

УДК 582.263:546.712:577.112

И.А. ИЛЮЧИК

аспирант,
старший преподаватель кафедры биотехнологии¹

В.Н. НИКАНДРОВ, д-р биол. наук, профессор,
профессор кафедры биотехнологии¹

¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 5 апреля 2018г.

РОСТ КУЛЬТУРЫ ХЛОРЕЛЛЫ (*CHLORELLA VULGARIS*) И НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА ПРИ ДОБАВЛЕНИИ $MnCl_2$ В ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ

*Изучена динамика биомассы *Chlorella vulgaris*, содержания внутриклеточного белка и белка культуральной жидкости при добавлении в питательную среду $MnCl_2$ в широком диапазоне концентраций (0,01–25,0 мг/л) и росте культуры в течение 40 суток. Уровень биомасс, в целом, при добавлении соли марганца принципиально не отличался от контроля, за редким исключением. В присутствии эффектора зависимость накопления биомассы отклонялась от линейной. Изменения содержания внутри- и внеклеточного белка в период культивирования имели колебательный характер. Выявлены концентрации эффектора и сроки культивирования, при которых уровень общего белка в единице объема культуры возрастал на 34 и 116% в сравнении с контролем.*

Ключевые слова: хлорелла, хлорид марганца (II), белок, биомасса.

Введение. Одной из современных глобальных проблем является дефицит белков в рационах человека и сельскохозяйственных животных.

В частности, проблема кормового белка приобрела мировое значение и занимает одно из первых мест [1,2]. Так, в хозяйствах Мордовии в рационах молодняка свиней дефицит протеина, макро- и микроэлементов, витаминов достигает 25–90% [3].

В условиях Республики Беларусь дефицит сырого протеина в основных кормах рационов молочного скота в зимне–стойловый период составляет не менее 40% [4], что ведет к недополучению до 30–35% молока [5]. Кроме того, удлиняется сервис–период молочного скота, увеличивается возраст первого отела и т.д., что, в конечном итоге, сводится к низкой реализации генетического потенциала [2]. Например, при дефиците белка 20–25% в рационе жвачных животных недобор продукции составляет 30–34%, себестоимость ее возрастает в 1,5 раза, а расход кормов – в 1,3–1,4 раза по сравнению с рационом, сбалансированным по протеину [6,7]. Дефицит протеина в кормах сказывается также и на нормальном функционировании органов и систем, включая механизмы естественной резистентности. Например, у кур при недостатке протеина и из–за низкой питательности рациона наблюдается расклев пальцев ног, кожи и тканей тела [8].

Решение данной проблемы в последние десятилетия усматривают в развертывании производства «одноклеточного» белка – общего белка разнообразных одноклеточных организмов, в том числе и водорослей, включая *Chlorella vulgaris*. Преимущества такого подхода заключаются в высоком содержании его в биомассе продуцентов, широком спектре аминокислот и витаминов, низком содержании липидов, экологической чистоте производства и ряде других моментов [9].

Химический состав биомассы хлореллы зависит от состава питательной среды [10]: при росте на среде, богатой азотом, накапливается преимущественно белок, а при дефиците азота – главным образом, липиды и углеводы [11].

По качеству продуцируемых белка и витаминов хлорелла превосходит все известные кормовые и пищевые продукты. Ее белок содержит все необходимые аминокислоты [12]. Около половины пула аминокислот входит в состав белков водоросли, остальные являются свободными. В культуральной жидкости при росте хлореллы помимо свободных аминокислот обнаружен также ряд внеклеточных пептидов и белков. Установлено, что в клеточной массе культуры хлореллы находится

350 различных соединений, а в культуральной жидкости – до 310, и особенно эффективно их накопление происходит на начальных периодах роста культуры [13].

Урожай хлореллы по содержанию белка с 1 га равняется урожаю пшеницы с площади 25 га и картофеля с 10 га, а его питательная ценность белка хлореллы в два раза превосходит соевый [13]. Питательная ценность 1 кг биомассы хлореллы в целом равнозначна 4–5 кг сои. При добавлении 5–7 кг массы сухого вещества хлореллы к 1 т зерна биологическая ценность последнего возрастает в 1,5 раза [14].

Эти обстоятельства диктуют потребность изыскания путей дальнейшего обогащения биомассы хлореллы белком, в том числе путем изменения состава питательной среды. Одним из таковых путей может служить дополнительное введение в питательную среду микроэлементов.

Марганец – истинный биоэлемент, необходимый для реализации целого ряда метаболических процессов в организмах животных, растений, а также в микроорганизмах. Он входит в состав митохондриальных супероксиддисмутазы, пируваткарбоксилазы, а также глутаминсинтетазы, ФЕП–карбоксилазы, креатинкиназы, глутаматдегидрогеназы, энолазы, изоцитратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, пентозоизомеразы и ряда других энзимов, способствует интенсификации реакций карбоксилирования [15,16].

Без марганца невозможен фотосинтез у растений и цианобактерий – при его отсутствии хлорофилл быстро разрушается на свету [17]. Этот элемент участвует в восстановлении нитратов до аммиака, он связан с синтезом белка через регуляцию активности ДНК–полимеразы и РНК–полимеразы, активирует энзимы, участвующие в окислении ауксина [18–20]. Отмечено также длительное сохранение жизнеспособности микроводорослей в экстенсивной культуре при высоком содержании марганца [21].

Цель настоящей работы – исследование возможности увеличения уровня белка в культуре хлореллы при добавлении в питательную среду хлорида марганца ($MnCl_2$).

Материалы и методы. Исследования выполнены на культуре микроводоросли *Chlorella vulgaris*, штамм *IBCE C-19* из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, любезно предоставленной сотрудниками Республиканского центра альгологии.

Ch. vulgaris выращивали в условиях периодической культуры на среде Тамия (*Tamiya*) [22], не содержащей ЭДТА и солей марганца (контроль), в сосудах объемом 0,25 л при температуре окружающей среды 23 °С, непрерывном барботировании суспензии воздухом со скоростью 20–25 л/ч, освещенности на поверхности сосуда – 4500–5000 лк, чередовании световых и темновых фаз 12ч/12ч. Посевная доза составляла $7,8 \pm 0,7$ млн клеток. Концентрацию клеток хлореллы определяли с помощью камеры Горяева. В питательную среду дополнительно вносили раствор хлорида марганца до конечной концентрации 0,010, 0,025, 0,050, 0,100, 0,500, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 и 25,0 мг/л. В питательную среду контрольного варианта соли марганца не добавляли.

