

Моделирование роста и фотоадаптации накопительной культуры *Porphyridium purpureum*

Лелеков А.С.^{1*}, Ключкова В.С.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей имени
А.О. Ковалевского РАН", Севастополь, Россия

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

Аннотация. Работа посвящена исследованию линейного роста красной морской микроводоросли *Porphyridium purpureum* при различной поверхностной облучённости. Перед запуском накопительной культуры *P. purpureum* выдерживали в течение 3–5 дней в условиях плотностата, что позволило адаптировать клетки к заданной интенсивности света. На каждой накопительной кривой методом аппроксимации экспоненциальной и линейной фазы роста соответствующими уравнениями определены максимальная удельная скорость роста и максимальная продуктивность. Учтено, что в момент начала линейной фазы роста интегральный коэффициент поглощения света, рассчитанный по истинному спектру поглощения в области ФАР, превысил 50 %. Показано, что с ростом интенсивности света с 15 до 227 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ максимальная удельная скорость роста возрастала с 0.31 до 1 сут^{-1} , а максимальная продуктивность – с 1.32 до 16.38 г СВ $\text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$. Математическое моделирование линейного роста накопительной культуры *P. purpureum* показало, что при любой интенсивности света удельная скорость определяется поверхностной облучённостью, коэффициентом поглощения света и концентрацией хлорофилла *a*. Введено понятие приведённой облучённости – количества поглощённой световой энергии на единицу хлорофилла *a*. Приведена линейная зависимость удельной скорости роста от приведённой облучённости, при этом тангенс угла наклона прямой определяется организацией ключевого мультиферментного комплекса, параметры которого зависят от степени фотоадаптации клеток. Впервые установлена количественная взаимосвязь между данными параметрами и интенсивностью света, а также соотношением хлорофилла *a* и реакционного центра P700.

Ключевые слова: микроводоросли, удельная скорость роста, хлорофилл *a*, продуктивность, приведённая облучённость, размер фотосинтетической единицы.

ВВЕДЕНИЕ

Классическую накопительную кривую роста культуры микроводорослей следует разделять не менее чем на два участка. В первом случае, клетки находятся в условиях избытка биогенных элементов и световой энергии, что приводит к экспоненциальному росту культуры. Для второго случая мы попадаем в область лимитирования, при этом кривая часто характеризуется наличием линейной фазы, на которой продуктивность культуры остаётся постоянной. Определение границ каждого участка является

* a.lelekov@yandex.ru

субъективной задачей. В некоторых случаях кривая роста имеет типичную S-образную форму, поэтому линейную фазу можно лишь условно выделить в окрестностях точки перегиба кривой с учётом статистического разброса экспериментальных данных. Такая форма кривых обычно характерна при лимитировании роста культуры биогенными элементами питательной среды, которые единоразово вносятся вначале опыта и не поступают в фотобиореактор извне [1]. В том случае, если лимитирующим фактором является освещённость или поток углекислого газа, то на кривой роста наблюдается длительная линейная фаза, её продолжительность может составлять от нескольких дней до нескольких недель [2].

Красная морская микроводоросль *Porphyridium purpureum* часто рассматривается как модельный объект при проведении исследований, направленных на оценку влияния света на скорость роста и биосинтеза микроводорослей. Клетки порфиридиума практически сферические до 10 мкм в диаметре, окружены мембраной с сульфатной полисахаридной оболочкой, что при неблагоприятных условиях приводит к их агглютинации [3]. С практической точки зрения, порфиридиум представляет интерес благодаря содержанию таких биологически активных веществ как фотосинтетические пигменты хлорофилл *a*, каротиноиды, В-фикоэритрин, внеклеточные экзополисахариды, а также ненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновая и эйкозапентаеновая [4].

На сегодняшний день детально изучена структура и функционирование фотосинтетического аппарата микроводорослей. В процессе фотосинтеза поглощённая энергия ФАР запасается клетками микроводорослей в виде АТФ и НАДФ·Н. Современные представления о нециклическом транспорте электронов сводятся к общепринятой Z-схеме [5]. 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 может превращаться в пировиноградную кислоту при недостатке НАДФ·Н, и далее в аланин. Наряду с аминокислотами, при определённых условиях, продуктами цикла Кальвина могут являться органические кислоты, жиры, липиды [6]. У микроводорослей выявлено три группы светособирающих и фотозащитных пигментов: хлорофиллы, каротиноиды и фикобилипротеины. Хлорофиллы – пигменты, которые улавливают энергию солнечного света и передают её на реакционные центры фотосинтеза, причём сами реакционные центры (P700 и P680) также являются димеризованными формами хлорофилла *a*. Каротиноиды поглощают и передают энергию синей части спектра на хлорофилл, а также участвуют в процессе диссипации избыточной энергии. Фикобилипротеины входят в состав фикобилисом, основной функцией которых является передача энергии на P680 [7]. В состав фикобилисом красной микроводоросли *P. purpureum* входят В-фикоэритрин (В-ФЭ), R-фикоцианин (R-ФЦ) и аллофикоцианин (АФЦ). В прикладном аспекте наибольший интерес вызывает красный пигмент В-ФЭ, количество которого составляет около 85 % от общей суммы ФБП и 10 % от сухой биомассы, относительное содержание В-ФЭ и его продукция варьируют в достаточно широком диапазоне в зависимости от условий культивирования *P. purpureum*, а скорость синтеза В-ФЭ достигает 40–50 мг л⁻¹ сут⁻¹ [8].

