

УДК 593.161.42:57.086.83

**ОПЫТ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ
TISOCHRYSIS LUTEA (НАРТОФУТА)
В УСЛОВИЯХ БИОРЕАКТОРА LABFORS
ДЛЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ КАРОТИНОИДОВ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ**

© 2024 г. **Ж. В. Маркина, А. А. Зинов, Т. Ю. Орлова**

Национальный научный центр морской биологии имени А. В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток, Российская Федерация
E-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 08.07.2022; после доработки 06.09.2022;
принята к публикации 09.10.2023; опубликована онлайн 22.03.2024.

Приведены результаты эксперимента по использованию биореактора панельного типа Labfors 5 Lux LED flat panel (Infors HT, Швейцария) для культивирования *Tisochrysis lutea* (Haptophyta). В ходе трёхнедельного исследования оценивали рост и размерную структуру популяции микроводоросли, содержание хлорофилла *a*, каротиноидов и нейтральных липидов. Максимальная численность клеток, $5,3 \times 10^4$ кл.·мл⁻¹, зафиксирована к концу эксперимента, на 21-е сутки. Увеличение доли клеток размером 4–6 мкм регистрировали на 11-е сутки опыта. Наибольшее накопление каротиноидов происходило на 18-е сутки эксперимента (3,3 мг·л⁻¹), нейтральных липидов (флуоресценция Nile Red составляла $5,3 \times 10^6$) — на 14–21-е сутки. Выявлено, что биореактор панельного типа Labfors 5 может быть успешно использован для культивирования микроводоросли *T. lutea*.

Ключевые слова: *Tisochrysis lutea*, биотехнология, биореактор, каротиноиды, нейтральные липиды

Tisochrysis lutea Bendif & Probert, 2013 (Haptophyta) на протяжении долгого времени занимает одно из ведущих мест в биотехнологии водорослей в качестве кормового объекта для личинок беспозвоночных [Alkhamis, Qin, 2016; Araújo et al., 2020]. Этот вид является самым перспективным продуцентом преобладающего в нём каротиноида фукоксантина — до 98 % от общего содержания каротиноидов [Mohamadnia et al., 2021]. Также *T. lutea* — важнейший продуцент нейтральных липидов. Разработка условий выращивания культуры в биореакторах является базой для биотехнологических процессов, что особенно актуально для *T. lutea* [Mohamadnia et al., 2021].

Данный вид для целей биотехнологии выращивают, в частности, в колбах [Mohamadnia et al., 2020], однако чаще — в биореакторах [Falinski et al., 2018; Gao et al., 2020; Ippoliti et al., 2016; Leal et al., 2020].

К настоящему времени разработаны разные модификации биореакторов. Одними из наиболее удобных для культивирования микроводорослей являются панельные биореакторы. Их достоинства — хорошее перемешивание суспензии водорослей, большая площадь освещаемой поверхности и низкое накопление кислорода в среде, что обеспечивает более интенсивный рост микроводорослей [Guedes, Malcata, 2011; Tan et al., 2020].

В качестве источника освещения используют не только флуоресцентные лампы, но и светодиоды (light-emitting diodes, LED). Преимущества LED-освещения — низкая энергия потребления, очень низкое выделение тепла при работе, стабильность светового потока, долгий срок службы, неизменность параметров светового потока со временем при регулярных циклах включения-выключения [Posten, 2009].

Цель работы заключалась в изучении динамики роста популяции, содержания каротиноидов и нейтральных липидов у *Tisochrysis lutea*, штамм MBRU_Tiso-08, в панельном биореакторе Labfors 5 Lux LED flat panel (Infors HT, Швейцария), который впервые был использован для выращивания микроводорослей.