На 1, 4, 7, 10, 13, 16, 22, 28, 34 и 40–е сутки отбирали аликвоты культуры, содержащие по $50 \pm 0,43$ млн клеток, клетки отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин, трижды отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой. Образцы клеток и культуральной жидкости замораживали и хранили при температуре –20 °С.

Клетки хлореллы разрушали в гомогенизаторе Поттера–Эльвейема при 4 °С в 0,5 мл бидистиллированной воды. Концентрацию общего белка в гомогенатах клеток и в культуральной жидкости определяли колориметрическим методом [23].

Все исследования проведены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы *Statistica 6.0* по *t*–критерию Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. В отсутствие хлорида марганца в питательной среде (контроль) в период с 1–х до 28–х суток в культуре хлореллы уровень биомассы нарастал, практически приближаясь к линейной зависимости и увеличиваясь в 5,95 раз (табл.).

При добавлении хлорида марганца в питательную среду, в целом, за редким исключением, уровень биомассы на всем протяжении культивирования либо был ниже, либо мало отличался от контроля (рис.). Лишь на 4–е сутки культивирования он превышал таковой (кроме воздействия марганца в двух наибольших концентрациях) в контроле на 7–29% с максимумом эффекта при концентрации марганца 0,500 мг/л.

Таблица – Динамика биомассы и содержания белка в культуре при добавлении в питательную среду хлорида марганца (n = 9),

* – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

Концентрация Mn ²⁺ , мг/л	Биомасса, млн кл/мл	Содержание белка		Соотношение Кл/Кж	Биомасса, млн кл/мл	Содержание белка		Соотношение Кл/Кж
		Кл, мкг/млн кл	Кж, мкг/мл			Кл, мкг/ млн кл	Кж, мкг/мл	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 сутки					10 сутки			
без добавок (контроль)	6,27 ± 0,30	45,89 ± 2,84	1,56 ± 0,07	29,42	11,11 ± 0,44	39,19 ± 2,78	7,99 ± 0,68	4,90
0,010	6,47 ± 0,27	23,42 ± 1,48*	4,43 ± 0,13*	5,29	12,99 ± 0,33	33,08 ± 0,94	8,62 ± 0,74	3,84
0,025	6,14 ± 0,16	23,75 ± 1,47*	5,68 ± 0,40*	4,18	12,62 ± 0,36	24,40 ± 1,67	10,37 ± 1,21	2,36
0,050	5,65 ± 0,10	69,61 ± 2,48*	1,86 ± 0,23	37,42	13,76 ± 0,31*	40,89 ± 1,82*	24,71 ± 2,04*	1,66
0,100	5,59 ± 0,23	51,54 ± 1,51	3,17 ± 0,50*	16,26	11,52 ± 0,22	29,75 ± 1,61	16,99 ± 1,67*	1,75
0,500	7,28 ± 0,29	38,92 ± 1,67	8,81 ± 0,90*	4,42	12,34 ± 0,56	33,95 ± 0,89	19,74 ± 2,07*	1,72
1,000	6,68 ± 0,26	41,56 ± 1,43	4,43 ± 1,05*	9,38	10,54 ± 0,33	30,33 ± 1,11	23,63 ± 2,07*	1,29
2,500	5,99 ± 0,08	58,62 ± 0,84	8,56 ± 1,04*	6,85	9,78 ± 0,40	35,84 ± 1,78	19,34 ± 1,83*	1,86
5,000	6,47 ± 0,17	93,14 ± 0,89*	7,23 ± 0,50*	12,88	12,96 ± 0,25*	36,85 ± 1,89	21,79 ± 2,49*	1,69
10,000	5,89 ± 0,21	105,93 ± 0,91*	7,80 ± 0,63*	13,58	7,72 ± 0,21*	35,39 ± 1,77	11,37 ± 0,90*	3,11
25,000	4,21 ± 0,06*	38,82 ± 1,27	3,30 ± 0,26*	11,77	9,72 ± 0,44	55,05 ± 1,80*	20,47 ± 1,84*	2,69

