коэффициентов, значения которых, в целом, соответствуют теоретически рассчитанным диапазонам. Для приближённых вычислений предложено простое уравнение, которое показало высокое соответствие с экспериментальными данными для *Tetraselmis viridis* ($R^2 = 0,98$), *Dunaliella tertiolecta* ($R^2 = 0,92$) и хорошо описывает результаты для *Skeletonema costatum* и *Chlorella vulgaris* ($R^2 = 0,8$). Впервые определена доля хлорофилла *a* в структурной биомассе, которая близка по смыслу к параметру максимального содержания хлорофилла и для исследованных видов составляет 2,5 – 3,5 %.

Универсальность предлагаемого двухкомпонентного подхода продемонстрирована на примере описания кинетики и динамики субстратазависимого роста культуры микроводорослей (глава 6). Разделение биомассы на две составляющие позволило количественно описать ранее отмеченное уменьшение экономического коэффициента в процессе роста накопительной культуры при лимитировании нитратным азотом. Весь внутриклеточный азот рассматривается как сумма структурных и резервных форм. Скорость поступления азота в клетку и скорость его расхода на синтез структурной составляющей заданы в виде линейных сплайнов и выражены через соотношение структурных и резервных форм. Учтено, что параметры модели являются светозависимыми величинами. Для конкретных случаев обеспеченности азотом найдены частные интегральные решения модели. Предложено выражение, позволяющее описать рост культуры микроводорослей при отсутствии азота в среде за счёт перехода резервных форм в структурные. Верификация полученных уравнений проведена на экспериментальных данных роста зелёных микроводорослей *Dunaliella salina* и *Scenedesmus obliquus*. Для условий хемостата получены частные решения обобщённой модели динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей, а также определены граничные условия нелимитированного азотом роста культуры (раздел 6.4). Показано, что зависимость удельной скорости роста от

внутриклеточного содержания азота, описывается уравнением, по форме совпадающее с моделью Друпа [173]. Однако в отличие от модели Друпа удельная скорость роста микроводорослей зависит не от клеточной квоты, а от доли структурных форм азота. Установлено, что частным решением предлагаемой базовой двухкомпонентной модели является уравнение Моно [233], которое справедливо только при постоянстве клеточной концентрации азота, неизменных световых и температурных условиях.

Использование линейных сплайнов позволило объяснить линейный рост биомассы при накопительном культивировании. Особенно ярко такое явление наблюдается в оптически плотных культурах микроводорослей, которые растут в условиях светолимитирования. Моделирование роста культуры в таких условиях показало, что изменяющиеся световые условия по-разному воздействуют на скорости синтеза резервных и структурных компонентов биомассы, приводя в итоге к постоянству скорости роста. Следует подчеркнуть, что независимо от механизма, обеспечивающего линейный рост, постоянство продуктивности позволяет относительно простыми способами управлять биохимическим составом получаемой биомассы в довольно широком диапазоне. Это свойство очень удобно в практическом плане, т. к. без потери продуктивности можно выбрать такую плотность непрерывной культуры, при которой на выходе будет получена биомасса с заданным биохимическим составом. В промышленных масштабах микроводоросли, как правило, выращивают в открытых или закрытых фотобиореакторах под открытым небом, что обуславливает суточную ритмику роста и биосинтеза. Решения базовой двухкомпонентной модели для условий естественного освещения показывают, что после восхода солнца рост микроводорослей в плотной культуре обусловлен только увеличением резервной части биомассы. Значения структурной части биомассы за 4 – 6 часов практически не изменяются, причём первые несколько часов после восхода солнца наблюдается её снижение. Подобные выводы подтверждаются экспериментально при культивировании микроводорослей при искусственном освещении, когда за несколько часов после включения света концентрация белка (структурная часть) не изменяется [165]. Величина относительного содержания белка уменьшается с течением времени, что свидетельствует о происходящих в клетках микроводорослей изменениях соотношений биохимических составляющих. На основе полученных результатов могут быть разработаны рекомендации по получению биомассы требуемого биохимического состава.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абросов Н.С. Экологические механизмы сосуществования и видовой регуляции / Н.С. Абросов, Б.Г. Ковров, О.А. Черепанов. – Новосибирск: Наука, 1982. – 302 с.
2. Авсиян А.Л. Динамика потери биомассы в культуре *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (Cyanoprokaryota) в темновых условиях / А.Л. Авсиян // Альгология. – 2014. – Т. 24, № 3. – С. 417–420.
3. Айзенберг Ю.Б. Справочная книга по светотехнике / Ю.Б. Айзенберг. – М.: Энергоатомиздат, 1983. – 472 с.
4. Алексеев В.В. Физическое и математическое моделирование экосистем / В.В. Алексеев, И.И. Крышев, Т.Г. Сазыкина. – СПб.: Гидрометеиздат, 1992. – 367 с.
5. Антал Т.К. Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата к недостатку основных элементов минерального питания: автореф. дис. ... док. биол. наук: 03.01.02 / Антал Тарас Корнелиевич. – М., 2018. – 46 с.
6. Артюхов В.Г. Биофизика: учеб. пособие / В.Г. Артюхов, Т.А. Ковалева, В.П. Шмелев. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1994. – 336 с.
7. Базаров И.П. Термодинамика / И.П. Базаров. – М., 1991. – 376 с.
8. Барашков Г.К. Сравнительная биохимия водорослей / Г.К. Барашков – М.: Пищ. пром., 1972. – 303 с.
9. Белянин В.Н. К математической модели биосинтеза в светолимитированной культуре микроводорослей / В.Н. Белянин, Б.Г. Ковров // ДАН СССР. – 1968. – Т. 179, № 6. – С. 1463–1466.
10. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей / В.Н. Белянин, Ф.Я. Сидько, А.П. Тренкеншу. – Новосибирск: Наука, 1980. – 136 с.
11. Билич Г.Л., Крыжановский В.А. Биология. Полный курс. Т. 2. Ботаника / Г.Л. Билич, В.А. Крыжановский. – М.: Издательский дом "ОНИКС 21 век", 2002. – 544 с.
12. Биологический энциклопедический словарь. – М.: Сов. Энциклопедия, 1986. – 864 с.
13. Брильков А.В. Анализ динамической и популяционной устойчивости непрерывных культур микроорганизмов при ограничении их роста: дис. ... канд. ф.-м. наук: 03.00.02 / Брильков Анатолий Васильевич. – Красноярск, 1987. – 168 с.
14. Боровков А.Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Теод.: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.17 / Боровков Андрей Борисович. – Севастополь, 2008. – 28 с.

