

PARTICULAR QUALITIES THE EFFECT OF GLYCINE ON THE GROWTH OF THE MICROALGAE SPIRULINA PLATENSIS (GOM.) GEITL

A. Kotinskyi, A. Saliuk, G. Batishcheva
National University of Food Technologies

Key words:

Spirulina glycine
Accumulation of biomass
Fragmentation trichomes

Article history:

Received 14.11.2013
Received in revised form
29.11.2013
Accepted 15.12.2013

Corresponding author:

A. Kotinskyi
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

Spirulina is able to use some exogenous organic matters under certain conditions. We conducted a study of the effect of glycine as an organic source of nitrogen and carbon on the growth of Spirulina. According to the results of our study we determined that bringing glycine in a culture medium leads to the intensification of spirulina's growth. In the process of our study it was proved that the biggest accumulation of biomass (up to 2.1 g of dry matter/l) can be achieved by bringing glycine in the culture medium at concentration of 100-150 mg/l with the density of culture of approximately 1.0 g of dry matter/l. It is proved that glycine provides fragmentation of microalgae's trichomes. The intensity of fragmentation in this case depends on concentration of dispensed glycine and on the phase of culture's growth. Fragmentation of trichomes leads to intensification of spirulina reproduction process and, as a result, to the increase of its production capacity due to increasing number of trichomes with the small quantity of cells which grow fast. Dispersion of glycine gives the possibility to increase the rate of spirulina's growth and to receive high density of culture even when the biomass of spirulina stops increasing.

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ГЛІЦИНУ НА РІСТ МІКРОВОДОРОСТІ SPIRULINA PLATENSIS (GOM.) GEITL

А.В. Котинський, А.І. Салюк, Г.С. Батіщева
Національний університет харчових технологій

У статті визначено вплив екзогенно внесеного у культуральне середовище гліцину на ріст мікроводорості Spirulina platensis (Gom.) Geitl. Відмічено збільшення продуктивності мікроводорості за біомасою. Екзогенно внесений гліцин призводить до фрагментації трихом мікроводорості, ступінь інтенсивності якої залежить як від концентрації внесеного гліцину, так і від стадії розвитку культури.

Ключові слова: спіруліна, гліцин, накопичення біомаси, фрагментація трихом.

Деякі синьо-зелені водорості здатні використовувати на світлі органічні джерела вуглецю і азоту [1—5]. Ця фізіологічна особливість видів *Cyanoophyta*, як і фототрофних бактерій, у різних представників водоростей виражена неоднаково, тобто ступінь її прояву може бути різним.

Супутня мікрофлора, яка є обов'язковим симбіонтом синьо-зелених водоростей, розкладає органічні речовини, які потрапляють у середовище культивування або в результаті метаболічних процесів самої мікроводорості або внесених екзогенно. Внаслідок цього утворюються продукти розкладу, які мікроводорості можуть споживати.

Серед мікроводоростей особливе місце займає синьо-зелена мікроводорість *Spirulina platensis* (далі спіруліна), яка порівняно з іншими мікроводоростями має низку переваг, і тому розглядається як найбільш перспективний біотехнологічний об'єкт [6—7].

Ряд особливих речовин (біопротекторів, біокоректорів і біостимуляторів), що містяться в спіруліні, не зустрічається більше в жодному продукті натурального походження. Це обумовлює особливі властивості спіруліни як продукту харчування і лікувально-профілактичного засобу широкого спектру дії [8—11].

Оскільки спіруліна є багатим джерелом біологічно активних речовин, актуальним є пошук нових стимуляторів для підвищення її продуктивності й покращення якості біомаси.

Основними елементами живлення, що впливають на інтенсивність росту спіруліни, є азот, фосфор і вуглець. Оскільки амінокислоти можуть виступати одночасно джерелом вуглецю й азоту, нами було проведено дослідження впливу та механізму дії гліцину як найбільш простої амінокислоти на ріст спіруліни.

Мета роботи: вивчення впливу гліцину як екзогенно внесеного органічного джерела вуглецю й азоту на інтенсивність росту спіруліни.