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4 сутки					13 сутки			
без добавок (контроль)	6,93 ± 0,63	30,19 ± 1,20	9,24 ± 0,56	3,27	15,58 ± 0,60	31,69 ± 1,58	2,80 ± 0,24	11,32
0,010	7,61 ± 0,26	35,43 ± 1,80	6,29 ± 0,71*	5,63	15,75 ± 0,64	31,85 ± 0,91	3,25 ± 0,32	9,80
0,025	7,43 ± 0,25	51,86 ± 0,56*	6,23 ± 0,83*	8,33	14,83 ± 0,15	33,28 ± 5,70	1,70 ± 0,18*	19,58
0,050	7,41 ± 0,10	51,64 ± 1,56*	9,23 ± 0,92	5,60	14,86 ± 0,41	67,15 ± 5,90	1,77 ± 0,18*	37,94
0,100	7,84 ± 0,26	28,33 ± 0,42	14,63 ± 1,84*	1,94	13,69 ± 0,53*	52,54 ± 2,07	4,18 ± 0,52*	12,57
0,500	8,96 ± 0,31*	36,38 ± 1,51	16,98 ± 1,98*	2,14	14,91 ± 0,56	44,73 ± 1,36	2,48 ± 0,16	18,04
1,000	7,84 ± 0,26	32,80 ± 1,58	16,10 ± 1,31*	2,04	12,50 ± 0,51*	57,61 ± 2,25	0,91 ± 0,10*	63,30
2,500	7,56 ± 0,23	52,18 ± 0,58*	16,97 ± 1,58*	3,08	12,49 ± 0,42*	31,06 ± 0,88	1,73 ± 0,33*	17,95
5,000	7,82 ± 0,30	37,21 ± 1,21	12,72 ± 0,82*	2,93	13,13 ± 0,29*	36,02 ± 2,27	2,82 ± 0,35	12,77
10,000	6,67 ± 0,27	63,35 ± 1,27*	12,11 ± 0,67*	5,23	10,87 ± 0,57*	38,66 ± 1,36	3,77 ± 0,57	10,26
25,000	5,79 ± 0,29	42,77 ± 0,80	6,84 ± 0,85*	6,25	12,51 ± 0,50*	43,63 ± 1,20	5,90 ± 0,44*	7,40
7 сутки					16 сутки			
без добавок (контроль)	9,54 ± 0,48	42,11 ± 1,67	17,08 ± 1,09	2,47	18,69 ± 0,25	59,12 ± 2,24	11,70 ± 1,06	5,05
0,010	9,46 ± 0,54	40,99 ± 2,47	36,36 ± 2,37*	1,13	17,47 ± 1,17	61,34 ± 2,10	13,37 ± 1,15	4,59
0,025	8,52 ± 0,44	21,52 ± 1,30*	22,88 ± 1,39*	0,94	18,30 ± 0,67	96,44 ± 2,80*	11,88 ± 0,71	8,12
0,050	7,57 ± 0,31*	38,46 ± 1,36	26,35 ± 2,26*	1,46	19,68 ± 0,57	82,51 ± 1,77*	11,09 ± 0,85	7,44
0,100	8,70 ± 0,29	34,01 ± 1,68	23,65 ± 1,04*	1,44	14,88 ± 1,07*	80,81 ± 2,75*	11,08 ± 0,86	7,30
0,500	9,19 ± 0,36	37,90 ± 1,78	23,00 ± 1,23*	1,65	17,57 ± 0,68	77,31 ± 1,90*	9,79 ± 0,70	7,90
1,000	9,73 ± 0,20	42,94 ± 1,71	21,36 ± 1,42*	2,01	15,12 ± 0,77*	96,94 ± 2,38*	14,89 ± 1,27	6,51
2,500	9,01 ± 0,18	38,05 ± 0,62	24,07 ± 1,70*	1,58	14,11 ± 0,71*	84,29 ± 1,76*	12,91 ± 1,50	6,53
5,000	9,73 ± 0,39	55,65 ± 2,79	17,94 ± 3,24	3,10	13,22 ± 0,77*	92,34 ± 1,51*	12,58 ± 1,02	7,34
10,000	7,64 ± 0,20*	46,57 ± 0,83	20,95 ± 2,65	2,23	13,09 ± 0,48*	77,97 ± 1,56*	14,93 ± 1,89	5,22
25,000	9,18 ± 0,40	51,52 ± 1,86	16,03 ± 2,19	3,22	14,14 ± 0,53*	113,16 ± 2,78*	17,34 ± 2,07*	6,53

Окончание таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9
22 сутки					34 сутки			
без добавок (контроль)	27,12 ± 0,50	40,19 ± 6,80	2,73 ± 0,24	14,72	36,11 ± 2,69	44,36 ± 1,78	0	–
0,010	21,30 ± 1,00*	59,69 ± 1,60*	0,77 ± 0,11*	77,52	20,47 ± 1,20*	26,26 ± 1,29*	0	–
0,025	22,95 ± 1,10*	38,76 ± 1,31	1,12 ± 0,14*	34,61	21,86 ± 2,09*	53,41 ± 2,56	0	–
0,050	22,84 ± 1,00*	46,20 ± 0,78	2,97 ± 0,45	15,56	29,08 ± 1,51*	35,10 ± 1,40	0	–
0,100	25,26 ± 0,78	61,07 ± 1,00*	1,69 ± 0,17*	36,14	36,31 ± 1,47	31,81 ± 1,31	0	–
0,500	30,90 ± 1,15*	27,71 ± 0,67	0,44 ± 0,07*	63,00	66,97 ± 6,40*	72,26 ± 1,45*	0	–
1,000	22,21 ± 1,26*	53,24 ± 0,63	0,76 ± 0,16*	70,06	27,56 ± 0,60*	40,12 ± 1,40	0	–
2,500	19,24 ± 0,69*	43,00 ± 1,12	3,51 ± 0,24*	12,24	24,47 ± 3,06*	40,38 ± 0,70	0	–
5,000	23,69 ± 0,91*	67,63 ± 0,91*	4,40 ± 0,55*	15,37	16,58 ± 0,74*	59,63 ± 1,22	0	–
10,000	22,26 ± 0,76*	53,41 ± 0,58	1,35 ± 0,21*	39,56	16,24 ± 1,50*	51,11 ± 1,45	0	–
25,000	25,67 ± 1,30	41,18 ± 0,78	1,86 ± 0,26*	22,14	14,60 ± 0,56*	65,69 ± 1,40*	0	–
28 сутки					40 сутки			
без добавок (контроль)	37,28 ± 2,40	60,15 ± 1,78	0,99 ± 0,08	60,75	27,94 ± 1,31	57,26 ± 1,45	7,41 ± 0,59	7,73
0,010	25,07 ± 1,69*	36,35 ± 1,67*	1,11 ± 0,08	32,75	19,25 ± 1,24	76,10 ± 1,40*	1,80 ± 0,12*	42,28
0,025	23,49 ± 0,59*	25,91 ± 0,56*	1,06 ± 0,13	39,45	19,06 ± 1,28*	97,80 ± 1,89*	2,47 ± 0,23*	39,60
0,050	27,47 ± 1,38*	23,09 ± 1,30*	0,34 ± 0,03*	67,92	28,64 ± 0,93	60,34 ± 1,28	6,41 ± 0,42	9,42
0,100	30,53 ± 0,63	57,31 ± 0,91	2,13 ± 0,46*	26,91	30,31 ± 1,81	56,21 ± 1,74	5,98 ± 0,48	9,40
0,500	41,67 ± 2,86	50,90 ± 1,23	1,30 ± 0,20	39,16	45,89 ± 5,04	65,35 ± 1,56	8,90 ± 0,56	7,34
1,000	24,51 ± 0,83*	23,98 ± 0,83*	0,28 ± 0,04*	85,65	26,39 ± 0,79	70,18 ± 2,37*	6,70 ± 0,76	10,48
2,500	22,44 ± 1,12*	40,87 ± 1,19*	0,21 ± 0,04*	194,59	15,69 ± 0,65*	72,01 ± 1,30*	12,79 ± 1,01*	5,63
5,000	18,93 ± 0,50*	59,06 ± 0,72	0,28 ± 0,05*	210,93	15,36 ± 0,74*	92,37 ± 2,38*	21,21 ± 1,64*	4,36
10,000	18,87 ± 0,36*	59,87 ± 1,24	0,34 ± 0,05*	176,08	12,61 ± 1,04*	75,86 ± 1,21*	31,85 ± 1,72*	2,38
25,000	21,40 ± 1,50*	73,44 ± 2,56*	1,00 ± 0,08	73,44	14,20 ± 0,60*	69,52 ± 1,32*	5,56 ± 0,44	12,51