15. Боровков А.Б. Математическая модель светозависимого содержания пигментов в клетках микроводорослей для стационарного динамического равновесия хемотратной культуры / А.Б. Боровков // Экология моря. – 2010. – Вып. 80. – С. 17–24.
16. Боровков А.Б. Особенности накопления и соотношения пигментов в культуре *Dunaliella salina* Теод. при различной поверхностной освещённости / А.Б. Боровков, И.Н. Гудвилович // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 626–629.
17. Бородин А.В. Динамика содержания карбонатов и гидрокарбонатов в среде Заррука при выращивании микроводоросли *Spirulina platensis* (Nords.) Geitl. в накопительной культуре / А.В. Бородин // Экология моря. – 2002. – Вып. 60. – С. 48–52.
18. Вальтер Р. Современные теории и уравнения роста: Термодинамика биологических процессов / Р. Вальтер, И. Лампрехт. – М.: Наука, 1976. – С. 98 – 112.
19. Варфоломеев С.Д. Биокинетика. Практический курс / С.Д. Варфоломеев, К.Г. Гуревич. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
20. Варфоломеев С.Д. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов: учеб. пособие для биол. и хим. спец. вузов / С.Д. Варфоломеев, С.В. Калужный. – М.: Высш. шк., 1990. – 296 с.
21. Вилли К. Биология (Биологические процессы и законы) / К. Вилли, В. Детье. – М.: Мир, 1975. – 822 с.
22. Владимирова М.Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей / М.Г. Владимирова, В.Е. Семенов. – М.: АН СССР, 1962. – 60 с.
23. Вольберг М.М. Взаимодействие популяций микроводорослей и бактерий в модельной экосистеме: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.16 / М.М. Вольберг. – М.: МГУ, 1988. – 24 с.
24. Геворгиз Р.Г. Светозависимое содержание пигментов в микроводорослях. Стационарный процесс / Р.Г. Геворгиз, Р.П. Тренкеншу // Альгология. – 1998. – Т. 8, № 3. – С. 273–277.
25. Геворгиз Р.Г. Динамика биомассы *Dunaliella salina* в условиях непрерывного культивирования / Р.Г. Геворгиз, А.Б. Боровков // Экология моря. – 2005. – Вып. 67. – С. 35–37.
26. Геворгиз Р.Г. Установка для культивирования морских микроводорослей / Р.Г. Геворгиз, А.П. Шахматов // Экология моря. – 2005. – Вып. 67. – С. 44–47.
27. Геворгиз Р.Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры / Р.Г. Геворгиз, А.В. Алисиевич, М.Г. Шматок // Экология моря. – 2005. – Вып. 70. – С. 96–106.

28. Геворгиз Р.Г. Предельная оценка продуктивности микроводорослей в условиях естественного и искусственного освещения / Р.Г. Геворгиз, С.Г. Щепачёв, О.Н. Король // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 80. – С. 29–33.
29. Геворгиз Р.Г. Моделирование динамики роста популяции микроорганизмов в накопительной культуре. Закрытая система / Р.Г. Геворгиз, А.С. Лелеков, О.Н. Король // Рыбное хозяйство Украины. – 2013. – Т. 5. – С. 6 – 15.
30. Геворгиз Р.Г. Эффективность фиксации углерода в биомассе *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et. J. C. Lewin (Bacillariophyceae) в условиях накопительного культивирования / Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова // Морской биологический журнал. – 2020. – Т. 5, № 1. – С. 12–19.
31. Гительзон И.И. Экспериментальные экологические системы, включающие человека / И.И. Гительзон, Б.Г. Ковров, Г.М. Лисовский. и др. – М.: Наука, 1975. – 312 с.
32. Горбунова С.Ю. Водные фототрофы в биологической доочистке сточных вод / С.Ю. Горбунова // Гидротехническое строительство. – 2018. – № 9. – С. 14–17.
33. Гудвилевич И.Н. Продукционные характеристики *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross в условиях накопительной и квазинепрерывной культуры / И.Н. Гудвилевич, А.Б. Боровков // Альгология. – 2014. – Т. 24, № 1. – С. 34–46.
34. Гудвилевич И.Н. Способ выращивания микроводоросли *Porphyridium purpureum* / И.Н. Гудвилевич, А.С. Лелеков: пат. на изобр. 2675318 Российская Федерация. МПК C12N 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.
35. Гуревич Ю.Л. Устойчивость и регуляция размножения в микробных популяциях / Ю.Л. Гуревич – Новосибирск: Наука, 1984. – 161 с.
36. Дегерменджи А.Г. Аутостабилизация факторов, контролирующих рост в биологических системах // А.Г. Дегерменджи, Н.С. Печуркин, А.Н. Шкидченко. – Новосибирск: Наука, 1979. – 144 с.
37. Дегерменджи А.Г. Создание искусственных замкнутых экосистем земного и космического назначения / А.Г. Дегерменджи, А.А. Тихомиров // Вестник российской академии наук. – 2014. – Т. 84, №3. – С. 233–240.
38. Диксон М. Ферменты. Т. 1 / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – 392 с.
39. Дробецкая И.В. Влияние условий минерального питания на рост и химический состав *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl.: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.17 / Дробецкая Ирина Викторовна. – Севастополь, 2005. – 188 с.

40. Дробецкая И.В. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях минерального питания / И.В. Дробецкая, Г.С. Минюк, Р.П. Тренкеншу и др. // Экология моря. – 2001. – Вып. 56. – С. 41–46.
41. Дроздов-Тихомиров Л.Н. Оптимальная структура полиферментной системы / Л.Н. Дроздов-Тихомиров, А.В. Дороднов // Молекулярная Биология. – 1991. – Т. 25, № 5. – С. 1382–1390.
42. Дудуина Т.В. Первичная продукция фитопланктона и сообщества донных продуцентов юго-восточной части Баренцева моря в условиях полярного дня / Т.В. Дудуина // Труды ВНИРО. – 2014. – Т. 152. – С. 155–168.
43. Егоров В.Н. Оптимизация содержания биогенных элементов в среде культивирования морских одноклеточных водорослей с использованием кинетической модели их минерального обмена / В.Н. Егоров // Экология моря. – 1991. – Вып. 38. – С. 76–80.
44. Егоров В.Н. Влияние первичной продукции фитопланктона на оборот биогенных элементов в прибрежной акватории Севастополя (Чёрное море) / В.Н. Егоров, В.Н. Поповичев, С.Б. Гулин и др. // Биология моря. – 2018. – Т. 44, № 3. – С. 207–214.
45. Ефимова Т.В. Влияние спектрального состава света на содержание пигментов в клетках микроводорослей / Т.В. Ефимова // Морской экологический журнал. – 2011. – № 2. – С. 22–28.
46. Железнова С.Н. Продукционные характеристики морской диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin в интенсивной культуре при различных источниках азота в питательной среде / С.Н. Железнова // Морской биологический журнал. – 2019. – Т. 4, № 1. – С. 33–44.
47. Заворуева Е.Н. Лабильность первой фотосистемы фототрофов в различных условиях окружающей среды / Е.Н. Заворуева, В.В. Заворуев, С.П. Крум. – Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011. – 152 с.
48. Заика В.Е. Балансовая теория роста животных / В.Е. Заика. – К.: Нак. думка, 1985. – 192 с.
49. Зитте П. Ботаника. Том 2. Физиология растений / П. Зитте, Э.В. Вайлер, Й.В. Кадерайт и др. – М: Академия, 2008. – 496 с.
50. Ивлев В.С. Баланс энергии и вещества в закрытой биологической системе / В.С. Ивлев // Физиология морских животных. – 1966. – С. 107–115.
51. Камнев А.Н. Экологическая физиология водных фототрофных организмов. Часть 1. Водные кислородные фототрофы / А.Н. Камнев // Вопросы современной альгологии. – 2013. – №1 (3). – URL: <http://algology.ru/93>.