Для досліджень використовували культуру ціанобактерії *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl. штам ЛГУ-603, яку взято з колекції культур Інституту ботаніки ім. Холодного НАН України.

Процес культивування проводили на живильному середовищі Зарука у вертикальній трубчастій установці діаметром 8 см і об'ємом 2 л при постійному перемішуванні культурального середовища повітрям.

Освітленість культури на поверхні установки підтримували на рівні 8 кЛк, тривалість фотоперіоду складала 12 годин на добу. Як джерело освітлення використовували ртутні лампи ДРЛ-400. Температуру культурального середовища підтримували в межах від 30 до 32°C. Початкова густина культури (приблизно 0,15 г сух. реч./л) відповідає оптичній густині при довжині хвилі 750 нм (0,45—0,47). Випаровування рідини з культиватора компенсували кожної доби додаванням дистильованої води. Дистильовану воду додавали перед відбором проб.

Внесення різних концентрацій гліцину (50, 100, 150, 200, 250 та 300 мг/л) проводили через дві, чотири, сім і десять діб від початку культивування. Враховуючи стабільність умов культивування за освітленістю, фотоперіодом,

температурою та інтенсивністю перемішування суспензії повітрям, внесення гліцину відбувалось за певної густини культури (табл.).

Таблиця. Умови внесення гліцину

Фаза росту	Час внесення гліцину, діб від початку культивування	Оптична густина культурального середовища в момент внесення гліцину, при $\lambda=750$ нм	Густина культури на момент внесення гліцину, г сух. реч./л
Експоненційна фаза	2	1,1	0,4
Фаза лінійного росту	4	2,2	0,7
Фаза уповільнення росту	7	3,4	1,0
Стационарна фаза	10	3,7	1,2

Результати, представлені у таблицях і графіках, являють собою середнє арифметичне значення трьох повторних дослідів.

Кожної доби проводили фотомікроскопіювання культури для виявлення реакції спіруліни на внесення гліцину.

Приріст біомаси визначали фотометричним методом за зміною оптичної густини суспензії при довжині хвилі 750 нм. Перерахунок одиниць оптичної густини на величину сухої біомаси здійснювали за калібрувальним графіком. Відбір проб для визначення густини культури проводили кожної доби на момент включення світла після темної фази культивування. У процесі досліджень визначали суху біомасу та вологість продукту за допомогою вагового методу [12].

Згідно з отриманими результатами досліджень впливу різних концентрацій гліцину, внесеного на різних фазах росту, на накопичення біомаси спіруліною (рис. 1) було визначено, що збільшення концентрації гліцину до певного значення призводить до інтенсифікації росту культури. Ця концентрація в усіх випадках залежала від того, за якої густини культури вносився гліцин.

Так, при внесенні гліцину через дві доби від початку культивування, тобто при густині культури 0,4 г сух. реч./л, найбільш інтенсивне накопичення біомаси (1,7 г сух. реч./л) відбувається при збільшенні концентрації гліцину до 50 мг/л. Подальше збільшення концентрації гліцину призводить до зменшення продуктивності культури за біомасою.

При внесенні гліцину через чотири доби від початку культивування, тобто при густині культури 0,7 г сух. реч./л, концентрація біомаси збільшується із збільшенням концентрації гліцину до 100 мг/л. При цій концентрації гліцину накопичення біомаси становить 1,88 г сух. реч./л, що перевищує контроль на 36%. Більші концентрації гліцину знижують інтенсивність росту спіруліни.

Найбільш інтенсивний ріст спіруліни відбувається при внесенні гліцину через 7 днів від початку культивування, тобто при густині культури 1,0 г сух. реч./л. При цьому досягається найбільше накопичення біомаси спіруліни серед усіх досліджених режимів внесення гліцину — 2,11 г сух. реч./л, при внесенні гліцину у концентрації 150 мг/л, що на 53% більше, ніж у контролі.