При добавлении $MnCl_2$ в диапазоне концентраций 0,010–0,050 мг/л рост культуры также завершался к 28 суткам, при концентрации соли 0,100–1,000 мг/л – к 34 суткам, а при четырех максимальных концентрациях – в целом, на 22 сутки (табл., рис.). Следовательно, концентрационная зависимость продолжительности накопления биомассы имеет характер кривой с максимумом (34 сутки) в диапазоне концентраций $MnCl_2$ 0,100–1,000 мг/л.

Динамика роста культуры при добавлении в питательную среду данного эффектора имеет ряд особенностей. Так, при максимальной концентрации – 25,000 мг/л на 7-е сутки отмечено значительное (на 59%) увеличение накопления биомассы по сравнению с 4-ми сутками, тогда как на 10-е сутки эта величина практически не менялась, а к 22-м суткам вновь наблюдалось резкое – на 82% увеличение в сравнении с предыдущим интервалом (табл.).

При уменьшении концентрации хлорида марганца до 10,000 мг/л выявлено торможение роста в период 7–10 сутки с увеличением уровня биомассы на 41% к 13-м суткам.

Введение в питательную среду соли марганца в концентрации 5,000 мг/л сопровождалось отсутствием роста культуры в период 13–16 сутки, а также резким – на 79% приростом к 22-м суткам.

При более низкой концентрации эффектора – 2,500 мг/л выявлено увеличение роста культуры на 28% в период 10–13 сутки без каких-либо особенностей в дальнейшем.

Менее резкий сдвиг уровня биомассы (19%) происходил в этот период при концентрации соли марганца 1,000 мг/л. Однако на 22-е сутки отмечен скачок по сравнению с 16 сутками в 1,5 раза. В целом, без каких-либо особенностей биомасса хлореллы нарастала в период до 16 суток при концентрации эффектора в питательной среде 0,100 и 0,500 мг/л. Тем не менее, на 22-е сутки при этих концентрациях $MnCl_2$ уровень биомассы хлореллы увеличивался на 70 и 76% соответственно в сравнении с 16-ми сутками (табл.)

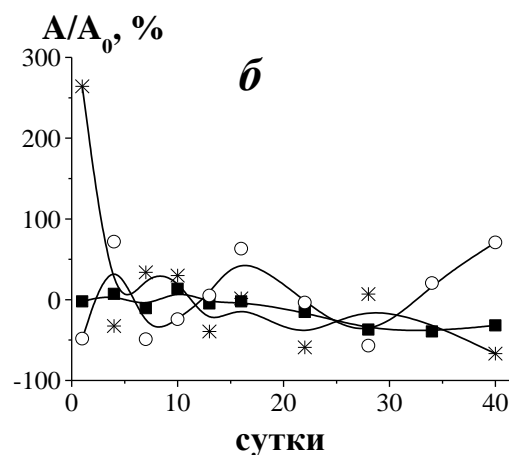
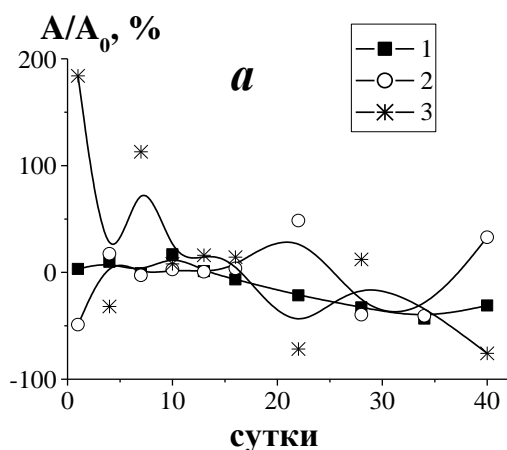
Наконец, при трех минимальных концентрациях эффектора в питательной среде на протяжении 28 суток подобных явлений остановки роста или «всплесков» его не наблюдали.