52. Камнев А.Н. Зачем нужен научный журнал нового формата, освещающий вопросы гидроэкологии / А.Н. Камнев, Г.С. Розенберг, В.А. Силкин // Экология гидросферы. – 2018. – №1 (2). – URL: <http://hydrosphere-ecology.ru/98>.
53. Клешнин А.Ф. Растения и свет / А.Ф. Клешнин. – М.: Изд-во АН СССР, 1954. – 459 с.
54. Ключкова В.С. Исследование влияния температуры на удельную скорость роста культуры *Arthrospira platensis* / В.С. Ключкова, А.С. Лелеков // Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника РАН. – 2022. – Т. 7, №1 (21). – С. 40–50.
55. Ковалёва И.В. Количественные закономерности изменения относительного содержания хлорофилла при совместном действии света и температуры у диатомовых водорослей / И.В. Ковалёва, З.З. Финенко // Вопросы современной альгологии. – 2019. – № 3. – С. 28–36.
56. Ковров Б.Г. Распределение концентраций веществ в околоклеточной среде : Управляемый биосинтез / Б.Г. Ковров. – М.: Наука, 1966. – 172 с.
57. Кожемяка А.Б. Зависимость концентрации органического вещества в клетке от её объёма для черноморских видов Bacillariophyta / А.Б. Кожемяка // Морський екологічний журнал. – 2014. – Т. XIII, № 1. – С. 35–43.
58. Козел Н.В. Влияние спектрального состава светодиодного излучения на структуру фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis* / Н.В. Козел, В.П. Доманский, Е.Е. Мананкина и др. // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. – 2015. – № 2. – С. 44–49.
59. Кокова В.Е. Непропорционально-проточная культура простейших / В.Е. Кокова, Г.М. Лисовский. – Новосибирск: Наука, 1976. – 76 с.
60. Колебательные процессы в биохимических и химических системах. – М.: Наука, 1967. – 440 с.
61. Конев С.В. Фотобиология / С.В. Конев, И.Д. Волотовский. – Минск: Изд-во БГУ, 1979. – 383 с.
62. Кузнецова А.В. Влияние азота на рост и фотосинтетический аппарат микроводорослей / А.В. Кузнецова, С.И. Погосян, Е.Н. Воронова и др. // Вода: химия и экология. – 2012. – № 4. – С. 68–76.
63. Куприянова Е.В. CO₂-концентрирующий механизм и его особенности у галоалкалофильных цианобактерий / Е.В. Куприянова, О.С. Самылина // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 2. – С. 144–159.
64. Курганов Б.И. Принципы интеграции клеточного метаболизма / Б.И. Курганов // Молекулярная биология. – 1986. – Т. 20. – С. 369–377.

65. Лелеков А.С. Моделирование роста и биосинтеза морских микроводорослей в квазинепрерывной культуре: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.17 / Лелеков Александр Сергеевич. – Севастополь, 2009. – 24 с.
66. Лелеков А.С. Моделирование динамики содержания пигментов в клетках одноклеточной водоросли *Dunaliella salina* Teod. на стадии каротиногенеза / А.С. Лелеков, А.Б. Боровков, Т.М. Новикова и др. // Математическая биология и биоинформатика. – 2019. – Т. 14, № 1. – С. 279–289.
67. Лелеков А.С. Динамика плотности культуры микроводорослей в стационарной фазе роста / А.С. Лелеков, Р.Г. Геворгиз // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2013. – № 108. – С. 39–44.
68. Лелеков А.С. Динамическая модель субстратзависимого роста накопительной культуры микроводорослей / А.С. Лелеков, Р.Г. Геворгиз, П.Е. Гаврилов // Вопросы современной альгологии. – 2016. – № 2 (12). – URL: <http://algology.ru/970>.
69. Лелеков А.С. Моделирование динамики роста *Arthrospira (Spirulina) platensis* и pH среды в закрытой по углероду системе / А.С. Лелеков, Р.Г. Геворгиз // Вопросы современной альгологии. – 2017. – URL: <http://algology.ru/1002>
70. Лелеков А.С. Фундаментальные принципы моделирования фотобиосинтеза микроводорослей / А.С. Лелеков, Р.П. Тренкеншу // Вопросы современной альгологии. – 2018. – № 3 (18). – URL: <http://algology.ru/1368>.
71. Лелеков А.С. Моделирование динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей. 2. Хемостат / А.С. Лелеков, Р.П. Тренкеншу // Математическая биология и биоинформатика. – 2019. – Т. 14, № 2. – С. 450–463.
72. Лелеков А.С. Моделирование световых кривых фотосинтеза линейными сплайнами / А.С. Лелеков, Р.П. Тренкеншу // Экология гидросферы. – 2019. – № 2 (4). – С. 20–29.
73. Лелеков А.С. Моделирование содержания хлорофилла *a* в культурах микроводорослей / А.С. Лелеков, Р.П. Тренкеншу // Математическая биология и биоинформатика. – 2020. – Т. 15, № 2. – С. 158–171.
74. Лелеков А.С. Двухкомпонентная модель роста микроводорослей в плотностате / А.С. Лелеков, Р.П. Тренкеншу // Математическая биология и биоинформатика. – 2021. – Т. 16, № 1. – С. 101–114.
75. Лелеков А.С. Количественные закономерности роста накопительной культуры *Arthrospira platensis* / А.С. Лелеков, Д.Н. Чернышев, В.С. Ключкова // Математическая биология и биоинформатика. – 2022. – Т. 17, № 1. – С. 156–170.
76. Лелеков А.С. Динамика макромолекулярного состава культуры микроводорослей в условиях естественного освещения. Модель / А.С. Лелеков, А.В. Ширяев // Доклады

- Международной конференции "Математическая биология и биоинформатика": под ред. В.Д. Лахно. Т. 9. – Пущино: ИМПБ РАН, 2022. – doi: 10.17537/icmbb22.5.
77. Марьин В.А. Линейный рост и пассивация активных клеток растущей культуры микроорганизмов / В.А. Марьин, Д.В. Харитонов // Техника и технология пищевых производств. – 2014. – № 4. – С. 97–106.
 78. Медведев С.С. Физиология растений: учебник / С.С. Медведев. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. – 336 с.
 79. Мерзляк М.Н. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей / М.Н. Мерзляк, О.Б. Чивкунова, И.П. Маслова и др. // Физиология растений. – 2008. – Т. 55. №3. – С. 464–470.
 80. Минкевич И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов / И.Г. Минкевич. – М.: Ижевск, 2005. – 352 с.
 81. Минкевич И.Г. Математические проблемы организации метаболических путей из биохимических реакций / И.Г. Минкевич // Математическая биология и биоинформатика. – 2016. – Т. 11. № 2. – С. 406–425.
 82. Минюк Г.С. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* при различных условиях азотного питания / Г.С. Минюк, И.В. Дробецкая, Р.П. Тренкеншу и др. // Экология моря. – 2002. – Вып. 62. – С. 61–66.
 83. Мокроносов А.Т. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты / А.Т. Мокроносов., В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова. – М: Академия, 2006. – 448 с.
 84. Молисмология Чёрного моря. Под ред. Поликарпова Г.Г. – К.: Наук. думка, 1992. – 304 с.
 85. Назипова Н.Н. Расчёт скоростей метаболических реакций в живой растущей клетке методом баланса стационарных метаболических потоков (метод БСМП) / Н.Н. Назипова, Ю.Е. Елькин, В.В. Панюков, Л.Н. Дроздов-Тихомиров // Математическая биология и биоинформатика. – 2007. – Т. 2. № 1. – С. 98–119.
 86. Непрерывное и периодическое культивирование микроорганизмов. – Красноярск, 1972. – 271 с.
 87. Новикова Т.М. Динамика белка в непрерывной культуре *Tetraselmis viridis* / Т.М. Новикова // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2016. – № 1-1. – С. 99–101.
 88. Новикова Т.М. Динамика полисахаридов в непрерывной культуре микроводоросли *Tetraselmis viridis* / Т.М. Новикова // Вопросы современной альгологии. – 2018. – № 3 (18). – URL: <http://algology.ru/1378>.