При запуске накопительной культуры обычно клетки микроводорослей переносят с низкой на высокую освещённость. В таких условиях происходят значительные изменения биохимического состава биомассы и содержания фотосинтетических пигментов [9]. Например, при переносе клеток диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* с низкой 17 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ на высокую 602 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ интенсивность света синтез хлорофилла *a* отсутствовал в течение 24 часов эксперимента, при этом происходило увеличение плотности культуры [10]. Похожие результаты получены и

для других диатомовых [11], где при переносе клеток *Skeletonema costatum* с низкой $50 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на высокую $1200 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ облучённость рост концентрации хлорофилла *a* в течение 12 часов не отмечался. В клетках красной морской водоросли *P. purpureum*, находящихся в экспоненциальной фазе накопительной культуры, с ростом освещённости происходило возрастание продуктивности, объёма клеток, а также уменьшение содержания всех фотосинтетических пигментов и размера фотосинтетической антенны – отношения хлорофилла *a* к реакционному центру P700 (Chl/P700). При этом авторами отмечена относительно фиксированная стехиометрия PSI, PSII и фикобилисом [7]. Позднее этим же коллективом авторов показано, что уменьшение Chl/P700 обусловлено деградацией трёх белков, которые относятся к свтособирающему комплексу LHC I [12]. Известно, что все водоросли содержат внутримембранные LHC, ассоциированные как с PSI, так и с PSII. Среди морских водорослей выделяют три основных типа LHC: 1 – у зелёных водорослей они представляют собой белковые комплексы, связанные с хлорофиллами *a* и *b* и ксантофиллами, в основном лютеином; 2 – LHC бурых водорослей содержат очень много фукоксантина наряду с хлорофиллами *a* и *c*; 3 – LHC красных водорослей, которые содержат хлорофилл *a* и зеаксантин, LHC ассоциированы только с РЦ 1 [13–17]. У цианобактерии *Arthrospira platensis* хлорофилл *a* входит в структуру LHC: на одну молекулу реакционного центра в накопительной культуре в зависимости от интенсивности света приходится 120–180 молекул антенного хлорофилла *a*, при этом 95 % хлорофилла связано с первой фотосистемой [18]. Аналогичная картина характерна и для красных микроводорослей, в частности, у *P. purpureum* почти весь хлорофилл *a* связан с LHC первой фотосистемы, а антенна второй фотосистемы представлена ФБП [17].

В предыдущих работах [19, 20] показано, что линейная фаза роста обусловлена снижением количества световой энергии на единицу хлорофилла *a*, на основе чего предложена математическая модель, устанавливающая количественную закономерность между удельной скоростью роста культуры и концентрацией хлорофилла *a*. Однако остаётся открытым вопрос, какие именно изменения биохимического состава биомассы обуславливают линейный рост плотности культуры. Отдельно требуется рассмотрение процессов, связанных с фотоадаптацией клеток микроводорослей к постоянно меняющимся световым условиям. Несмотря на достаточно большое количество экспериментального материала для условий плотностата, для накопительной культуры в литературе практически не приводятся количественные взаимосвязи между пигментным составом биомассы и световым потоком. Поэтому целью данной работы – моделирование линейного роста накопительной культуры *P. purpureum* с учётом её адаптации к различной интенсивности света.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН и кафедры "Физика" Института перспективных исследований Севастопольского государственного университета. В качестве объекта исследования использовали культуру красной морской микроводоросли *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross из коллекции ФИЦ ИнБЮМ. Культуру выращивали в унифицированной лабораторной установке [21] на удвоенной питательной среде для морских водорослей [22] в накопительном режиме. Использовался фотобиореактор плоскопараллельного типа толщиной 2 см, площадь рабочей поверхности 0.035 м^2 , объём 0.7 л. В качестве источника освещения применяли люминесцентные лампы холодного света Philips Daylight 18 Вт. Освещённость измеряли люксметром Ю-116, интенсивность светового потока и облучённость – квантометром Li-COR Li-250A. В пяти опытных вариантах

(далее А, В, С, D, E) температуру культуры стабилизировали на уровне 26 ± 1 °С. Для варианта А средняя освещённость поверхности фотобиореактора составила 1 клк ($3.34 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ или $15 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), для В – 2.5 клк ($8.35 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ или $38 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), для С – 5 клк ($16.7 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ или $76 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), для D – 10 клк ($33.4 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ или $151 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), для E – 15 клк ($50.1 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ или $227 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Важно отметить, что перед запуском накопительной кривой, культуру длительное время (3–5 дней) выдерживали на протоке при каждой освещённости. Барботаж осуществляли аквариумным компрессором Hailea АСО-308 воздухом через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0.1 мм. Использование аквариумного распылителя позволило значительно увеличить перемешивание культуры, что особенно актуально при работе с порфиридиумом, культура которого характеризуется высокой вязкостью. Скорость подачи воздуха составляла $2 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1}$ культуры в минуту. Дополнительного подвали углекислый газ для стабилизации рН культуры в области 7.8 единиц.

Для определения сухого веса (СВ) величину оптической плотности D_{750} , измеренную на фотометре Unicо в 1 см кюветах, умножали на эмпирический коэффициент $k = 0.58 \text{ г} \cdot \text{СВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл}^{-1}$. Для определения данного коэффициента для всех освещённостях была проведена серия параллельных измерений оптической плотности и сухого веса при 60 °С. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику для уменьшения влияния светорассеяния на показания прибора.

Спектры поглощения регистрировались в 1 см кюветах в диапазоне от 380 до 800 нм с шагом 0.5 или 1 нм на двухлучевых спектрофотометрах с интегрирующей сферой Lambda 365 (ИПИ СевГУ) и Shimadzu UV-2600i (ЦКП ФИЦ ИнБЮМ). В обоих вариантах рассчитывали истинный спектр поглощения, компенсированный на рассеяние, согласно методике [23]. По истинным спектрам поглощения методом кривых Гаусса определяли концентрацию хлорофилла a , с помощью разработанного модельного подхода [24]. Также по истинным спектрам рассчитывали коэффициент поглощения света α . Отметим, что истинные спектры порфиридиума на двух спектрофотометрах были идентичны.

Аппроксимацию экспериментальных данных и расчёт коэффициентов моделей выполняли в свободном ПО Scidavis 1.26 и Scilab 5.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Экспериментальные данные

На рисунке 1,А представлены накопительные кривые роста культуры *P. purpureum*. Экспоненциальная фаза роста во всех опытных вариантах продолжалась до 1–2 суток, при этом рост культур описывался выражением:

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

где B_0 – начальная плотность культуры; μ_m – максимальная удельная скорость роста.

По окончании экспоненциальной фазы роста наступала продолжительная линейная фаза, характеризующаяся постоянством продуктивности культуры:

$$B = B_l + P_m (t - t_l), \quad (2)$$

где B_l – плотность культуры момент начала линейного роста t_l ; P_m – максимальная продуктивность.