Основными определяемыми показателями в исследовании были численность клеток и размерная структура популяции *T. lutea*, а также содержание каротиноидов и нейтральных липидов в биомассе этого вида как веществ, представляющих интерес для биотехнологии. Значения показателей оптической плотности, полученные разными способами, являлись дополнительными индикаторами, предлагаемыми для экспресс-оценки численности *T. lutea*. Хлорофилл *a* в данной работе анализировали для более полного описания физиологических процессов микроводоросли.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила культура одноклеточной водоросли *T. lutea* (Haptophyta) — штамм MBRU_Tiso-08 из коллекции микроводорослей ресурсного центра «Морской биобанк» ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>). Водоросль была выращена на среде *f* [Guillard, Ryther, 1962], приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды солёностью 32 ‰ в биореакторе Labfors 5 в режиме накопительной культуры. Температура воды составляла +20 °С, интенсивность света — 50 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ (источником освещения была LED-панель) в диапазоне фотосинтетически активной радиации. Свето-темновой период — 12 ч : 12 ч (свет : темнота), подача воздуха — 0,2 л·мин⁻¹. Объём колбы биореактора — 1,8 л, толщина слоя суспензии в панели — 45 мм. Материалом рабочей колбы биореактора Labfors 5 является карбонатное стекло. Оно обладает самой высокой проницаемостью для света (95 %) среди всех материалов для содержания водорослей и высокой химической устойчивостью, его можно стерилизовать. Оно нерастяжимо, в отличие от полиэтилена и полипропилена, и не пропускает ультрафиолетовое излучение, как поликарбонатное стекло [Guedes, Malcata, 2011].

В качестве инокулята использовали культуру на экспоненциальной стадии роста. Начальная концентрация клеток микроводоросли в опыте составляла $0,75 \times 10^6$ кл·мл⁻¹. Продолжительность эксперимента — 21 сут.

Измерения численности клеток и их диаметра, а также определение содержания нейтральных липидов проведены на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа записано 10 000 событий (регистрируемых в пробе частиц) в течение каждого измерения. Выбор клеток водорослей из общего числа событий, регистрируемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a* [Hyka et al., 2013], определяемой на канале PC5.5. Диаметр клеток устанавливали с помощью калибровочных бусин (Molecular Probes, США) по показателю прямого светорассеяния.

Оптическую плотность (OD₇₅₀) определяли на мультимодальном планшетном ридере Spark 10M (Tecan).

В колбе биореактора Labfors 5 оптическую плотность (optical density, OD) устанавливали с помощью датчика Dencytee (Hamilton), который обеспечивает измерения OD клеточной суспензии в реальном времени.

Содержание хлорофилла *a* и суммарное содержание каротиноидов определяли стандартным методом их экстракции в ацетоне с последующим измерением оптической плотности на мульти-модальном планшетном ридере Spark 10M. Расчёт концентраций пигментов проводили по стандартным формулам [Jeffrey, Humphrey, 1975].

Содержание нейтральных липидов устанавливали по флуоресценции флуорохрома Nile Red (N3013-100MG, Sigma-Aldrich) в концентрации $1 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$, окрашивание проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Длина волны возбуждения — 488 нм, испускания — 580 нм. Установление содержания липидов методом проточной цитометрии имеет преимущества в скорости определения, и его данные соответствуют таковым, полученным с помощью других методов, что подтверждено на разных представителях микроводорослей [Alemán-Nava et al., 2016].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность клеток *T. lutea* возрастала с увеличением времени экспозиции до конца эксперимента (рис. 1). Количество клеток коррелировало с данными оптической плотности, полученными разными методами — спектрофотометрическим (OD_{750}) и с помощью датчика биореактора по изменению мутности клеточной взвеси (см. рис. 1). В суспензии преобладали клетки размером 4–6 мкм, особенно с 11-х суток. Данный факт необходимо учитывать при составлении рациона кормления личинок беспозвоночных на разных этапах их развития.

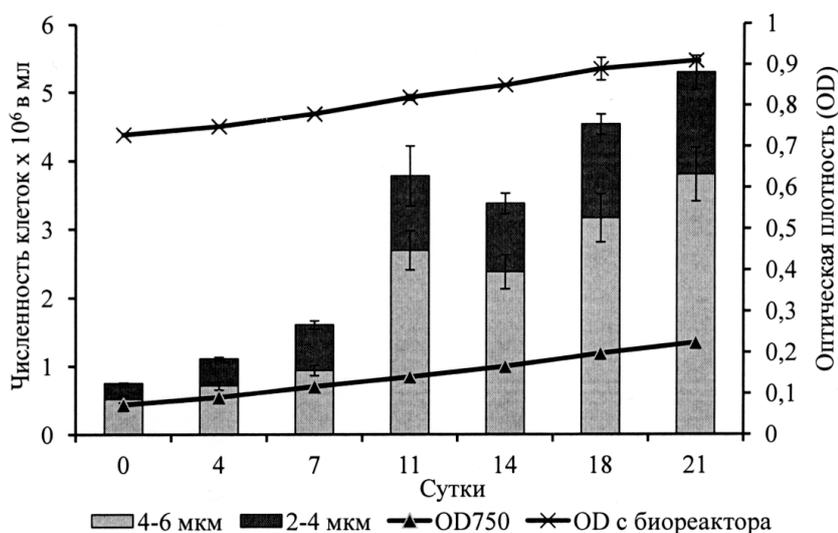


Рис. 1. Численность клеток ($\times 10^6 \text{ кл.}\cdot\text{мл}^{-1}$) и оптическая плотность (OD) культуры *Tisochrysis lutea*
Fig. 1. Cell abundance ($\times 10^6 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) and optical density (OD) of *Tisochrysis lutea* culture