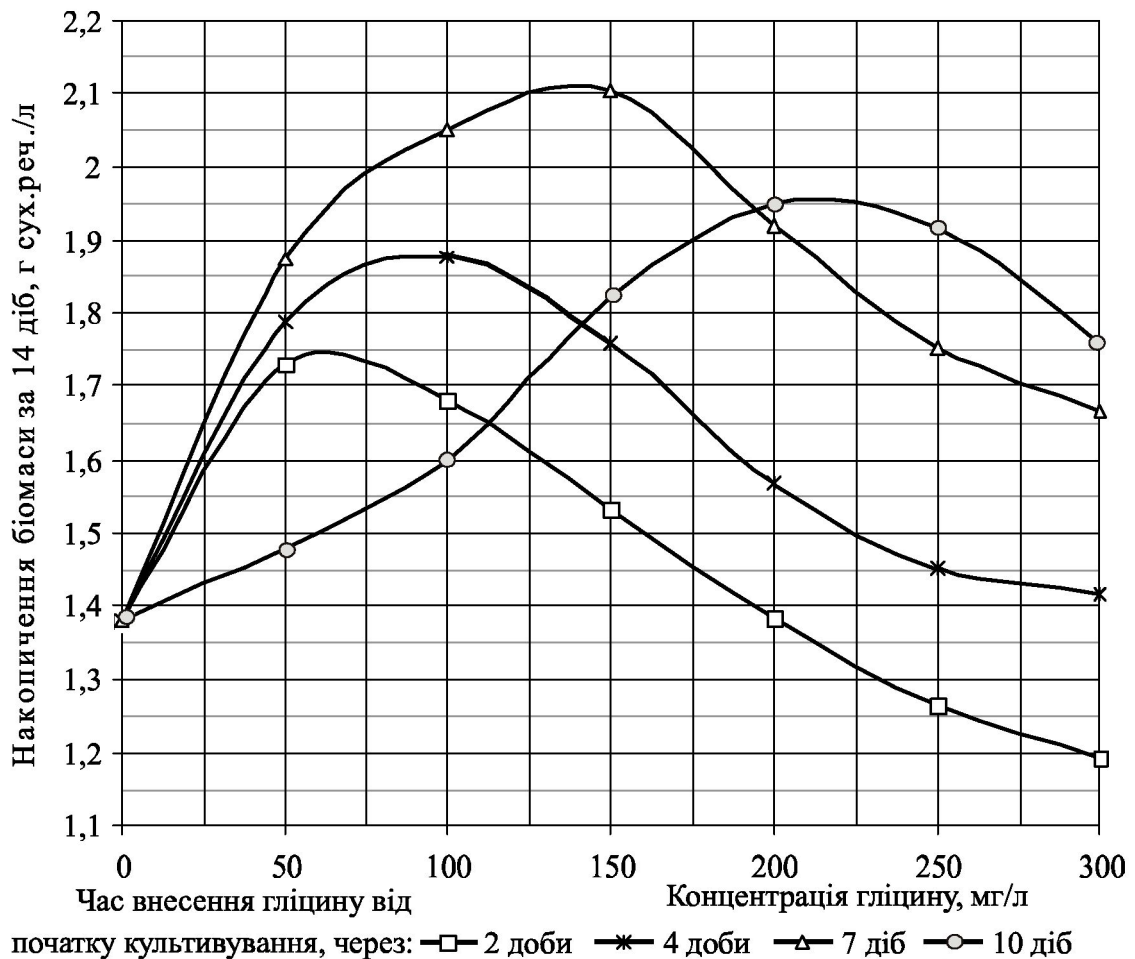


Рис. 1. Вплив гліцину на накопичення біомаси спіруліни (залежно від часу його внесення)

Внесення гліцину через десять діб від початку культивування (при густині культури 1,2 г сух. реч./л) виявило деякі особливості впливу цієї амінокислоти на ріст спіруліни.

Так, збільшення концентрації гліцину до 50-100 мг/л супроводжується повільним накопиченням біомаси, проте збільшення концентрації гліцину до 150—200 мг/л сприяло більш інтенсивному росту спіруліни. Найбільше накопичення біомаси — 1,92—1,95 г сух. реч./л — спостерігається при досить високих концентраціях гліцину — 200—250 мг/л, що перевищує контроль на 40%.