89. Новикова Т.М. Содержание липидов в клетках микроводоросли *Tetraselmis viridis* Rouch в плотностатном режиме культивирования / Т.М. Новикова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 742–744.
90. Новикова Т.М. Управление интенсивной культурой *Tetraselmis viridis* плотностатным методом / Т.М. Новикова, А.Б. Боровков // Бюллетень ДНБС. – 2013. – Вып. 108. – С. 44–50.
91. Паламодова О.С. Динамика фотоадаптации некоторых видов диатомовых водорослей / О.С. Паламодова // Экология моря. – 2009. – Вып. 78. – С. 70–74.
92. Параметрическое управление биосинтезом микроводорослей. – Новосибирск: Наука, 1980. – 120 с.
93. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С.Дж. Перт. – М.: Мир, 1978. – 330 с.
94. Полевой В.В. Физиология растений / В.В. Полевой. – М.: Изд-во "Высшая школа", 1989. – 464 с.
95. Поликарпов Г.Г. Морская динамическая радиоэкология / Г.Г. Поликарпов, В.Н. Егоров. – М.: Энергоатомиздат, 1986. – 176 с.
96. Пронина Н.А. Организация и физиологическая роль CO₂-концентрирующего механизма / Н.А. Пронина // Физиология растений. – 2000. – Т. 47, № 5. – С. 801–810.
97. Рабинович Е. Фотосинтез. Т. 1 / Е. Рабинович. – М.: ИЛ., 1951. – 648 с.
98. Работнова И.Л. Некоторые данные о закономерностях роста микроорганизмов / И.Л. Работнова // Журн. Общ. Биол. – 1972. – Т. 33, № 5. – С. 539–554.
99. Ризниченко Г.Ю. Математические модели в биофизике и экологии / Г.Ю. Ризниченко. – М.: Иж.: ИКИ, 2003. – 184 с.
100. Ризниченко Г.Ю. Динамические модели электронного транспорта в фотосинтезе / Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин. – М.: Изд-во Института компьютерных исследований, 2020. – 332 с.
101. Романовский Ю.М. Математическое моделирование в биофизике / Ю.М. Романовский, Н.В. Степанова, Д.С. Чернавский. – М.: Наука, 1975. – 344 с.
102. Рубин А.Б. Регуляция первичных процессов фотосинтеза / А.Б. Рубин, Т.Е. Кренделева // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43. – С. 225–266.
103. Рубин А.Б. Биофизика / А.Б. Рубин. – М.: Мир, 2002. – 448 с.
104. Рябушко Л.И. Потенциально опасные микроводоросли Азово-черноморского бассейна / Л.И. Рябушко. – Севастополь: Экокси-Гидрофизика, 2003. – 288 с.
105. Самылина О.С. Углерод-концентрирующий механизм как компонент адаптации экстремально натронофильной цианобактерии *Eubhalothese natronophila* к существованию в

- содовых озёрах: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Самылина Ольга Сергеевна. – М., 2008. – 24 с.
106. Сидько Ф.Я. Определение концентрации пигментов и числа клеток во взвеси водорослей на фотоэлектроколориметре ФЭКН-57 / Ф.Я. Сидько, Н.С. Ерошин. – Управляемое культивирование микроводорослей. – М.: Наука, 1964. – С. 38 – 42.
 107. Силкин В.А. Биоэкологические механизмы управления в аквакультуре / В.А. Силкин, К.М. Хайлов. – Л.: Наука, 1988. – 230 с.
 108. Стуколова И.В. Основные типы питания водорослей (краткий глоссарий) / И.В. Стуколова, Р.П. Тренкеншу // Вопросы современной альгологии. – 2020. – №1 (22). – С. 34–38. doi: 10.33624/2311-0147-2020-1(22)-34-38.
 109. Соловченко А.Е. Экранирование видимого и УФ излучения как фотозащитный механизм растений: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.12 / Соловченко Алексей Евгеньевич. – М., 2009. – 47 с.
 110. Терсков И.А. Светозависимый рост водоросли *Platymonas viridis* в непрерывной культуре / И.А. Терсков, Р.П. Тренкеншу, В.Н. Беянин // Изв. СО АН СССР (Сер. биол.). – 1979. – Т. 10, № 2. – С. 103–108.
 111. Тренкеншу Р.П. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* / Р.П. Тренкеншу, В.Н. Беянин // Биология моря. – 1979. – Т. 51. – С. 41–46.
 112. Тренкеншу Р.П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / Тренкеншу Рудольф Павлович. – Красноярск, 1984. – 170 с.
 113. Тренкеншу Р.П. Описание мгновенных световых кривых фотосинтеза / Р.П. Тренкеншу, Л.В. Вопилова // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. – 1989. – Т. 3. – С. 93–99.
 114. Тренкеншу Р.П. Кинетика субстратзависимых реакций при различной организации метаболических систем / Р.П. Тренкеншу. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. – 89 с.
 115. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура / Р.П. Тренкеншу // Экология моря. – 2005. – Вып. 67. – С. 89–97.
 116. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 2. Квазинепрерывная культура / Р.П. Тренкеншу // Экология моря. – 2005. – Вып. 67. – С. 98–110.
 117. Тренкеншу Р.П. Влияние света на макромолекулярный состав микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности (Часть 1) / Р.П. Тренкеншу // Вопросы современной альгологии. – 2017. – № 2 (14). – URL: <http://algology.ru/1180>.

118. Тренкеншу Р.П. Модификация уравнений динамики макромолекулярного состава микроводорослей / Р.П. Тренкеншу. – Морские биологические исследования: достижения и перспективы. – Севастополь: ЭкоСИ-гидрофизика, 2016. – Т. 2. – С. 448–451.
119. Тренкеншу Р.П. Расчёт удельной скорости роста микроводорослей / Р.П. Тренкеншу // Морской биологический журнал. – 2019. – Т.4, № 1. – С. 100–108.
120. Тренкеншу Р.П. Установка для культивирования низших фототрофов / Р.П. Тренкеншу, А.Б. Боровков, А.С. Лелеков // Пат. на изобр. 150345 Российская Федерация. МПК C12N 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.
121. Тренкеншу Р.П. Основы промышленного культивирования дуналиеллы солонowodной (*Dunaliella salina* Teod.) / Р.П. Тренкеншу, Р.Г. Геворгиз, А.Б. Боровков. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. – 103 с.
122. Тренкеншу Р.П. Кинетика симпорта органических форм биогенов у микроводорослей / Р.П. Тренкеншу, Я.Д. Жондарева. – Морские биологические исследования: достижения и перспективы. – Севастополь: ЭкоСИ-гидрофизика, 2018. – Т. 3. – С. 452–455.
123. Тренкеншу Р.П. Модель динамики пигментов культуры микроводорослей в плотностате / Р.П. Тренкеншу, А.С. Лелеков // Морской экологический журнал. – 2011. – Т. X, № 1. – С. 73–76.
124. Тренкеншу Р.П. Математическая модель зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей / Р.П. Тренкеншу, А.С. Лелеков, П.Е. Гаврилов, В.С. Набойщиков // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2016. – № 1. – С. 77–82.
125. Тренкеншу Р.П. Моделирование роста микроводорослей в культуре / Р.П. Тренкеншу, А.С. Лелеков. – Севастополь: ООО "Константа", 2017. – 152 с.
126. Тренкеншу Р.П. Соотношение резервных и структурных компонентов биомассы как ключевой параметр роста культуры микроводорослей / Р.П. Тренкеншу, А.С. Лелеков // Актуальные вопросы биологической химии и физики. – 2018. – Т.3, № 3. – С. 541–546.
127. Тренкеншу Р.П. Моделирование динамики азотистых соединений в клетках микроводорослей. 1. Накопительная культура / Р.П. Тренкеншу, А.С. Лелеков // Математическая биология и биоинформатика. – 2018. – Т. 13, № 2. – С. 348–359.
128. Тренкеншу Р.П. Линейный рост морских микроводорослей в культуре / Р.П. Тренкеншу, А.С. Лелеков, Т.М. Новикова // Морской биологический журнал. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 53–60.

129. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 10. Динамика общего биохимического состава клеток / Р.П. Тренкеншу, Т.М. Новикова // Морской экологический журнал. – 2010. – Т. 13, № 4. – С. 71–78.
130. Уильямсон М. Анализ биологических популяций / М. Уильямсон. – М.: Мир, 1975. – 272 с.
131. Устинин Д.М. Сопряжение различных методов компьютерного моделирования в комплексной модели фотосинтетической мембраны / Д.М. Устинин, И.Б. Коваленко, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин // Компьютерные исследования и моделирование. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 65–81.
132. Физиология растений: уч. для студ. вузов; под ред. Ермакова И.П. – М.: Изд-во «Академия», 2005. – 640 с.
133. Филипповский Ю.Н. Анализ математических моделей фотосинтезирующих систем и некоторые вопросы фитооблучения: дис. ... канд. биол. наук: 03.09.01 / Филипповский Юрий Николаевич. – Красноярск, 1970. – 223 с.
134. Фурсова П.В. Математическое моделирование в экологии сообществ / П.В. Фурсова, А.П. Левич // Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. – 2002. – Т. 8, № 4. – С. 1035–1045.
135. Фуряев Е.А. Микроспектрофотометрические характеристики клеток водорослей в различных условиях культивирования: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.02 / Фуряев Евгений Адольфович. – Красноярск, 1979. – 23 с.
136. Хайлов К.М. Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур) / К.М. Хайлов. – К.: Наук. думка, 1971. – 208 с.
137. Хол Д. Фотосинтез / Д. Хол, К. Рао. – М.: Мир, 1983. – 134 с.
138. Чекушкин А.А. Моделирование суточных колебаний освещенности в районе г. Севастополя / А.А. Чекушкин, А.С. Лелеков, Р.П. Тренкеншу // Актуальные вопросы биологической химии и физики. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 547–552.
139. Чернавский Д.С. К вопросу об определяющем звене в системе ферментативных реакций / Д.С. Чернавский, Н.Д. Иерусалимский // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1965. – Т. 5. – С. 665–672.
140. Чурилова Т.Я. Первичная продукция Чёрного моря: спектральный подход / Т.Я. Чурилова, О.В. Кривенко, В.В. Суслин и др. // Морской биологический журнал. – 2016. – Т. 1, № 3. – С. 50–53.
141. Aalderink R.H. Estimation of the photosynthesis/irradiance (P/I) curve parameters from light and dark bottle experiments / R.H. Aalderink, R. Jovin // J. Plan. Res. – 1997. – Vol. 19, no 11. – P. 1713–1742.

142. Acien Fernandez F.G. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance / F.G. Acien Fernandez, F. Garcia Camacho, J.A. Sanchez Perez et al. // Biotech. Bioeng. – 1998. – Vol. 58, no. 6. – P. 605–616.
143. Akhkha A. Modeling photosynthetic light-response curve in *Calotropis procera* under salinity or water deficit stress using non-linear models / A. Akhkha // JTUSCI. – 2010. – Vol. 3. – P. 49–57.
144. Badger M.R. CO₂ concentrating mechanisms in Cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution / M.R. Badger, G.D. Price // J. Exp. Bot. – 2003. – Vol. 54, no 383. – P. 609–622.
145. Baird M.E. Modeling the interacting effects of nutrient uptake, light capture and temperature on phytoplankton growth / M.E. Baird, S.M. Emsley, J.M. Mcglade // J. Plan. Res. – 2001. – Vol. 23, no 8. – P. 829–840.
146. Baly E.C. The kinetics of photosynthesis / E.C. Baly // Proc. R. Soc. Lond. – 1935. – Vol. 117. – P. 218–239.
147. Bannister T.T. Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation / T.T. Bannister // Limnol. Oceanogr. – 1979. – Vol. 24, no 1. – P. 76–96.
148. Ben-Amotz A. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in proteting the algae aqainst damage by excess irradiation / A. Ben-Amotz, A. Shaish, M. Avron // Plant. Physiol. – 1989. – Vol. 91, no 3. – P. 1040–1043.
149. Benavides A.M.S. Diurnal changes of photosynthesis and growth of *Arthrospira platensis* cultured in a thin-layer cascade and an open pond / A.M.S. Benavides, K. Ranglová, J.R. Malapascua et al. // Algal Research. – 2017. – Vol. 28. – P. 48–56.
150. Berges J. Miniview: Algal nitrate reductases / J. Berges // Eur. J. Phyc. – 1997. – Vol. 32, no 1. – P. 3–8.
151. Bienfang P.K. Steady state analysis of nitrate-ammonium assimilation by phytoplankton / P.K. Bienfang // Limnol. Oceanogr. – 1975. – Vol. 20, no 3. – P. 402–411.
152. Blackman F.F. Optima and limiting factors / F.F. Blackman // Ann. Bot. Lond. – 1905. – Vol. 19. – P. 281–295.
153. Blackman V.N. The compound interest law and plant growth / V.N. Blackman // Ann. Bot. Lond. – 1919. – Vol. 33, no 3. – P. 353 – 360.
154. Borovkov A.B. Growth and biochemical indices of *Dunaliella salina* under conditions of batch culture / A.B. Borovkov, I.N. Gudvilovich // Hydrobiol. J. – 2013. – Vol. 49, no 2. – P. 75 – 84.
155. Borovkov A.B. Production characteristics of *Dunaliella salina* at two-phase pilot cultivation (Crimea) / A.B. Borovkov, I.N. Gudvilovich, A.L. Avsiyan, O.A. Memetshaeva, A.S. Lelekov,

- T.M. Novikova // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2020. – Vol. 20, no. 5. – P. 401–408.
156. Borovkov A.B. Effect of specific irradiance on productivity and pigment and protein production of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) semi-continuous culture / A.B. Borovkov, I.N. Gudvilovich, A.S. Lelekov et al. // Bioresource Technology. – 2023. – Vol. 374. doi: 10.1016/j.biortech.2023.128771.
 157. Borovkov A.B. Morphological and morphometrical features in *Dunaliella salina* (Chlamydomonadales, Dunaliellaceae) during the two-phase cultivation mode / A.B. Borovkov, I.N. Gudvilovich, O.A. Memetshaeva, A.S. Lelekov, T.M. Novikova // Ecologica Montenegrina. – 2019. – Vol. 22. – P. 157–165.
 158. Borowitzka M.A. Microalgal biotechnology / M.A. Borowitzka, L.J. Borowitzka. – Cambridge University Press, 1998. – 480 p.
 159. Bougarana G. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus / G. Bougarana, O. Bernard, A. Sciandra // J. Theor. Biol. – 2010. – Vol. 265, no 3. – P. 443–454.
 160. Caperon J. Population growth response of *Isochrysis galbana* to nitrate variation at limiting concentrations / J. Caperon // Ecology. – 1968. – Vol. 49, no 5. – P. 866–872.
 161. Cartens M. Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* / M. Cartens, E. Molina Grima, A. Robles Medina et al. // JAOCS. – 1996. – Vol. 73, no 8. – P. 1025–1031.
 162. Cade-Menun B.J. Nutrient temperature and light stress alter phosphorus and carbon forms in culture-grown algae / B.J. Cade-Menun, A. Paytan // Mar. Chem. – 2010. – Vol. 121, no 1. – P. 27–36.
 163. Cembella A.D. The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part I / A.D. Cembella, N.J. Antia, P.J. Harrison // CRC Crit. Rev. Microbiol. – 1984. – Vol. 10. – P. 317–391
 164. Chartier P. Prediction and measurement of photosynthetic productivity / P. Chartier. – L.: Academic press, 1970. – P. 305–326.
 165. Chauton M.S. Gene regulation of carbon fixation, storage, and utilization in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* acclimated to light/dark cycles / M.S. Chauton, P. Winge, T. Brembu et al. // Plant Physiol. – 2013. – Vol. 161, no 2. – P. 1034–1048.
 166. Chen Y. A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids / Y. Chen, S. Vaidyanathan // Anal. Chim. Acta. – 2012. – Vol. 724. – P. 67–72.