Сходная динамика роста описана и для *T. lutea* CCAP 927/14: у этого штамма также зафиксировано увеличение размеров клеток. Авторы объясняют данный факт более высокими темпами деления клеток в начале эксперимента [Costa et al., 2017]. В работе [Rasdi, Qin, 2015] отмечен выход культуры (клон *Tisochrysis* не указан) на стационарную фазу роста на 6-е сутки опыта. У *T. lutea* из коллекции Roscoff (Франция) культура на 7-е сутки эксперимента переходила в стационарную фазу роста, а на 21-е — в фазу отмирания [Gnouma et al., 2017].

В цилиндрическом реакторе численность клеток *T. lutea* при исходной концентрации $0,4 \times 10^6 \text{ кл.}\cdot\text{мл}^{-1}$ через 14 сут составляла только $0,45 \times 10^6 \text{ кл.}\cdot\text{мл}^{-1}$ [Falinski et al., 2018]. Максимальная численность клеток в биореакторе объёмом 500 л была достигнута через 12 сут

опыта — $6,92 \times 10^6$ кл.·мл⁻¹ при начальной $0,2 \times 10^6$ кл.·мл⁻¹ [Leal et al., 2020]. Количество клеток *T. lutea*, выращенной в колбах, было выше, чем таковое микроводоросли в реакторах, и составляло $4,3 \times 10^8$ кл.·мл⁻¹ через 4 сут [Mohamadnia et al., 2020] при начальной концентрации $1,2 \times 10^7$ кл.·мл⁻¹. Между тем в нашем эксперименте через 4 сут численность клеток достигала $1,1 \times 10^6$ кл.·мл⁻¹ при начальной $0,75 \times 10^6$ кл.·мл⁻¹. Однако биореакторы позволяют выращивать микроводоросли в большем объёме, что является их важным преимуществом.

Содержание фотосинтетических пигментов *T. lutea* увеличивалось незначительно в течение 14 сут (рис. 2). На 18-е сутки отмечено их резкое возрастание, при этом содержание каротиноидов стало выше, чем концентрация хлорофилла *a*.

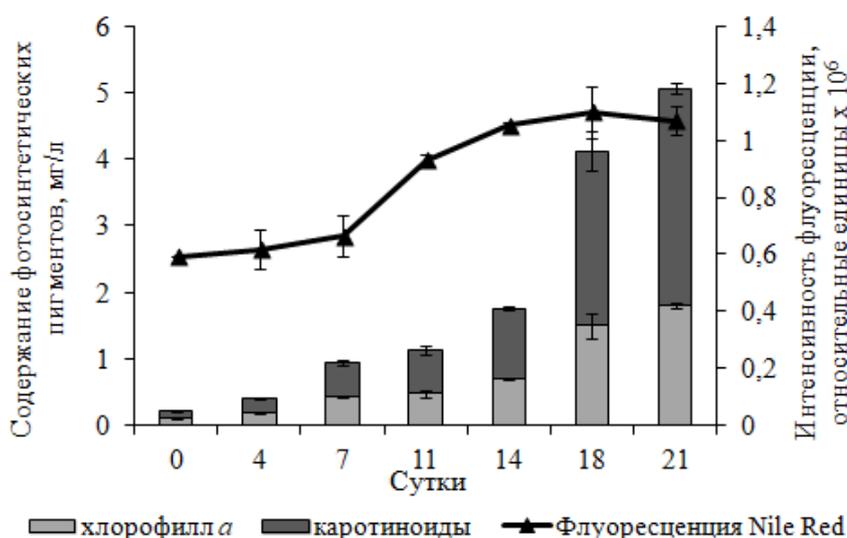


Рис. 2. Содержание фотосинтетических пигментов и нейтральных липидов (по флуоресценции Nile Red) у *Tisochrysis lutea*

Fig. 2. Content of photosynthetic pigments and neutral lipids (Nile Red fluorescence) in *Tisochrysis lutea*