Отже, чим більша густина культури, тим більшу концентрацію гліцину потрібно вносити, щоб отримати найбільшу продуктивність культури за біомасою. При цьому високі концентрації гліцину, внесені на ранніх фазах росту спіруліни, призводять до зменшення продуктивності культури.

Як відомо, у старіючої культури спіруліни фрагментація трихом відбувається рідко, вони поступово випрямляються і довшають. У результаті швидкість росту спіруліни зменшується.

Результати фотомікроскопіювання показали, що після внесення гліцину відбувається інтенсивна фрагментація трихом мікрowodорості, з'являється певна кількість окремих фрагментів трихом — гормогоній, що складаються з невеликої кількості клітин.

Чим більше вносили у середовище культивування гліцину, тим більше утворювалось трихом з невеликою кількістю клітин і, відповідно, інтенсивно-

вніше відбувалась фрагментація (рис. 2). Інтенсивна фрагментація трихом призводила до інтенсифікації процесу розмноження культури і, відповідно, до збільшення швидкості її росту і продуктивності.

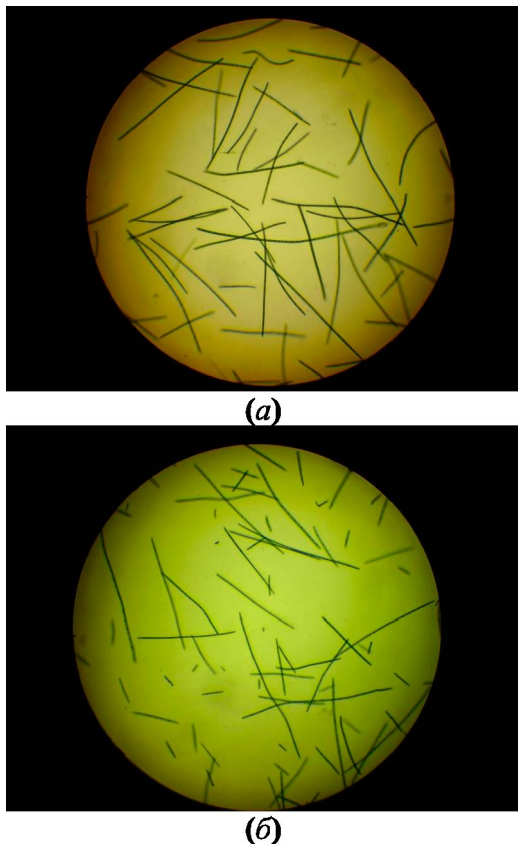


Рис. 2. Культура мікрободорості до (а) і через 2 доби після (б) внесення гліцину у культуральне середовище

За результатами мікроскопіювання було виявлено, що протягом першої доби після внесення гліцину спіруліна не виявляє жодної реакції на гліцин, а інтенсивна фрагментація трихом мікрободорості розпочинається приблизно через 1,5—2 доби після внесення гліцину.

Аналізуючи динаміку росту спіруліни залежно від того, за якої густини культури вноситься гліцин (рис. 3), було відмічено, що після його внесення ріст спіруліни на деякий час гальмується, вона переходить з більш інтенсивної фази росту на менш інтенсивну (лаг-фазу), тривалість якої залежить як від концентрації внесеного гліцину, так і від фази росту, на якій був внесений гліцин. Через деякий час після внесення гліцину інтенсивність росту спіруліни поступово збільшується, спіруліна продовжує розвиватися згідно з наступними фазами типового розвитку.

Високі концентрації гліцину призводять до надмірної фрагментації трихом, особливо на ранніх фазах росту спіруліни, в результаті чого швидкість росту культури знижується. Спіруліна більш тривалий час пристосовується до високих концентрацій гліцину, оскільки з'являється нова лаг-фаза, тривалість якої залежить від концентрації гліцину.