167. Cloern J.E. An empirical model of the phytoplankton chlorophyll:carbon ratio – the conversation between productivity and growth / J.E. Cloern, C. Grenz, L. Vidergar-Lucas. // *Limnol. Oceanogr.* – 1995. – Vol. 40, no 7. – P. 1310–1321.
168. Collos Y. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures / Y. Collos, F. Mornet, A. Sciandra et al. // *J. Appl. Phycol.* – 1999. – Vol. 11. – P. 179–184.
169. Costa J.A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology / J.A. Costa, L.M. Colla, P.D. Filho et al. // *World J. Microb. Biotech.* – 2002. – Vol. 18. – P. 603–607.
170. Crill P.A. The photosynthesis-light curve: a simple analog model / P.A. Crill // *J. Theor. Biol.* – 1977. – Vol. 6. – P. 503–516.
171. Desbois A.P. Isolation and structural characterization of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* / A.P. Desbois, T. Lebl, L. Yan et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 81. – P. 755–764.
172. Diaz J. Marine polyphosphate: a key player in geologic phosphorus sequestration / J. Diaz, E. Ingall, C. Benitez-Nelson et al. // *Science.* – 2008. – Vol. 320. – P. 652–655.
173. Droop M.R. 25 years of algal growth kinetics a personal view / M.R. Droop // *Bot. Mar.* – 1983. – Vol. 26, no 3. – P. 99–112.
174. Drozdov-Tikhomirov L.N. Inner metabolic fluxes in multienzyme systems: lysine synthesis on acetate by *Corynebacterium glutamicum* / L.N. Drozdov-Tikhomirov, G.I. Scurida, V.V. Serganova // *Biotechnol.* – 1986. – Vol. 2, no 8. – P. 28–37.
175. Dugdale R.C. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification and significance / R.C. Dugdale // *Limnol. Oceanogr.* – 1967. – Vol. 12, no 4. – P. 685–695.
176. Dyhrman S.T. Nutrients and their acquisition: phosphorus physiology in microalgae / S.T. Dyhrman // *Dev. Appl. Phycol.* – 2016. – Vol. 6. – doi: 10.1007/978-3-319-24945-2_8.
177. Eppeley R.W. Uptake of nitrate and nitrite by *Ditylum brightwellii* – kinetics and mechanisms / R.W. Eppeley, J.L. Coatsworth // *J. Phyc.* – 1968 – Vol. 4, no 2. – P. 151–156.
178. Eppeley R.W. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton / R.W. Eppeley, J.N. Rogers, J.J. McCarthy // *Limnol. Oceanogr.* – 1969. – Vol. 14, no 6. – P. 912–920.
179. Eppeley R.W. Nitrogen assimilation of an oceanic diatom in nitrogen-limited continuous culture / R.W. Eppeley, E.H. Renger // *J. Phyc.* – 1974. – Vol. 10, no. 1. – P. 15–23.
180. Fabregas J. Renewal rate of semicontinuous culture of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharoide and fatty acid productivity / J. Fabregas, D. Garcia, E. Morales // *J. Ferment. Bioengin.* – 1998. – Vol. 86, no 5. – P. 463–467.

181. Falkowski P.G. Light-shade adaptation: two strategies in marine phytoplankton / P.G. Falkowski, T.G. Owens // *Plant Physiol.* – 1980. – Vol. 66. – P. 592–595.
182. Falkowski P.G. Growth-irradiance relationships in phytoplankton / P.G. Falkowski, Z. Dubinsky, K. Wyman // *Limnol. Oceanogr.* – 1985. – Vol. 30. – P. 311–321.
183. Falkowski P.G. Aquatic photosynthesis / P.G. Falkowski, J.A. Raven. – Blackwell Science, Maiden, Massachusetts, 1997. – 375 p.
184. Fan M. Crystal structures of the PsbS protein essential for photoprotection in plants / M. Fan, M. Li, Z. Liu et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 22. – P. 729–735.
185. Finenko Z.Z. Phytoplankton carbon to chlorophyll a ratio: response to light, temperature and nutrient limitation / Z.Z. Finenko, N. Hoepffner, R. Williams et al. // *Морской экологический журнал.* – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 40–64.
186. Flynn K.J. The determination of nitrogen status in microalgae / K.J. Flynn // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 1990. – Vol. 61. – P. 297–307.
187. Flynn K.J. Modeling the interactions between ammonium and nitrate uptake in marine phytoplankton / K.J. Flynn, M.J.R. Fasham, C.R. Hipkin. // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 1997. – Vol. 352. – P. 1625–1645.
188. Flynn K.J. Modeling Si-N limited growth of diatoms / K.J. Flynn, V. Martin-Jezequel // *J. Plank. Res.* – 2000. – Vol. 22. – P. 447–472.
189. Flynn K.J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interaction in phytoplankton / K.J. Flynn // *J. Plan. Res.* – 2001. – Vol. 23. – P. 977–997.
190. Flynn K.J. Do we need complex mechanistic photoacclimation models for phytoplankton? / K.J. Flynn // *Limnol. Oceanogr.* – 2003. – Vol. 48, no 6. – P. 2243–2249.
191. Forde B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation / B.G. Forde // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1465. – P. 219–235.
192. Fresnedo O., Serra J.L. Effect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae) / O. Fresnedo, J.L. Serra // *J. Phycol.* – 1992. – Vol. 28. – P. 786–793.
193. García-González M. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain / M. García-González, J. Moreno, J.P. Cañavate et al. // *J. Appl. Phycol.* – 2003. – Vol. 15. – P. 177–184.
194. Gatenby C.M. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels / C.M. Gatenby, D.M. Orcutt, D.A. Kreeger et al. // *J. Appl. Phycol.* – 2003. – Vol. 15. – P. 1–11.
195. Geider R.J. A dynamic model of photoadaptation in phytoplankton / R.J. Geider, H.L. MacIntyre, T.M. Kana // *Limnol. Oceanogr.* – 1996. – Vol. 41, no 1. – P. 1–15.

196. Geider R.J. A dynamic regulatory model of phytoplankton acclimation to light, nutrient and temperature / R.J. Geider, H.L. MacIntyre, T.M. Kana // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1997. – Vol. 148. – P. 187–200.
197. Geider R.J. Respiration and microalgal growth: a review of quantitative relationship between dark respiration and growth / R.J. Geider, B.A. Osborne // *New phytol.* – 1989. – Vol. 112. – P. 327–341.
198. Goericke R. Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. 1. The $^{14}\text{CO}_2$ -labeling kinetics of chlorophyll a / R. Goericke, N.A. Welschmeyer // *J. Phycol.* – 1992. – Vol. 28. – P. 498–507.
199. Gorski F. The equation of the light curve of photosynthesis / F. Gorski // *Acta Biol. Cracoviesia, ser. Botanica.* – 1961. – V.3, no 2. – P.75–96.
200. Grobbelaar J.U. Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds / J.U. Grobbelaar, C.J. Soeder // *Plankt. Res.* – 1985. – Vol. 7, no 4. – P. 497–506.
201. Gruber N. The marine nitrogen cycle: overview and challenges / N. Gruber // *Nitrogen in the marine environment.* – 2008. V–ol. 2. – P. 1–50.
202. Gudvilovich I.N. Growth of *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) and production of b-phycoerythrin under varying illumination / I.N. Gudvilovich, A.S. Lelekov, E.I. Maltsev et al. // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 2021. – Vol. 68, iss. 1. – P. 188–196.
203. Ho S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO_2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N / S. Ho, C. Chen, J. Chang // *Biores. Technol.* – 2012. – Vol. 113. – P. 244–252.
204. Horton P. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection / P. Horton, A.V. Ruban // *J. Experim. Bot.* – 2005. – Vol. 56, no 411. – P. 365–373. doi: 10.1093/jxb/eri023.
205. Hu Q. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances / Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis et al. // *J. Plant.* – 2008. – Vol. 54, no 4. – P. 621–639.
206. Jallet D. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown in a sinusoidal light regime / D. Jallet, M.A. Caballero, A.A. Gallina et al. // *Algal Research.* – 2016. – Vol. 18. – P. 51–60.
207. Janson M. Phosphate uptake and utilization by bacteria and algae / M. Janson // *Hydrobiol.* – 1988. – Vol. 170, no 1. – P. 177–189.
208. Janson Ch. Calcifying cyanobacteria – the potential of biomineralization for carbon capture and storage / Ch. Janson, T. Northen // *Curr. Op. Biotech.* – 2010. – Vol. 21. – P. 365–371.