Таблица 1. Продукционные характеристики накопительной культуры *P. purpureum* при различном световом обеспечении

Освещённость, клк / Вт·м ⁻² / мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	μ_m , сут ⁻¹	P_m , г СВ·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	P_m , г СВ·м ⁻² ·сут ⁻¹
1 / 3.34 / 15	0.31	0.07	1.32
2.5 / 8.35 / 38	0.56	0.19	3.72
5 / 16.7 / 76	0.71	0.31	6.23
10 / 33.4 / 151	0.85	0.52	10.46
15 / 50.1 / 227	1	0.82	16.38

Значения параметров μ_m и P_m культуры *P. purpureum* представлены в таблице 1. Отметим, что продолжительность линейной фазы была существенно больше, нежели это указано на рисунке 1, А. Однако за пределами отмеченных участков вероятно наличие влияния биогенных элементов питательной среды на скорость роста, поэтому такие данные в дальнейших расчётах не использовались.

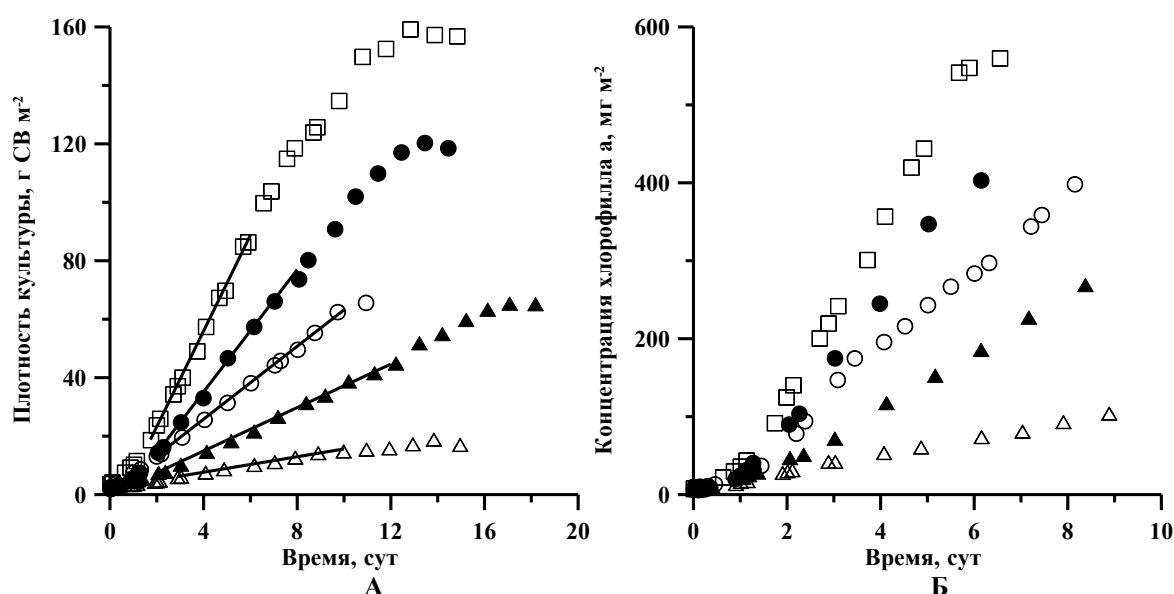


Рис. 1. А – накопительные кривые роста культуры *P. purpureum* при различной поверхностной освещённости: Δ – 1 клк, $\blacktriangle$ – 2.5 клк, $\circ$ – 5 клк, $\bullet$ – 10 клк, $\square$ – 15 клк. Б – динамика концентрации хлорофилла *a*. Сплошная линия – аппроксимация линейной фазы роста выражением (2). Значения коэффициентов в таблице 1.

Как и следовало ожидать, продукционные характеристики культуры, а именно, максимальная удельная скорость роста на экспоненциальной фазе и максимальная продуктивность на линейной фазе роста возрастали с ростом поверхностной облучённости. Кроме того, можно утверждать, что по окончании экспоненциальной фазы роста на 1–2 сутки эксперимента начинался линейный рост биомассы *P. purpureum*, который обусловлен световым лимитированием. Влиянием биогенных элементов и газового обеспечения можно пренебречь, поскольку используемая питательная среда рассчитана примерно на 8–10 грамм сухой биомассы, а стабилизация рН культуры в области 7.8 единиц позволила исключить лимитирование роста культуры углекислым газом. Для количественного описания влияния световых условий на рост порфиридиума используем математическую модель, предложенную в [19, 20] для зелёных водорослей и цианопрокариот, учитывая адаптацию культуры к различной интенсивности света.

Математическая модель

Подробно основные положения модели представлены в [19]. Рассматривается оптически плотная культура микроводорослей, находящаяся в плоскопараллельном фотобиореакторе при постоянном освещении. Под термином "оптически плотная" подразумевается то, что интегральный коэффициент поглощения света культурой микроводорослей превышает 50 %. Согласно представленным экспериментальным данным (см. рис. 2,Б), поглощение превысило 50 % на вторые сутки эксперимента, причём к пятым суткам – достигло 100 %. В таких условиях, согласно принципам моделирования скорости фотобиосинтеза микроводорослей линейными сплайнами [19, 20], продуктивность культуры линейно зависит от приведённой плотности потока энергетического субстрата λ_i – количества квантов света, приходящих на единицу ключевого мультиферментного комплекса за время его оборота. В свою очередь, удельная скорость синтеза биомассы μ_0 , исходя из предположения о пропорциональности всех структурных компонентов биомассы, может быть выражена через количество поглощённой световой энергии и концентрацию хлорофилла a :

$$\mu_0 = \mu_{0m} \frac{\varphi_e \cdot \alpha \cdot I_0}{\mu_e \cdot f \cdot \pi}, \quad (3)$$

где μ_{0m} – максимальная удельная скорость синтеза биомассы; α – коэффициент поглощения света; I_0 – облучённость поверхности фотобиореактора; φ_e , μ_e – эффективность и активность ключевого мультиферментного комплекса; f – коэффициент пропорциональности концентрации ключевого мультиферментного комплекса концентрации хлорофилла a ; π – концентрация хлорофилла a .