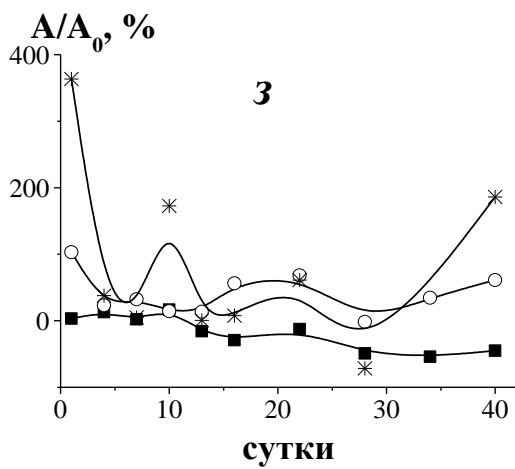
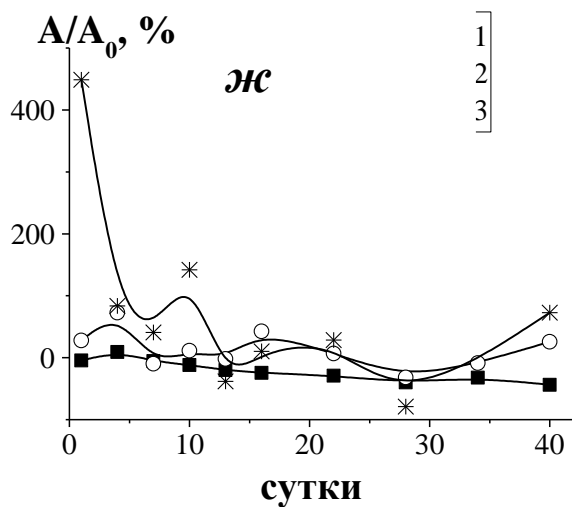
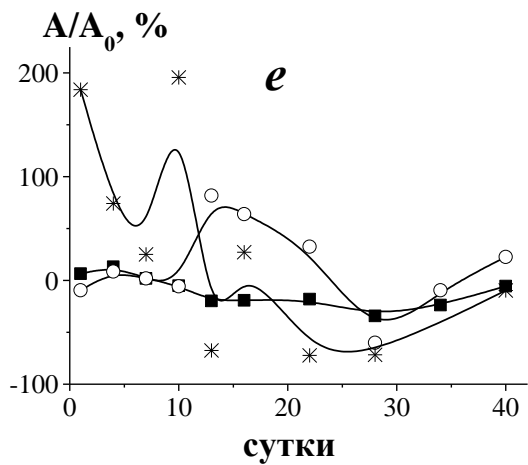
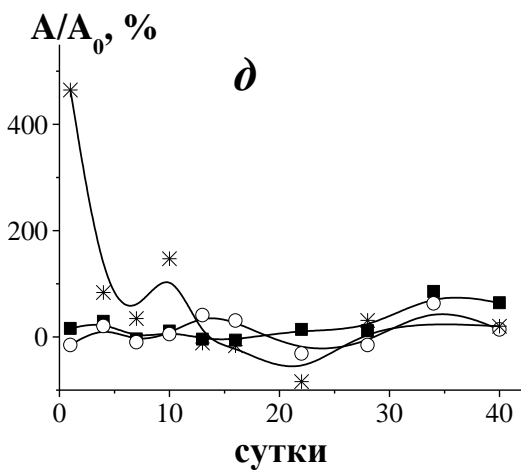
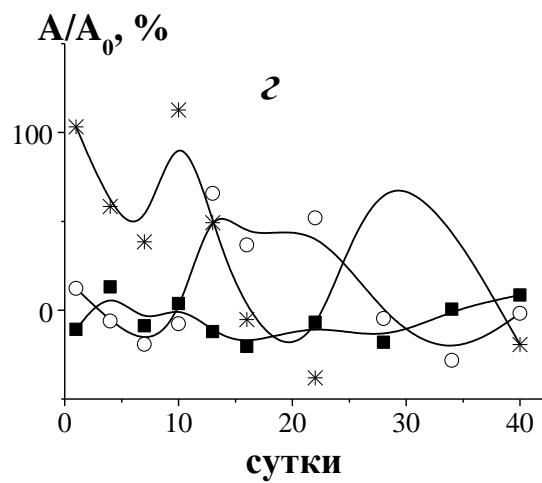
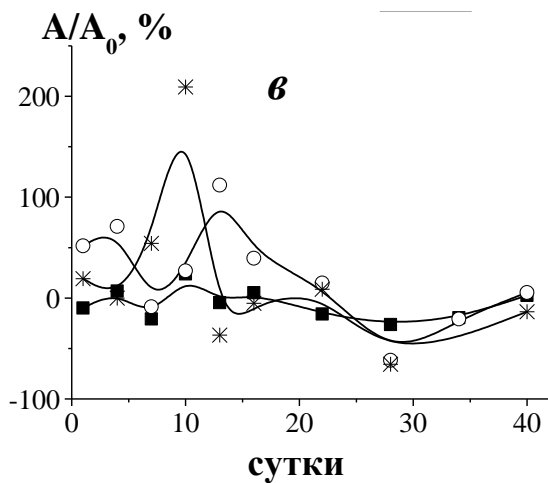
Достаточно сложной зависимостью характеризовались изменения уровня белка в динамике роста культуры водоросли. В целом, изменения носили колебательный характер.

Так, в контрольном варианте в период с 1 по 4-е сутки содержание белка в клетках снижалось на 34%, тогда как в культуральной жидкости возросло в 5,9 раза и лишь на 7-е сутки уровень белка в клетках практически не отличался от начального. Однако к 10-м суткам отмечено падение содержания белка в клетках на 25%, а культуральной жидкости – в 2,1 раза. В дальнейшем происходил рост уровня белка в клетках к 16-м суткам в 1,9 раза с максимумом к 28-м суткам, после чего дальнейшее увеличение не наблюдалось, что обусловлено, по-видимому, угасанием культуры. Тем не менее, и к 40-м суткам уровень белка в клетках сохранялся на достаточно высоком уровне.

Динамика содержания белка в культуральной жидкости тоже имела колебательный характер.

В контрольном варианте в период с 1-е по 7-е сутки уровень белка в культуральной жидкости возрос в 11 раз, в последующем к 13-м суткам величина этого показателя снизилась в 6,1 раза. Затем вновь наблюдалось увеличение концентрации белка в культуральной жидкости к 16-м суткам в 4,2 раза с дальнейшим падением его уровня.





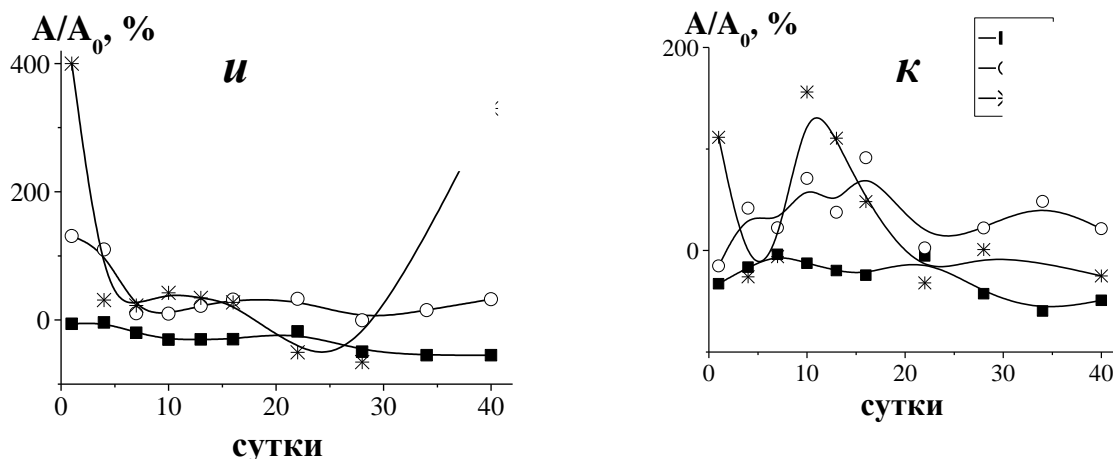


Рисунок – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы (1), содержания белка в клетках (2), в культуральной жидкости (3) культуры хлореллы при добавлении в питательную среду хлорида марганца в концентрации (мг/л): 0,010 (а), 0,025 (б), 0,050 (в), 0,100 (г), 0,500 (д), 1,000 (е), 2,500 (ж), 5,000 (з), 10,000 (и), 25,000 (к)

Примечательно, что во всех вариантах на 34–е сутки белок в культуральной жидкости не обнаруживался, хотя к концу культивирования он вновь накапливался (табл.). Весьма вероятно, что это связано с резкими изменениями внутриклеточного метаболизма, хотя пока не ясно, с какими конкретно. Данный момент предстоит выяснить в дальнейшей работе.