Снижение концентрации хлорофилла *a* связано с уменьшением содержания азота в течение культивирования, в результате чего в клетках водорослей падает количество ферментов, необходимое для синтеза хлорофилла [Costa et al., 2017]. К 21-м суткам содержание пигментов продолжало увеличиваться, но менее интенсивно. Содержание фотосинтетических пигментов зависит от условий выращивания микроводоросли, а также от особенностей её физиологии. Например, у *T. lutea* ССМР 1324 при таких же условиях культивирования, как и в настоящей работе, в миксотрофной культуре зарегистрировано 4500 мкг хлорофилла *a* в расчёте на 1 л на 16-е сутки эксперимента, а в гетеротрофной — 5200 мкг·л⁻¹ [Hu et al., 2018].

Содержание нейтральных липидов до 7-х суток увеличивалось слабо, показатель значимо возрастал с 7-х по 14-е сутки, после чего оставался на одном уровне (см. рис. 2). Увеличение содержания нейтральных липидов с возрастом культуры описано и в других работах [Costa et al., 2017; Huang et al., 2019]. Необходимо отметить, что у большинства водорослей запасными нейтральными липидами являются триацилглицериды, в то время как у *T. lutea*, как и у других представителей семейства Isochrysidaceae, — алкеноны [Costa et al., 2017].

Подбор методов исследования является краеугольным камнем научной работы, а важнейшими критериями выступают точность и обеспечение достоверности получаемых результатов. При оценке состояния культуры микроводоросли в рутинных биотехнологических процессах к перечисленным критериям добавляется скорость выполнения анализа. Полученные нами

данные демонстрируют, что показатели оптической плотности могут быть применены для оценки динамики роста популяции *T. lutea*. Также ранее на *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890 было выявлено, что на стадиях лаг-фазы и экспоненциальной фазы роста OD_{750} коррелирует с численностью клеток, полученной методом проточной цитометрии и путём их прямого учёта под световым микроскопом в счётной камере, однако световая микроскопия является более точной [Chioccioli et al., 2014].

Полученные данные показали, что биореактор панельного типа Labfors 5 может быть успешно использован для культивирования микроводоросли *Tisochrysis lutea*.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦМБ ДВО РАН «Динамика морских экосистем, адаптации морских организмов и сообществ к изменениям среды обитания» (№ гос. регистрации 121082600038-3) и при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-30004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Alemán-Nava G. S., Cuellar-Bermudez S. P., Cuaresma M., Bosma R., Muylaert K., Ritmann B. E., Parra R. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, vol. 128, pp. 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.011>
2. Alkhamis Y., Qin J. G. Comparison of pigment and proximate compositions of *Tisochrysis lutea* in phototrophic and mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology*, 2016, vol. 28, iss. 1, pp. 35–42. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0599-0>
3. Araújo R., Vázquez Calderón F., Sánchez López J., Azevedo I. C., Bruhn A., Fluch S., Garcia Tasende M., Ghaderiardakani F., Ilmjärv T., Laurans M., Mac Monagail M., Mangini S., Peteiro C., Rebours C., Stefansson T., Ullmann J. Current status of the algae production industry in Europe: An emerging sector of the blue bioeconomy. *Frontiers in Marine Science*, 2020, vol. 7, art no. 626389 (24 p.). <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.626389>
4. Gao F., Teles I., Wijffels R. H., Barbosa M. J. Process optimization of fucoxanthin production with *Tisochrysis lutea*. *Bioresource Technology*, 2020, vol. 315, art. no. 123894 (8 p.). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123894>
5. Guedes A. C., Malcata F. Bioreactors for microalgae: A review of designs, features and applications. In: *Bioreactors: Design, Properties and Applications* / P. G. Antolli, Z. Liu (Eds). New-York : Nova Scientist Publishers, Inc., 2011, pp. 1–52.
6. Costa F. D., Le Grand F., Quéré C., Bougaran G., Cadoret J. P., Robert R., Soudant P. Effects of growth phase and nitrogen limitation on biochemical composition of two strains of *Tisochrysis lutea*. *Algal Research–Biomass, Biofuels and Bioproducts*, 2017, vol. 27, pp. 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.003>
7. Chioccioli M., Hankamer B., Ross I. L. Flow cytometry pulse width data enables rapid and sensitive estimation of biomass dry weight in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 5, art. no. e97269 (12 p.). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097269>
8. Gnouma A., Sadovskaya I., Souissi A., Sebai K., Medhioub A., Grard T., Souissi S. Changes in fatty acids profile, monosaccharide profile and protein content during batch growth of *Isochrysis galbana* (T.iso). *Aquaculture Research*, 2017, vol. 48, iss. 9, pp. 4982–4990. <https://doi.org/10.1111/are.13316>
9. Guillard R. R. L., Ryther J. H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, vol. 8, no. 2, pp. 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
10. Falinski K. A., Timmons M. B., Callan C., Laidley C. Response of *Tisochrysis lutea* [Prymnesiophycidae] to aeration conditions in a bench-scale photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 2018, vol. 30, iss. 4, pp. 2203–2214. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1453-y>
11. Hyka P., Lickova S., Přibyl P., Melzoch K., Kovar K. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances*, 2013, vol. 31, iss. 1, pp. 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.007>
12. Hu H., Ma L. L., Shen X. F., Wang H. F., Zeng R. J.