209. Jassby A.D. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton / A.D. Jassby, T. Platt // *Limnol. Oceanogr.* – 1976. – Vol. 21, no. 4. – P. 540–547.
210. Jeffrey S.W. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae and natural populations / S.W. Jeffrey, G.F. Humphrey // *Biochem. Physiol. Pflanz.* – 1975. – Vol. 167. – P. 191–194.
211. Kana T.M. Zeaxanthin and β -carotene in *Synechococcus* WH7803 respond differently to irradiance / T.M. Kana, P.M. Glibert, R. Goericke, N.A. Welschmeyer // *Limnol. Oceanogr.* – 1988. – Vol. 33. – P. 1623–1627.
212. Kopytov Yu.P. The method of complex determining of biochemical composition of microalgae / Yu.P. Kopytov, A.S. Lelekov, R.G. Gevorgiz et al. // *International Journal on Algae.* – 2015. vVol. 17, no 4. – P. 397–402.
213. Kornberg A. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions / A. Kornberg // *Ann. Rev. Biochem.* – 1999. – Vol. 68, no 1. – P. 89–125.
214. Krasnovsky A.A. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies / A.A. Krasnovsky // *Membr. Cell Biol.* – 1998. – Vol. 12, no 5. – P. 665–690.
215. Kumar M. Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different intensities and temperature / M. Kumar, J. Kulshreshtha, G.P. Singh // *Braz. J. Microbiol.* – 2011. – Vol. 42. – P. 1128–1135.
216. Lamers P.P. Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga / P.P. Lamers, M. Janssen, R.C. De Vos et al. // *J. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 162, no 1. – P. 21–27.
217. Langdon C. The significance of respiration in production measurements based on oxygen / C. Langdon // *ICES Mar. Sci. Symp.* – 1993. – Vol. 197. – P. 69–78.
218. Lee K.H. Nitrate uptake of the red tide dinoflagellate *Prorocentrum micans* measured using a nutrient repletion method: effect of light intensity / K.H. Lee, H.J. Jeong, H.J. Kim, A.S. Lim // *Algae.* – 2017. – Vol.32, no 2. – P. 139–153.
219. Lelekov A.S. Estimation of *Dunaliella salina* Teod. maximum productivity under natural illumination / A.S. Lelekov, A.B. Borovkov, I.N. Gudvilovich et al. // *Theoretical and Applied Ecology.* – 2021. – Vol. 2021, no 2. – P. 202–207.
220. Lelekov A.S. Production characteristics of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin grown on medium with artificial sea water / A.S. Lelekov, R.G. Gevorgiz, Ya.D. Zhondareva // *Applied Biochemistry and Microbiology.* – 2016. – Vol. 52, no. 3. – P. 331–335.
221. Liebig J. Chemistry in its Application to Agriculture and Physiology / J. Liebig. – L.: Taylor and Walton, 1847. – 320 p.

222. Liu X. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum* / X. Liu, S. Duan, A. Li et al. // J. Appl. Phycol. – 2009. – Vol. 21. – P. 239–246.
223. Losh J.L. Rubisco is a small fraction of total protein in marine phytoplankton / J.L. Losh, J.N. Young, F.M. Morel // New Phytol. – 2013. – Vol. 198. – P. 52–58.
224. Lv H. Analysis of the physiological and molecular responses of *Dunaliella salina* to macronutrient deprivation / H. Lv, X. Cui, F. Wahid et al. // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, no 3. – doi: 10.1371/journal.pone.0152226.
225. MacIntyre H.L. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum* / H.L. MacIntyre, P. Sammes, S.W. Gibb, R.J. Geider // Limnol. Oceanogr. – 2000. – Vol. 45, no 8. – P. 1807–1817.
226. Macintyre H.L. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria / H.L. Macintyre, T.M. Kana, T. Anning, R.J. Geider // J. Phycol. – 2002. – Vol. 38. – P. 17–38.
227. Malthus T. An essay on the principle of population / T. Malthus. – L., 1798. – 125 p.
228. Markager S. Patterns of night-time respiration in a dense phytoplankton community under a natural light regime / S. Markager, K. Sand-Jensen // J. Ecol. – 1989. – Vol. 77. – P. 49–61.
229. Mariscal V. Differential regulation of the Chlamydomonas Nar1 gene family by carbon and nitrogen / V. Mariscal, P. Moulin, M. Orsel et al. // Protist. – 2006. – Vol. 157. – P. 421–433.
230. Michaelis L. Die Kinetik der Invertinwirkung / L. Michaelis, M.L. Menten // Biochem. J. – 1913. – Vol. 49. – P. 333–343.
231. Minhas A.K. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids / A.K. Minhas, P. Hodgson, C.J. Barrow, A. Adholeya // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – doi: 10.3389/fmicb.2016.00546.
232. Monaco C.J. Applicability of dynamic energy budget (DEB) models across steep environmental gradients / C.J. Monaco, C.D. McQuaid // Scientific reports. – 2018. – Vol. 8. – doi: 10.1038/s41598-018-34786-w.
233. Monod J. The growth of bacterial cultures / J. Monod // Ann. Rev. Microbiol. – 1949. – Vol. 3. – P. 371–394.
234. Myers J. The photosynthetic unit in Chlorella measured by repetitive short flashes / J. Myers, J.R. Graham // Plant Physiol. – 1971. – Vol. 48. – P. 282–286.
235. Naumann T. Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: a novel solid-state photobioreactor / T. Naumann, Z. Çebi, B. Podola, M. Melkonian // J. Appl Phycol. – 2013. – Vol. 25. – P. 1413–1420.

236. Nelson J.R. Rates and possible mechanism of light-dependent degradation of pigments in detritus derived from phytoplankton / J.R. Nelson // J. Mar. Res. – 1993. – Vol. 51, no 1. – P. 155–179.
237. Nielsen S. The adaptation of plankton algae. 1. General part / S. Nielsen, E. Jorgensen // Physiol. Plantar. – 1968. – Vol. 21. – P. 401–413.
238. Nisbet R.M. Integrating dynamic energy budget (DEB) theory with traditional bioenergetic models / R.M. Nisbet, M. Jusup, T. Klanjscek, L. Pecquerie // J. Experim. Biol. – 2012. – Vol. 215. – P. 892–902.
239. Niyogi K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy / K. Niyogi, X. Li, P. Müller // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 125, no 4. – P. 1558–1566.
240. Novick A. Description of the chemostat / A. Novick, L. Szilard // Science. – 1950. – Vol. 112. – P. 715–718.
241. Ota M. Effects of light intensity and temperature on photoautotrophic growth of a green microalga *Chlorococcum littorale* / M. Ota, M. Takenaka, Y. Sato et al. // Biotechnol. Rep. – 2015. – Vol. 7. – P. 24–29.
242. Ogbonna J.C. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* / J.C. Ogbonna, H. Tanaka // J. Ferm. Bioeng. – 1996. – Vol. 82, no. 6. – P. 558–564.
243. Platt T. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton / T. Platt, C.L. Gallegos, W.G. Harrison // J. Mar. Res. – 1980. – Vol. 38. – P. 687–701.
244. Pearl R. On the mathematical theory of population growth / R. Pearl, L. Reed // Metron. – 1923. – Vol. 3, no 1. – P. 6–19.
245. Perez E.B. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor / E.B. Perez, I.C. Pina, L.P. Rodriguez // Biochem. Eng. J. – 2008. – Vol. 40. – P. 520–525.
246. Perez-Garcia O. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products / O. Perez-Garcia, F. Escalante, L. de-Bashan, Y. Bashan // Water Research. – 2011. – Vol. 45, no 1. – P. 11–36.
247. Pottosin I. Transport across chloroplast membranes: optimizing photosynthesis for adverse environmental conditions / I. Pottosin, S. Shabala // Mol. Plant. – 2016. – Vol. 9. – P. 356–370.
248. Price G.D. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects or engineering into plants / G.D. Price, M.R. Badger, F.J. Woodger, B.M. Long // J. Exp. Bot. – 2008. – Vol. 59, no. 7. – P. 1441–1461.
249. Price G.D. Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism / G.D. Price // Photosynth. Res. – 2011. – Vol. 109. – P. 47–57.