Складывается впечатление, что в процессе культивирования в данных условиях культура проходит несколько стадий перестройки, что сопряжено с изменениями интенсивности биосинтеза белка, проницаемости клеточной стенки и уровня протеолитических процессов.

При добавлении хлорида марганца в питательную среду, принимая во внимание сложный колебательный характер сдвига концентрации внутриклеточного белка в контрольном варианте, при характеристике влияния фактора следует иметь в виду абсолютные значения уровня белка в этом варианте. В целом, при концентрации соли марганца в питательной среде 2,500–25,000 мг/л на всем протяжении роста культуры, за редким исключением, уровень белка в клетках хлореллы превышал таковой в контроле на 10–131% (рис.). Введение в питательную среду фактора в меньших концентрациях не был столь постоянен. Тем не менее, на 13, 16, 22 и 40–е сутки почти во всем диапазоне концентраций фактора уровень белка в клетках превышал таковой в контроле на 14–111, 31–91, 15–48 и 21–70% соответственно (табл., рис).

Однако при оценке общей продуктивности биомассы необходимо сопоставление накопления белка в ней с количеством клеток. Расчеты показывают, что в контрольном варианте максимальный уровень внутриклеточного белка достигался на 28–е сутки и составлял 2,24 мг/мл. При добавлении же в питательную среду хлорида марганца, в большинстве случаев эта величина не превышала 1,35–1,73 мг/л. Лишь в отдельных точках общий уровень внут–риклеточного белка в культуре хлореллы намного превосходил уровень контроля. Так, при добавлении соли марганца в концентрации 0,500 мг/л через 34 и 40 суток концентрация внутриклеточного белка достигала 4,84 и 3,00 мг/мл соответственно. Учитывая то обстоятельство, что на 34–е сутки в культуральной жидкости белок отсутствовал, а на 40–е его концентрация составляла лишь 8,9 мкг/мл, более предпочтительным представляется вариант 34 суток.

Нужно, однако, учесть, что клетки микроводорослей способны к биосинтезу 13 витаминов [24,25], превосходя все растительные корма и сельскохозяйственные культуры. Хлорелла синтезирует и цианкобаламин, отсутствующий в дрожжах и высших растениях [26]. Среди внеклеточных продуктов метаболизма хлореллы обнаружены тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, пиридоксин, цианкобаламин, фолиевая кислота и ее производные, *p*-аминобензойная кислота, биотин, инозит. Содержание этих витаминов в среде значительно превосходит их количество в клетках и зависит от условий культивирования и фазы развития культуры этой водоросли.

Кроме того, хлорелла синтезирует природный антибиотик «хлореллин», который в концентрации 1:500000 и 1:1000000 эффективен против стрептококков, стафилококков, кишечной палочки, в меньшей степени – против возбудителя туберкулеза [10], что позволяет при использовании хлореллы в качестве кормовой добавки для животных снизить использование ветеринарных препаратов [27]. В хлорелле обнаружен также β -1,3-глюкан – эффективный иммуностимулятор, акцептор свободных радикалов и редуктор уровня липидов крови [28].

Эти обстоятельства диктуют проведение дальнейшей работы по оптимизации культивирования хлореллы с целью получения высококачественного продукта.

Список литературы

1. Остякова, М.Е. Болезни обмена веществ крупного рогатого скота, связанные с неполноценным кормлением / М.Е. Остякова // Вестник КрасГАУ. – 2015. – №12. – С. 195–198.
2. Ганущенко, О.Ф. Организация рационального кормления коров с использованием современных методов контроля полноценности их питания: рекомендации / О.Ф. Ганущенко, Д.Т. Соболев; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск: ВГАВМ. – 2016. – 80 с.
3. Гурьянов, А.М. Оптимизация уровня белково-витаминно-минеральных добавок в рационах молодняка свиней / А.М. Гурьянов, В.А. Кокорев, А.В. Борин // Животноводство и ветеринарная медицина; ФГБНУ Мордовский НИИСХ. – Саранск. – 2016. – С. 29–37.
4. Райхман, А.Я. Эффективность использования злаково-бобового сена и сенажа в рационах лактирующих коров / А.Я. Райхман // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Ч. 1. – Горки: БГСХА. – 2017. – С. 238–246.
5. Соболева, Н.В. Качество кормов из люцерны посевной и козлятника восточного / Н.В. Соболева, И.А. Бабичева, С.В. Карамеев, А.С. Карамеева // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – С. 103–105.
6. Кузьминых, А.Н. Урожайность и качество вико-злаковых агроценозов в условиях дерново-подзолистой почвы Нечерноземной зоны / А.Н. Кузьминых, Г.И. Пашкова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – С. 52–55.
7. Кучин, Н.Н. Проблемы дозирования сыпучих консервантов / Н.Н. Кучин., М.С. Жужин, А.Н. Смирнов // Вестник НГИЭИ. – 2016. – №6 (61). – С. 60–65.
8. Нуралиев, Е.Р. Производственные опыты по изучению мер борьбы и профилактики каннибализма кур в промышленном птицеводстве / Е.Р. Нуралиев, И.И. Кочиш // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – №3. – С. 117–120.
9. Suman, G. Single cell protein production: A review / G. Suman, M. Nupur, S. Anuradha, B. Pradeep // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2015. – Vol. 4. – P. 251–262.
10. Музафаров, А.М. Культивирование и применение микроводорослей / А.М. Музафаров, Т.Т. Таубаев. – Ташкент: Фан УзССР. – 1984. – 136 с.
11. Dewan, A. Growth kinetics of microalgae in microfluidic static droplet arrays / A. Dewan, J. Kim, R.H. McLean, S.A. Vanapalli, M.N. Karim // Biotechnol. Bioeng. – 2012. – Vol. 109, No. 12. – P. 2987–2996.
12. Kent, M. Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements / M. Kent, H.M. Welladsen, A. Mangott, Y. Li // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, No. 2: e0118985.
13. Богданов, Н.И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных / Н.И. Богданов. – Пенза, 2007. – 48 с.
14. Яковлева, Т.В. Применение суспензии хлореллы в кормлении свиней / Т.В. Яковлева, Л.А. Яковлев // Ученые записки УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: науч.-практ. журнал. – Витебск. – 2013. – Т. 49, вып. 2, ч. 1. – С. 264–268.
15. Schmidt, S.B. Manganese deficiency in plants: the impact photosystem II / S.B. Schmidt, P.E. Jensen, S. Husted // Trends Plant Sci. – 2016. – Vol. 21, No 7. – P. 622–632.
16. Bonke, E. Manganese ions enhance mitochondrial H₂O₂ emission from Krebs cycle oxidoreductases by unducing permeability transition / E. Bonke et al. // Free Radic. Biol. Med. – 2016. – Vol. 99. – P. 43–53.
17. Keren, N.A light-dependent mechanism for massive accumulation of manganese in the photosynthetic bacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 / N. Keren, M.J. Inmaculada Yruela // Transition metals in plant photosynthesis. Metallomics. – 2013. – Vol. 5. – P. 1090–1109.
18. Войнар, А.И. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека / А.И. Войнар. – М., 1960. – 245 с.