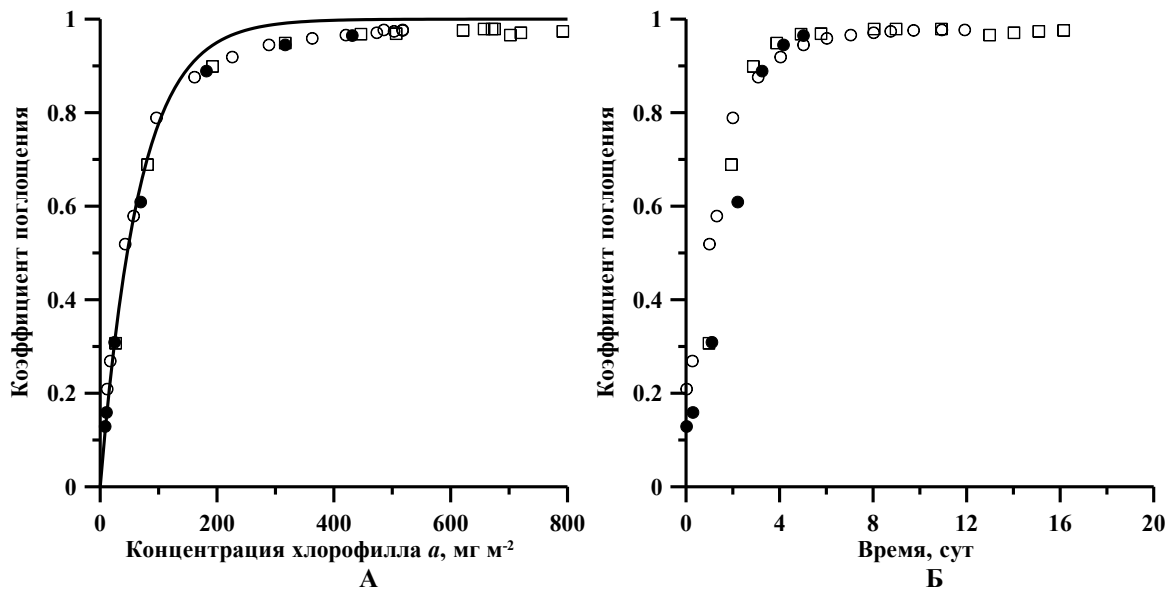


Рис. 2. А – Зависимость коэффициента поглощения света от концентрации хлорофилла a при различных освещённостях: $\circ$ – 5 клк, $\bullet$ – 10 клк, $\square$ – 15 клк. Сплошная линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением Бугера – Ламберта – Бера. Значения коэффициентов в тексте. Б – изменение коэффициента поглощения света в эксперименте.

Удельная скорость роста культуры, по определению, равна разности удельных скоростей синтеза и эндогенного расхода биомассы:

$$\mu = \mu_0 - \mu_r, \quad (4)$$

где μ_r – удельная скорость эндогенного расхода биомассы, которую будем считать постоянной величиной, что не противоречит классическим представлениям о росте популяций фотоавтотрофов [25].

Подставляя выражение (4) в (3):

$$\mu = \mu_{0m} \frac{\Phi_e \cdot \alpha \cdot I_0}{\mu_e \cdot f \cdot \pi} - \mu_r. \quad (5)$$

Максимальную удельную скорость синтеза биомассы μ_{0m} можно выразить как сумму максимальной удельной скорости роста и удельной скорости эндогенного расхода биомассы:

$$\mu_{0m} = \mu_m + \mu_r. \quad (6)$$

С учётом (6), выражение (5) преобразуется:

$$\mu = (\mu_m + \mu_r) \cdot \frac{\Phi_e \cdot \alpha \cdot I_0}{\mu_e \cdot f \cdot \pi} - \mu_r. \quad (7)$$

Зависимость коэффициента поглощения света от концентрации хлорофилла a представлена на рисунке 2,А. Данные с высокой степенью точности ($R^2 = 0.99$) описываются законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$\alpha = 1 - e^{-k_\pi \cdot \pi}, \quad (8)$$

где $k_\pi = 0.015$ – удельный коэффициент поглощения, $\text{м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ хлорофилла a .

Отметим, что для различной освещённости k_π изменялся от 0.014 до 0.016 $\text{м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ хлорофилла. Поэтому для дальнейших расчётов использовалось его среднее значение. Ранее нами показано, что k_π может значительно варьировать для разных систематических групп микроводорослей. Например, для культуры зелёной морской водоросли *Tetraselmis viridis* удельный коэффициент поглощения составил 0.008 $\text{м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ [19], а для цианопрокариоты *Arthrospira platensis* – 0.017 $\text{м}^2 \cdot \text{мг}^{-1}$ [20].

Таким образом, для линейного участка накопительной кривой зависимость удельной скорости роста культуры от концентрации хлорофилла a запишется в виде:

$$\mu = (\mu_m + \mu_r) \cdot \frac{\Phi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot f} \cdot \frac{1 - e^{-0.015 \cdot \pi}}{\pi} - \mu_r. \quad (9)$$

Для удобства дальнейших преобразований введём обобщённый коэффициент:

$$A = \frac{\Phi_e}{\mu_e \cdot f}. \quad (10)$$

Окончательно, выражение (9) с учётом (10) будет иметь вид:

$$\mu = (\mu_m + \mu_r) \cdot A \cdot I_0 \cdot \frac{1 - e^{-0.015 \cdot \pi}}{\pi} - \mu_r. \quad (11)$$