- Effect of cultivation mode on the production of docosahexaenoic acid by *Tisochrysis lutea*. *AMB Express*, 2018, vol. 8, art. no. 50 (12 p.). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0580-9>
13. Huang B., Marchand J., Thiriet-Rupert S., Carrier G., Saint-Jean B., Lukomska E., Moreau B., Morant-Manceau A., Bougaran G., Mimouni V. Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta). *Algal Research–Biomass, Biofuels and Bioproducts*, 2019, vol. 40, art. no. 101506 (15 p.). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101506>
 14. Ippoliti D., González A., Martín I., Sevilla J. M. F., Pistocchi R., Acién F. G. Outdoor production of *Tisochrysis lutea* in pilot-scale tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 2016, vol. 28, iss. 6, pp. 3159–3166. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0856-x>
 15. Jeffrey S. W., Humphrey G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 1975, vol. 167, iss. 2, pp. 191–194. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)
 16. Leal E., de Beyer L., O'Connor W., Dove M., Ralph P. J., Pernice M. Production optimization of *Tisochrysis lutea* as a live feed for juvenile Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*, using large-scale photobioreactors. *Aquaculture*, 2020, vol. 533, art. no. 736077 (9 p.). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736077>
 17. Mohamadnia S., Tavakoli O., Faramarzi M. A. Enhancing production of fucoxanthin by the optimization of culture media of the microalga *Tisochrysis lutea*. *Aquaculture*, 2021, vol. 533, art. no. 736074 (10 p.). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736074>
 18. Mohamadnia S., Tavakoli O., Faramarzi M. A., Shamsollahi Z. Production of fucoxanthin by the microalga *Tisochrysis lutea*: A review of recent developments. *Aquaculture*, 2020, vol. 516, art. no. 734637 (10 p.). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734637>
 19. Posten C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 2009, vol. 9, iss. 3, pp. 165–177. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>
 20. Rasdi N. W., Qin J. G. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 2015, vol. 27, iss. 6, pp. 2221–2230. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0495-z>
 21. Tan J. S., Lee S. Y., Chew K. W., Lam M. K., Lim J. W., Ho S. H., Show P. L. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, 2020, vol. 11, iss. 1, pp. 116–129. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1711626>

**EXPERIENCE OF GROWING THE MICROALGA
TISOCHRYSIS LUTEA (HAPTOPHYTA)
UNDER CONDITIONS OF A LABFORS BIOREACTOR
FOR THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS AND NEUTRAL LIPIDS**

Zh. Markina, A. Zinoy, and T. Orlova

A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation
E-mail: zhannav@mail.ru

The results of the experiment on the use of a Labfors 5 Lux LED flat panel bioreactor (Infors HT, Switzerland) for *Tisochrysis lutea* (Haptophyta) cultivation are presented. During the three-week study, growth and size structure of the microalga population were assessed, and the content of chlorophyll *a*, carotenoids, and neutral lipids was estimated. The highest cell abundance, 5.3×10^4 cells·mL⁻¹, was recorded at the end of the experiment, on the 21st day. An increase in the proportion of 4–6-μm cells was registered on the 11th day. The maximum accumulation of carotenoids occurred on the 18th day (3.3 mg·L⁻¹), and neutral lipids (Nile Red fluorescence was of 5.3×10^6), on the 14th–21st day. As revealed, Labfors 5 Lux LED flat panel bioreactor can be successfully used for cultivation of the microalga *T. lutea*.

Keywords: *Tisochrysis lutea*, biotechnology, bioreactor, carotenoids, neutral lipids