19. Zablocka–Slowinska, K. The role of manganese in etiopathogenesis and prevention of selected diseases / K. Zablocka–Slowinska, H. Grajeta // *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. – 2012. – Vol. 66. – P. 549–553.
20. Lin, Y.T. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short–lived *Caenorhabditis elegans* mutant // Y.T. Lin, H. Hoang, S.I. Hsieh, N. Rangel, A.L. Foster, J.N. Sampayo, G.J. Lithgow, C. Srinivasan // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 40, No. 7. – P. 1185–1193.
21. Лукьянов, В.А. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе / В.А. Лукьянов, А.И. Стифеев. – Курск: Издательство Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2014. – 181 с.
22. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей: научное издание / Национальная академия наук Беларуси, Институт биофизики и клеточной инженерии; сост. С.С. Мельников [и др.]. – Минск: Беларуская навука. – 2011. – 101 с.
23. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
24. Макарова, Е.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем / Е.И. Макарова, И.П. Отурина, А.И. Сидякин // *Экосистемы, их оптимизация и охрана*. – 2009. – Вып. 20. – С. 120–133.
25. Романенко, В.Д. Биотехнология культивирования гидробионтов / В.Д. Романенко, Ю.Г. Крот, Л.А. Сиренко, В.Д. Соломатина; Киев: Ин–т гидробиологии, 1999. – 264 с.
26. Богданов, Н.И. Использование хлореллы для выращивания и откорма сельскохозяйственных животных. – Пенза: НИИ Альгобиотехнологии, 2004. – 48 с.
27. Мельников, С.С. Оптимизация условий выращивания хлореллы / С.С. Мельников, Е.Е. Мананкина, Т.В. Самович, Н.В. Козел, Н.В. Шалыго // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2014. – №3. – С. 52–56.
28. Bleakley, S. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production / S. Bleakley, M. Hayes // *Foods*. – 2017. – Vol. 6, No. 5. – P. 33.

ILYUCHYK Irina A.
NIKANDROV Vitaliy N.

CHLORELLA VULGARIS CULTURE GROWTH AND PROTEIN ACCUMULATION AT MNCL₂ ADDITION IN NUTRIENT MEDIUM

The dynamics of Chlorella vulgaris biomass, intracellular protein and protein of cultural liquid content at MnCl₂ addition (in the wide concentration range – 0.01–25.0 mg/l) in nutrient medium was studied during within 40 days. In general, at manganese salt addition, biomass level, did not differ from control variant in essence, with rare exception. In the effector presence the dependence of biomass accumulation was deviated from the linear. Contents changes of intra– and extracellular protein during cultivation had oscillating character. Concentration of an effector and terms of cultivation at which the level of the common protein increased in unit volume of culture for 34 and 116% in comparison with control were revealed.

Keywords: *chlorella, manganese chloride (II), protein, biomass.*

References

1. Ostyakova M.E. Bolezni obmena veschestv krupnogo rogatogo skota, svyazan–nyie s nepolnotsennyim kormleniem [The diseases of the metabolism of cattle connected with defective feeding]. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Vestnik of Krasnoyarsk State Agrarian University], 2015, no. 12, pp. 195–198. (In Russian)
2. Ganuschenko O.F, Sobolev D.T. *Organizatsiya ratsionalnogo kormleniya korov s ispolzovaniem sovremennyih metodov kontrolya polnotsennosti ih pitaniya* [The Organization of rational feeding of

cows with the use of modern control methods the usefulness of nutrition]. Vitebsk: Vitebskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny, 2016. 80 p. (In Russian)

3. Gur'yanov A.M., Kokorev V.A., Borin A.V. Optimizaciya urovnya belkovo–vitaminno–mineral'nyh dobavok v racionah molodnyaka svinej [Optimization of level of protein–vitamin–mineral supplements in the diets of store pigs]. *ZHivotnovodstvo i veterinarnaya medicina; Federal'noe Gosudarstvennoe Byudzhethoe Nauchnoe Uchrezhdenie Mordovskij Nauchno–Issledovatel'skij Institut Sel'skogo Hozyajstva*. [Animal Agriculture And Veterinary Medicin]. Saransk, 2016, pp. 29–37. (In Russian)

4. Rajhman A.YA. Effektivnost' ispol'zovaniya zlakovo–bobovogo sena i senazha v racionah laktiruyushchih korov [Efficiency of using cereal–bean hay and haylage in rations of lactating cows]. *Aktual'nye problemy intensivnogo razvitiya zhivotnovodstva; Belorusskaya gosudarstvennaya sel'skohozyajstvennaya akademiya* [Actual problems of intensive livestock development]. Gorki, 2017, pp. 238–246. (In Russian)