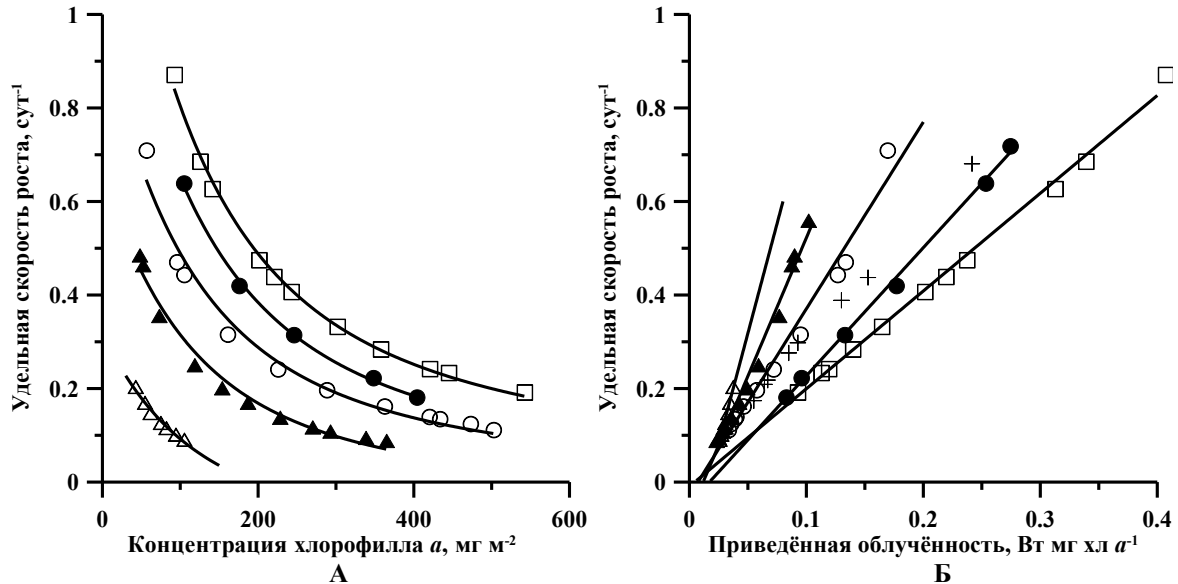


Рис. 3. А – зависимость удельной скорости роста от концентрации хлорофилла *a* при различной освещённости: Δ – 1 клк, $\blacktriangle$ – 2.5 клк, $\circ$ – 5 клк, $\bullet$ – 10 клк, $\square$ – 15 клк. Линии – аппроксимация экспериментальных данных выражением (11). Значения коэффициентов в таблице 2. Б – зависимость удельной скорости роста от приведённой облучённости. Линии – аппроксимация линейной регрессией.

На рисунке 3,А представлена аппроксимация выражением (11) экспериментальных данных зависимости удельной скорости роста от концентрации хлорофилла *a* при различной освещённости. Высокое ($R^2 = 0.98$) соответствие экспериментальных данных предлагаемой модели (11) подтверждает ранее высказанное предположение о том, что удельная скорость роста культуры на линейном участке накопительной кривой определяется количеством поглощённой биомассой энергии на единицу хлорофилла. Действительно, в координатах «удельная скорость – приведённая облучённость» (см. рис. 3,Б), имеем линейную зависимость. Приведённая облучённость i , по сути, аналогична понятию приведённой плотности потока энергетического субстрата λ_i без учёта видоспецифических констант:

$$i = \frac{\alpha \cdot I_0}{\pi}. \quad (12)$$

Рассчитанные коэффициенты модели (11) представлены в таблице 2. Отметим, что константа удельной скорости эндогенного расхода биомассы μ_r с ростом интенсивности света уменьшалась. Механизмы этого процесса могут быть различны [26–28], их рассмотрение в рамках данной работы нецелесообразно.

Таблица 2. Расчётные значения коэффициентов модели (11)

Освещённость, клк / Вт·м ⁻² / мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	<i>A</i> , мг хл <i>a</i> ·Вт ⁻¹	μ_r , сут ⁻¹
1 / 3.34 / 15	20.36	0.15
2.5 / 8.35 / 38	9.35	0.06
5 / 16.7 / 76	5.41	0.03
10 / 33.4 / 151	2.99	0.035
15 / 50.1 / 227	2.07	0.01

Очевидно, что с ростом освещённости происходит уменьшение обобщённого коэффициента *A*. Согласно выражению (10) это может объясняться изменением одного либо нескольких коэффициентов модели: эффективности (ϕ_e), активности (μ_e) ключевого мультиферментного комплекса или коэффициента пропорциональности *f*

концентрации ключевого мультиферментного (белкового) комплекса хлорофиллу a . Наиболее вероятным является изменение коэффициента f между вследствие фотоадаптации клеток *P. purpureum* к различной интенсивности света. Как указано во вступлении к работе, при адаптации микроводорослей к различной интенсивности света происходит изменение размера фотосинтетической единицы (ФСЕ) – соотношения хлорофилла a и реакционного центра P700 [7, 29, 30]. Это обусловлено, в том числе, светоиндуцируемой деградацией белков светособирающего комплекса ЛНС, который выполняет функции антенны для передачи энергии на реакционный центр. Таким образом, в общем случае концентрацию ключевого мультиферментного комплекса следует выражать не через хлорофилл a , а через концентрацию реакционного центра P_{700} , который менее лабилен по сравнению с антенным хлорофиллом:

$$F_0 = \chi \cdot P_{700}, \quad (13)$$

где χ – коэффициент пропорциональности, константа; P_{700} – концентрация реакционного центра первой фотосистемы.

Такие заключения позволяют нам установить обратно пропорциональную связь между коэффициентом f и соотношением хлорофилл к P_{700} :

$$f = \frac{F_0}{\pi} = \chi \frac{P_{700}}{\pi} = \frac{\chi}{\psi}, \quad (14)$$

где ψ – соотношение между π и P_{700} .

В свою очередь, величина обобщённого коэффициента A прямо пропорциональна размеру ФСЕ:

$$A = \frac{\Phi_e}{\mu_e \cdot \chi} \cdot \psi. \quad (15)$$

В литературе не приводятся модельные представления, позволяющие количественно описать изменение размера ФСЕ в зависимости от интенсивности света. Разработка такой математической модели является отдельной задачей, которая выходит за рамки данной работы. Поэтому установим взаимосвязь данных величин посредством эмпирического выражения:

$$\psi = \psi_0 - a \cdot I_0 + b \cdot I_0^2, \quad (16)$$

где ψ_0 – начальное значение ФСЕ; a и b – константы.

На рисунке 4,А представлена аппроксимация эмпирическим выражением (16) зависимости размера ФСЕ (соотношения CHL/P700) культуры *P. purpureum* от интенсивности света по данным [7, 12]. Отметим, что вследствие большого разброса самих экспериментальных точек коэффициент детерминации оказался невысоким ($R^2 = 0.77$), однако использование такого простого подхода позволяет нам задать зависимость обобщённого коэффициента A от интенсивности света.