250. Qiang H. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities / H. Qiang, H. Guterman, A. Richmond // J. Phycol. – 1996. – Vol. 32. – P. 1066–1073.
251. Ras M. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production / M. Ras, J.-P. Steyer, O. Bernard // Rev. Env. Scien. Biotech. – 2013. – Vol. 12, no 2. – P. 153–164.
252. Ratkowsky D.A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures / D.A. Ratkowsky, J. Olley, T.A. McMeekin, A. Ball // J. Bacteriol. – 1982. – Vol. 149. – P. 1–5.
253. Raven J.A. Contributions of anoxygenic and oxygenic phototrophy and chemolithotrophy to carbon and oxygen fluxes in aquatic environments / J.A. Raven // Aquat. Microb. Ecol. – 2009. – Vol. 56. – P. 177–192.
254. Raven J.A. Dark respiration and organic carbon loss / J.A. Raven, J. Beardall. – In: Borowitzka M.A., Beardall J., Raven J., Beardall J. The physiology of microalgae. – Springer, 2016. – P. 129–140.
255. Raven J.A. Algal and aquatic plant carbon concentrating mechanisms in relation to environmental change / J.A. Raven, J. Beardall, M. Giordano, S.C. Maberly // Photosynth. Res. – 2011. – Vol. 109. – P. 281–296.
256. Rhee G.Y. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation / G.Y. Rhee, I.J. Gotham // Limnol. Oceanogr. – 1981. – Vol. 26. – P. 635–648.
257. Richardson K. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies / K. Richardson, J. Beardall, J. Raven // New Phytol. – 1983. – Vol. 93. – P. 157–191.
258. Sanz-Luque E. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae / E. Sanz-Luque, A. Chamizo-Ampudia, A. Llamas et al. // Front. Plant. Sci. – 2015. – Vol. 6, no 899. – doi: 10.3389/fpls.2015.00899.
259. Sánchez-Saavedra M.P. Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum* / M.P. Sánchez-Saavedra, F.Y. Castro-Ochoa, V.M. Nava-Ruiz et al. // J. Appl. Phycol. – 2018. – Vol. 30, no 2. – P. 783–792.
260. Silva C.E. Stability of carbohydrate production in continuous microalgal cultivation under nitrogen limitation: effect of irradiation regime and intensity on *Tetradismus obliquus* / C.E. Silva, E. Sforza, A. Bertucco // J. Appl. Phycol. – 2018. – Vol. 30, no 1. – P. 261–270.
261. Solovchenko A.E. Induction of secondary carotenogenesis in new halophile microalgae from the genus *Dunaliella* (Chlorophyceae) / A.E. Solovchenko, E.A. Selivanova, K.A. Chekanov et al. // Biochemistry (Moscow). – 2015. – Vol. 80, no 11. – P. 1508–1513.
262. Steele J.H. Environmental control of photosynthesis in the sea / J.H. Steele // Limnol. Oceanogr. – 1962. – Vol. 7, no 2. – P. 137–150.

263. Sukenik A. Optimizing algal biomass production in an outdoor pond: a simulation model / A. Sukenik, R.S. Levy, Y. Levy et al. // J. Appl. Phycol. – 1991. – Vol. 3, no. 3. – P. 191–201.
264. Tamiya H. Kinetics of growth of *Chlorella* with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature / H. Tamiya, E. Hase, K. Shibata et al. // Garn Inst. Wash. Publ. – 1953. – Vol. 600. – P. 204–232.
265. Tamoi M. Contribution of fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants / M. Tamoi, M. Nagaoka, Y. Miyagawa et al. // Plan. Cell Physiol. – 2006. – Vol. 29, no 10. – P. 380–390.
266. Thornley J.H.M. Mathematical models in plant physiology / J.H.M. Thornley. – L.: Academic Press, 1976. – 318 p.
267. Torzillo G. Photoacclimation of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in photobioreactors and open ponds / G. Torzillo, C. Faraloni, A. Silva et al. // Eur. J. Phycol. – 2012. – Vol. 47, no 2. – P. 169–181.
268. Torzillo G. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors / G. Torzillo, A. Sacchi, R. Materassi et al. // J. Appl. Phycol. – 1991. – Vol. 3. – P. 103–109.
269. Tsay Y.F. Nitrate transporters and peptide transporters / Y.F. Tsay, C.C. Chiu, C.B. Tsai et al. // FEBS Lett. – 2007. – Vol. 581. – P. 2290–2300.
270. Ukeles R. Cultivation of plants / R. Ukeles // Mar. Ecol. – 1976. – Vol. 3. – P. 367–420.
271. Ullrich W.R. Nitrate uptake and extracellular alkalization by the green alga *Hydrodictyon reticulatum* in blue and red light / W.R. Ullrich, J. Lazarova, C.I. Ullrich et al. // J. Exp. Bot. – 1998. – Vol. 49, no. 324. – P. 1157–1162.
272. Van M.B. Assessing nutrient limitation of *Prochlorococcus* in the north pacific subtropical gyre by using an Rna capture method / M.B. Van, A.H. Devol // Limnol. Oceanogr. – 2008. – Vol. 53. – P.78–88.
273. Verhulst P.F. Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population / P.F. Verhulst // Nouveaux mémoires de l'académie royale des sciences et belles-lettres de bruxelles. – 1845. – Vol. 18, no 1. – P. 1–45.
274. Vollenweider R.A. Calculation model of photosynthesis depth curves and some implications regarding day rate estimates in primary productivity measurements / R.A. Vollenweider // Mem. 1st. Ital. Hydrobiol. – 1965. – Vol.18. – P. 425–457.
275. Wan M. The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokinian* / M. Wan, X. Jin, J. Xia et al. // Appl. Microbiol. Biotech. – 2014. – Vol. 98, no 22. – P. 9473–9481.

276. White A. The marine phosphorus cycle / A. White, S. Dyhrman // *Front. Microbiol.* – 2013. – Vol. 4, no 105. – doi: 10.3389/fmicb.2013.00105.
277. Yadala S. A dynamic optimization model for designing open-channel raceway ponds for batch production of algal biomass / S. Yadala, S. Cremaschi // *Processes.* – 2016. – Vol. 4, no 2. – P. 1–31.
278. Yang J. Mathematical model of *Chlorella minutissima* UTEX2341 growth and lipid production under photoheterotrophic fermentation conditions / J. Yang, E. Rasa, P. Tantayotai et al. // *Biores. Techn.* – 2011. – Vol. 102. – P. 3077–3082.
279. Ye Z.P. A mechanistic model for the photosynthesis-light response based on the photosynthetic electron transport of photosystem II in C3 and C4 species / Z.P. Ye, D.J. Suggett, P. Robakowski et al. // *New Phytol.* – 2013. – Vol. 199. – P. 110–120.
280. Yu E.T. Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Baccilariophyceae) during starvation / E.T. Yu, F.J. Zendejas, P.D. Lane et al. // *J. Appl. Phycol.* – 2009. – Vol. 21, no 6. – P. 669–681.
281. Zarrouk C. Contribution a l'étude d'une cyanophycee. Influence de divers physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* / C. Zarrouk. – Paris, 1966. – 138 p.