5. Soboleva N.V., Babicheva I.A., Karamaev S.V., Karamaeva A.S. Kachestvo kormov iz lyucerny posevnoj i kozlyatnika vostochnogo [The quality of forage from alfalfa seeded and goatskin eastern]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Tidings of Orenburg State Agrarian University], 2016, pp. 103–105. (In Russian)

6. Kuz'minyh A.N., Pashkova G.I. Urozhajnost' i kachestvo vikozlakovyh agrocenozov v usloviyah dernovo–podzolistoj pochvy Nechernozemnoj zony [Yield and quality of vetch–agrochemical plants in conditions of sod–podzolic soil of the Non–chernozem zone]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Tidings of Orenburg State Agrarian University], 2017, pp. 52–55. (In Russian)

7. Kuchin N.N., Zhuzhin M.S., Smirnov A.N. Problemy dozirovaniya sypuchih konservantov [Problems feeding of bulk preservatives]. *Vestnik Nizhegorodskogo gosudarstvennogo inzhenerno–ehkonomicheskogo universiteta* [Vestnik of Nizhny Novgorod State University of Engineering and Economics], 2016, no. 6 (61), pp. 60–65. (In Russian)

8. Nuraliev E.R., Kochish I.I. Proizvodstvennye opyty po izucheniyu mer bor'by i profilaktiki kannibalizma kur v promyshlennom pticevodstve [Industrial experiments on the study of control measures and the prevention of chicken cannibalism in industrial poultry farming]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Tidings of Orenburg State Agrarian University], 2017, no. 3, pp. 117–120. (In Russian)

9. Suman G., Nupur M, Anuradha S., Pradeep B. Single cell protein production: A review . *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2015, Vol. 4, pp. 251–262.

10. Muzafarov A.M., Taubaev T.T. *Kul'tivirovanie i primenenie mikrovodoroslej* [Cultivation and use of microalgae]. Tashkent, 1984. 136 p. (In Russian)

11. Dewan A., Kim J., McLean R.H., Vanapalli S.A., Karim M.N. Growth kinetics of microalgae in microfluidic static droplet arrays. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, Vol. 109, no. 12, pp. 2987–2996.

12. Kent M., Welladsen H.M., Mangott A., Li Y. Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 2: e0118985.

13. Bogdanov N.I. *Suspenziya hlorelly v racione sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh* [Suspension of chlorella in the diet of farm animals]. Penza, 2007, p. 48. (In Russian)

14. YAKovleva T.V., YAKovlev L.A. Primenenie suspenzii hlorelly v kormlenii svinej [The use of a suspension of chlorella in the feeding of pigs]. *Uchenye zapiski «Vitebskaya ordena «Znak Pocheta» gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy mediciny»* [Scientific notes "Vitebsk Order of the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine]. Vitebsk, 2013, vol. 49, iss. 2, pp. 264–268.

15. Schmidt S.B., Jensen P.E., Husted S. Manganese deficiency in plants: the impact photosystem II. *Trends Plant Sci*, 2016, vol. 21, no 7, pp. 622–632.

16. Bonke E., Siebels I, Zwicker K, Dröse S. Manganese ions enhance mitochondrial H₂O₂ emission from Krebs cycle oxidoreductases by unducing permeability transition. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, vol. 99, pp. 43–53.

17. Keren N., Inmaculada Yruela M.J. A light–dependent mechanism for massive accumulation of manganese in the photosynthetic bacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*, 2013, vol. 5, pp. 1090–1109.

18. Vojnar A.I. *Biologicheskaya rol' mikroelementov v organizme zhivotnyh i cheloveka* [The biological role of microelements in animals and humans]. Moskva, 1960. 245 p. (In Russian)

19. Zablocka–Slowinska K., Grajeta H. The role of manganese in etiopathogenesis and prevention of selected diseases. *Postepy Hig. Med. Dosw*, 2012, vol. 66, pp. 549–553.

20. Lin Y.T., Hoang H., Hsieh S.I., Rangel N., Foster A.L., Sampayo J.N., Lithgow G.J., Srinivasan C. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006, vol. 40, no. 7, pp. 1185–1193.

21. Luk'yanov V.A., Stifeev A.I. *Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslej v agrocenoze* [Applied aspects of microalgae application in agrocenosis]. Kursk: Izdatel'stvo Kurskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii, 2014. 181 p. (In Russian)

22. Mel'nikov S.S. et al. *Katalog geneticheskogo fonda khoziaistvenno poleznykh vidov vodoroslei* [Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae]. Minsk, Belarusskaia navuka Publ, 2011. 101 p. (In Russian)

23. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.

24. Makarova E.I., Oturina I.P., Sidyakin A.I. *Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslej – obitatelej vodnyh* [Applied aspects of the use of microalgae – the inhabitants of water]. *EHkosistemy, ih optimizaciya i ohrana* [Ecosystems, their optimization and protection], 2009, iss. 20, pp. 120–133. (In Russian)

25. Romanenko V.D., Krot YU.G., Sirenko L.A., Solomatina V.D. *Bio–tekhnologiya kul'tivirovaniya gidrobiontov* [Biotechnology of cultivation of hydrobionts]. Kiev, Institut gidrobiologii, 1999. 264 p. (In Russian)

26. Bogdanov N.I. *Ispol'zovanie hlorelly dlya vyrashchivaniya i otkorma sel'skohozyajstvennykh zhivotnykh* [Use of chlorella for the cultivation and fattening of farm animals]. Penza: nauchno issledovatel'skij institut Al'gobiotekhnologii, 2004. 48 p. (In Russian)

27. Mel'nikov S.S., Manankina E.E., Samovich T.V., Kozel N.V., SHalygo N.V. *Optimizaciya uslovij vyrashchivaniya hlorelly* [Optimization of the conditions for growing chlorella]. *Vesci nacional'noj akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnyh. Navuk* [News of the National Academy of Sciences of Belarus. Series: Biological Sciences], 2014, no. 3, pp. 52–56. (In Russian)

28. Bleakley S., Hayes M. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 2017, vol. 6, no. 5, p. 33.

Received 5 April 2018