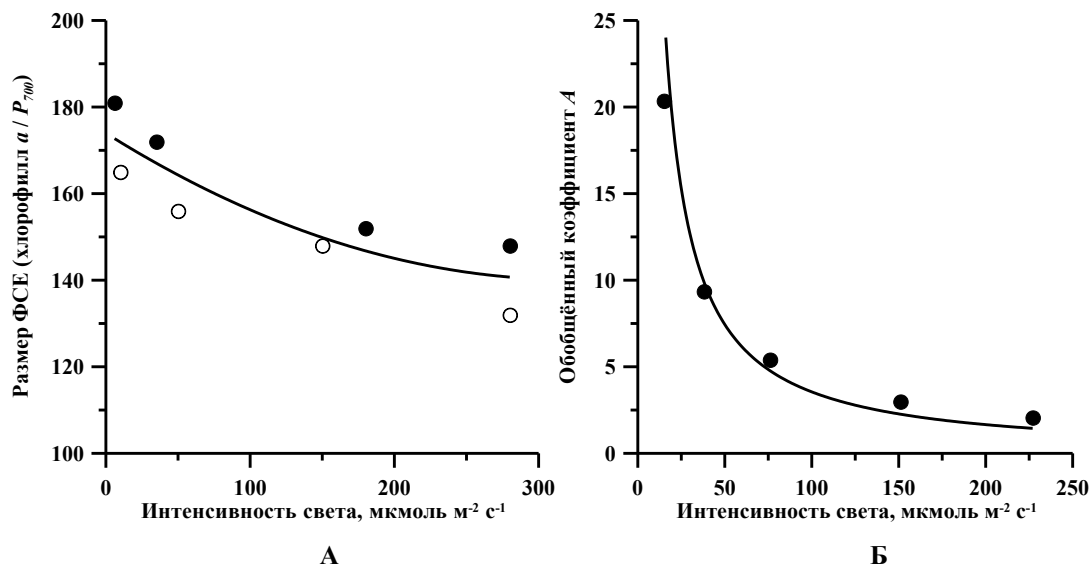


Рис. 4. А – зависимость размера ФСЕ (соотношения хлорофилл a / P_{700}) культуры *P. purpureum* от интенсивности света по данным [7] – чёрные (●) маркеры и [12] – светлые (○) маркеры. Линия – аппроксимация экспериментальных данных эмпирическим выражением (16). Б – зависимость обобщённого параметра A от интенсивности света. Линия – аппроксимация выражением (17).

Вторым видоспецифическим параметром, входящим в выражение (10), который безусловно зависит от освещённости – активность ключевого мультиферментного комплекса μ_e . Для любых микроводорослей активность фотосинтетической системы увеличивается с ростом интенсивности света, достигая насыщения при очень высоких световых потоках – около $500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ [31, 32]. В нашем эксперименте рассматривается диапазон облучённости в области светолимитирования: по данным [33] скорость роста полупоглощающей культуры *P. purpureum* достигает максимума при 50 Вт м^{-2} , что соответствует наибольшему световому потоку ($227 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), рассматриваемому в данной работе. Поэтому можно положить, что активность ключевого мультиферментного комплекса растёт линейно с ростом интенсивности света, поскольку в области светолимитирования углы наклона любых математических моделей фотосинтеза близки [34]. Кроме того, для данной области на основе вероятностного подхода показано, что эффективность световых реакций фотосинтеза максимальна [35], поэтому видоспецифический коэффициент φ_e следует считать константой. Такие заключения позволяют связать обобщённый коэффициент A с интенсивностью света:

$$A = \frac{\varphi_e}{\mu_e \cdot \chi} \cdot \psi = \frac{\varphi_e}{\chi} \cdot \frac{(\psi_0 - a \cdot I_0 + b \cdot I_0^2)}{k \cdot I_0}, \quad (17)$$

где k – константа связи.

На рисунке 4,Б представлена аппроксимация выражением (17) зависимости обобщённого коэффициента A от облучённости поверхности фотобиореакторов в эксперименте с учётом ранее определённых коэффициентов эмпирической модели (16). Таким образом, установлена взаимосвязь обобщённого коэффициента A модели линейного роста культуры микроводорослей со световыми условиями, в которых находились клетки в момент запуска накопительной культуры. Это свидетельствует о том, что культура *P. purpureum* при переходе из экспоненциальной в линейную фазу роста сохраняет неизменными размер ФСЕ и активность фотосинтетического аппарата. В противном случае обобщённый коэффициент A не оставался бы постоянным на протяжении всего линейного участка накопительной кривой. Полученные результаты созвучны с литературными данными для *Arthrospira platensis* и *Chlorella vulgaris*, для которых показано, что соотношение пигментов сборщиков и реакционных центров ФСІ

не зависит от фазы роста накопительной культуры и определяется только интенсивностью света [18]. В нашем эксперименте адаптация *P. purpureum* к снижению приведённой облучённости с ростом плотности накопительной культуры заключалась в увеличении содержания хлорофилла *a* в биомассе, т. е. общего количества ФСЕ. Согласно классической доктрине [36] существует два способа фотоадаптации микроводорослей к изменению световых условий. Так для морских диатомовых водорослей увеличение интенсивности света приводит к снижению доли хлорофилла *a* и размера ФСЕ, при этом относительное содержание реакционных центров P700 практически не изменяется [36, 37]. Для зелёных видов микроводорослей рядом авторов [18, 36, 38] показано, что с увеличением интенсивности света содержание и хлорофилла *a* и P700 уменьшается, но с различными скоростями, при этом увеличивается размер ФСЕ. Таким образом, изменение размера ФСЕ у культуры *P. purpureum* происходит только в условиях плотностата, когда клетки находятся длительное время при большой интенсивности света, при этом одновременно происходит их селекция на протоке. При накопительном культивировании снижение приведённой облучённости вызывает увеличение содержания хлорофилла *a* за счёт увеличения количества фотосинтетических единиц, при этом остаётся постоянным размер ФСЕ и активности фотосинтетического аппарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модель линейного роста культуры микроводорослей основана на пропорциональности нормированной скорости синтеза биомассы приведённой плотности светового потока. Такое предположение в простейшем случае записывается через зависимость удельной скорости роста культуры от поверхностной облучённости и концентрации хлорофилла *a*. Адекватность такого подхода была ранее продемонстрирована для культур цианопрокариоты *A. platensis* и зелёной морской водоросли *T. viridis*. Поэтому с учётом полученных результатов для *P. purpureum* можно говорить об универсальности модели. В данной работе особое внимание уделено не точности описания экспериментальных данных, а анализу коэффициентов модели, выявление их взаимосвязи со световыми условиями, в которых находятся клетки. Для *P. purpureum* впервые установлено, что видоспецифические параметры, отражающие организацию ключевого мультиферментного комплекса, определяются только предысторией культуры, они остаются постоянными при переходе культуры от экспоненциальной к линейной фазе роста, а также не изменяются на самом линейном участке несмотря на снижение светового потока на каждую клетку. Кроме того, показано, что при фотоадаптации активность ключевого мультиферментного комплекса в области от компенсационной до насыщающей интенсивности света линейно возрастает, при этом эффективность комплекса остаётся постоянной. Значения данных параметров (или их соотношений) можно определить через угол наклона линейной зависимости удельной скорости роста от приведённой облучённости. Такие знания в дальнейшем позволят идентифицировать ключевой мультиферментный комплекс, который и является «узким местом» метаболизма.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Комплексное исследование механизмов функционирования биотехнологических комплексов с целью получения активных веществ из гидробионтов» (№ гос. регистрации 124022400152-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Геворгиз Р.Г., Лелеков А.С., Король О.Н. Моделирование динамики роста популяции микроорганизмов в накопительной культуре. Закрытая система. *Рыбное хозяйство Украины*. 2013. Т. 5. С. 6–15.

2. Naumann T., Çebi Z., Podola B., Melkonian M. Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: a novel solid-state photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 2013. V. 25. P. 1413–1420. doi: [10.1007/s10811-012-9962-6](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9962-6)
3. Dermoun D., Chaumont D., Thebault J.M., Dauta A. Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: light and temperature. *Biores. technol.* 1992. V. 42. No. 2. P. 113–117.
4. Akimoto M., Shirai A., Ohtaguchi K., Koide K. Carbon dioxide fixation and polyunsaturated fatty acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998. V. 73. P. 269–278.
5. Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. *Динамические модели электронного транспорта в фотосинтезе*. М.: Изд-во Института компьютерных исследований, 2020. 331 с.
6. *Физиология растений: Уч. для студ. вузов*. Под ред. Ермакова И.П. М.: Изд-во «Академия», 2005. 640 с.
7. Cunningham F.X., Dennenberg R.J., Mustardy L., Jursinic P.A., Gantt E. Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance. *Plant Physiol.* 1989. V. 91. No. 3. P. 1179–1187. doi: [10.1104/pp.91.3.1179](https://doi.org/10.1104/pp.91.3.1179)
8. Боровков А.Б., Гудвилович И.Н., Новикова Т.М., Климова Е.В. Продукционные характеристики полупроточной культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross при низкой освещённости. *Морской биологический журнал*. 2022. Т. 7. № 1. С. 3–13. doi: [10.21072/mbj.2022.07.1.01](https://doi.org/10.21072/mbj.2022.07.1.01)
9. Тренкеншу Р.П. Рост микроводорослей при переходе от темноты к постоянному освещению. *Вопросы современной альгологии*. 2018. № 2. URL: <http://algology.ru/1350> (дата обращения: 02.05.2024).
10. Паламодова О.С. Динамика фотоадаптации некоторых видов диатомовых водорослей. *Экология моря*. 2009. Т. 78. С. 70–74.
11. Anning T., MacIntyre H.L., Pratt S.M., Sammes P.J., Gibb S., Geider R.J. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.* 2000. V. 45. No 8. P. 1807–1817. doi: [10.4319/lo.2000.45.8.1807](https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1807)
12. Tan S., Wolfe G.R., Cunningham F.X., Gantt E. Decrease of polypeptides in the PS I antenna complex with increasing growth irradiance in the red alga *Porphyridium cruentum*. *Photosyn. Res.* 1995. V. 45. P. 1–10.
13. Mitra M., Melis A. Optical properties of microalgae for enhanced biofuels production. *Optics Express*. 2008. V. 16. P. 21807–21820.
14. Minagawa J. The Chlamydomonas sourcebook. Light-harvesting proteins. *Biology, Environmental Science*. 2009. V. 2. P. 503–539. doi: [10.1016/b978-0-12-370873-1.00022-8](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-370873-1.00022-8)
15. Jansson S. Light-harvesting complex I and II: pigments and proteins. *Encyclopedia of Biol. Chem.* 2013. P. 726–728. doi: [10.1016/b978-0-12-378630-2.00290-5](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378630-2.00290-5)
16. Dumay J. Proteins and pigments. *Seaweed in health and disease prevention*. 2016. P. 275–318. doi: [10.1016/b978-0-12-802772-1.00009-9](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802772-1.00009-9)
17. Fang Y., Liu D., Jiang J., He A., Zhu R., Tian L. Photoprotective energy quenching in the red alga *Porphyridium purpureum* occurs at the core antenna of the photosystem II but not at its reaction center. *J. Biol. Chem.* 2022. V. 298. No. 4. doi: [10.1016/j.jbc.2022.101783](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101783)
18. Заворуева Е.Н., Заворуев В.В., Крум С.П. *Лабильность первой фотосистемы фототрофов в различных условиях окружающей среды*. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011. 152 с.
19. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре. *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3. № 1. С. 53–60.
20. Лелеков А.С., Чернышев Д.Н., Ключкова В.С. Количественные закономерности

- роста накопительной культуры *Arthrospira platensis*. Математическая биология и биоинформатика. 2022. Т. 17. № 1. С. 156–170. doi: [10.17537/2022.17.156](https://doi.org/10.17537/2022.17.156)
21. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 1. URL: <http://algology.ru/1097> (дата обращения: 20.03.2024).
 22. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н., Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis*. *Биология моря*. 1979. Т. 51. С. 41–46.
 23. Merzlyak M.N., Naqvi K.R. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *anabaena variabilis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*. 2000. V. 58. P. 123–129. doi: [10.1016/s1011-1344\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(00)00114-7)
 24. Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Лелеков А.С. Разделение спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. в красной области. *Вопросы современной альгологии*. 2022. № 1. С. 25–34. doi: [10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-25-34](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-25-34)
 25. Minkevich I.G., Fursova P.V., Tjorlova L.D., Tsygankov A.A., Riznichenko G.Yu. The stoichiometry and energetics of oxygenic phototrophic growth. *Photosyn. Res.* 2013. V. 116. P. 55–78. doi: [10.1007/s11120-013-9896-0](https://doi.org/10.1007/s11120-013-9896-0)
 26. Edmundson S., Huesemann M. The dark side of algae cultivation: characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. *Algal Res.* 2015. V. 12. P. 470–476. doi: [10.1016/j.algal.2015.10.012](https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.012)
 27. Abiusi F., Wijffels R.H., Janssen M. Oxygen balanced mixotrophy under day-night cycles. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2020. V. 8. No 31. P. 11682–11691. doi: [10.1021/acssuschemeng.0c03216](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03216)
 28. Gorbunova S.Yu., Avsiyan A.L. Diurnal dynamics of green microalga *Tetraselmis viridis* culture density in open pond monitored by optical density sensor. *Biores. Technol. Rep.* 2022. V. 20. Article No. 101251. doi: [10.1016/j.biteb.2022.101251](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101251)
 29. Kobayashi M., Watanabe T., Nakazato M., Ikegami I., Hiyama T., Matsunaga T., Murata N. Chlorophyll *a*/P-700 and pheophytin *a*/P-680 stoichiometries in higher plants and cyanobacteria determined by HPLC analysis. *Bioch. Bioph. Acta – Bioenergetics*. 1988. V. 936. No. 1. P. 81–89. doi: [10.1016/0005-2728\(88\)90254-x](https://doi.org/10.1016/0005-2728(88)90254-x)
 30. Barlow R.G., Gosselin M., Legendre L., Therriault J.-C., Demers S., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A. Photoadaptive strategies in sea-ice microalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1988. V. 45. P 145–152.
 31. Yarnold J.E. *Photosynthesis of microalgae in outdoor mass cultures and modelling its effects on biomass productivity for fuels, feeds and chemicals*: PhD Thesis, Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, 2016. 178 p. doi: [10.14264/uql.2016.536](https://doi.org/10.14264/uql.2016.536)
 32. Wang Y., Zhong Z., Qin S., Li J., Li J., Liu Z. Effects of temperature and light on growth rate and photosynthetic characteristics of *Sargassum horneri*. *J. Ocean Univ. China*. 2021. V. 20. P. 101–110. doi: [10.1007/s11802-021-4507-8](https://doi.org/10.1007/s11802-021-4507-8)
 33. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. *Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей*. Новосибирск: Наука, 1980. 136 с.
 34. Saxena Yu., Padmnabhan P. Improvements in conventional modeling practices for effective simulation and understanding of microalgal growth in photobioreactors: an experimental study. *Biotech. Bioproc. Eng.* 2021. doi: [10.1007/s12257-020-0293-1](https://doi.org/10.1007/s12257-020-0293-1)
 35. Тренкеншу Р.П. *Кинетика субстратзависимых реакций при различной организации метаболических систем*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. 89 с.

36. Falkowski P.G., Owens T.G. Light-shade adaptation: two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.* 1980. V. 66. P. 592–595.
37. Pniewski F, Piasecka-Jedrzejak I. Photoacclimation to constant and changing light conditions in a benthic diatom. *Front. Mar. Sci.* 2020. V. 7. doi: [10.3389/fmars.2020.00381](https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00381)
38. Smith B.M., Morrissey P.J., Guenther J.E., Nemson J.A., Harrison M.A., Allen J.F., Melis A. Response of the photosynthetic apparatus in *Dunaliella salina* (green algae) to irradiance stress. *Plant Physiol.* 1990. V. 93. No. 4. P. 1433–40. doi: [10.1104/pp.93.4.1433](https://doi.org/10.1104/pp.93.4.1433)

Рукопись поступила в редакцию 09.04.2024, переработанный вариант поступил 03.06.2024.

Дата опубликования 10.06.2024.

===== MATHEMATICAL MODELING =====

Modeling Growth and Photoadaptation of *Porphyridium purpureum* Batch Culture

Lelekov A.S.¹, Klochkova V.S.²

¹A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Russia

²The Sevastopol State University, Department of Physics, Sevastopol, Russia

Abstract. The work focuses on mathematical modeling of linear growth marine red algae *Porphyridium purpureum* batch culture under various surface irradiation. Before starting the batch culture *P. purpureum* was maintained for 3–5 days in turbidostat, which allowed the culture to adapt to a given light intensity. On each batch curve the maximum specific growth rate and maximum productivity are determined by approximating the exponential and linear growth phases with the appropriate equations. It is taken into account that at the beginning of the linear growth phase the integral light absorption coefficient, calculated from the true absorption spectrum in PAR range, exceeded 50 %. It is shown that with light intensity increase from 15 to 227 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ the maximum specific growth rate increased from 0.31 to 1 day^{-1} , the maximum productivity increased from 1.32 to 16.38 $\text{g DW m}^{-2}\cdot\text{day}^{-1}$. Mathematical modeling of the linear growth of *P. purpureum* batch culture have showed that at any light intensity the specific growth rate is determined by the surface illumination, the light absorption coefficient and chlorophyll *a* concentration. The concept of reduced irradiation – the amount of absorbed light energy per chlorophyll *a* – was introduced. A linear dependence of the specific growth rate on reduced irradiation is given. The tangent of the angle of line slope is determined by the organization of the key multi-enzyme complex («metabolism bottleneck»). Parameters of this complex depend on the cells photoadaptation degree. For the first time a quantitative relationship between multi-enzyme complex parameters, light intensity and the chlorophyll/P700 ratio was established.

Key words: microalgae, specific growth rate, chlorophyll *a*, productivity, reduced irradiance, photosynthetic unit size.