На більш пізніх фазах росту, навпаки, внесення високих концентрацій гліцину сприяє збільшенню продуктивності культури. Так, на експоненційній фазі росту оптимальною концентрацією внесеного гліцину, при якій відбувається найбільш інтенсивний ріст спіруліни, є 50 мг/л, на фазі лінійного росту — 100 мг/л, на фазі уповільнення росту — 150 мг/л, на стаціонарній фазі — 200—250 мг/л.

Порівнюючи криві росту спіруліни, що вирощувалась без гліцину (контроль) та з гліцином (рис. 3), можна відмітити, що спіруліна, яка вирощується без гліцину, через 10 діб виходить на фазу відмирання, тоді як спіруліна, що вирощується з додаванням гліцину, продовжує накопичувати біомасу.

Так, на рис. 3 можна побачити, що гліцин, внесений через чотири, сім і десять діб від початку культивування, призводить до того, що спіруліна продовжує інтенсивно рости, збільшувати швидкість росту й концентрацію біомаси. Гліцин, внесений через 2 доби від початку культивування у конче-

нтрації 150 мг/л, призводить до надмірної фрагментації трихом мікрородості і ріст культури пригальмовується.

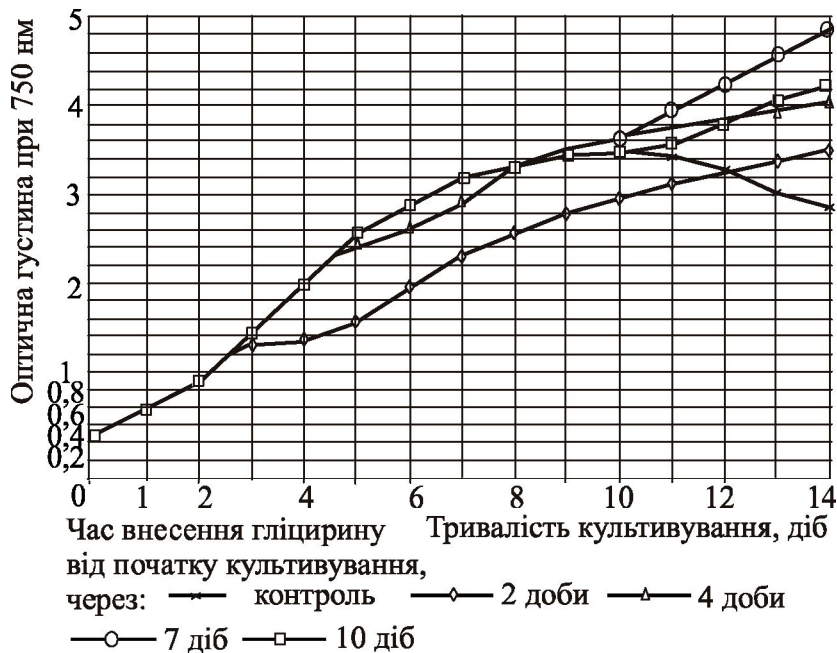


Рис. 3. Динаміка росту спіруліни при внесенні у культуральне середовище гліцину в концентрації 150 мг/л

Було відмічено, що внесення гліцину на більш пізніх фазах росту призводить до того, що спіруліна витримує більші його концентрації і швидше проходить «новостворену» лаг-фазу.

Слід зазначити, що фрагментація трихом, яка відбувається при внесенні гліцину, не має нічого спільного з механічним ушкодженням культури, що призводить до загибелі значної частини спіруліни, оскільки під дією гліцину спіруліна досить швидко збільшує інтенсивність свого росту.

Таким чином, з'являється багатоступінчатість процесу накопичення біомаси, яка полягає в тому, що гліцин спочатку призводить до гальмування росту, а потім до збільшення його швидкості. В результаті відбувається поетапне ущільнення біомаси спіруліни і досягається висока густина культури.

Висновки

Отже, внесення гліцину у середовище культивування призводить до збільшення інтенсивності росту спіруліни, а різні концентрації екзогенно внесеного гліцину мають різний вплив на біосинтетичні процеси спіруліни, які залежать від того, на якій фазі росту культури вноситься гліцин.

Екзогенно внесений гліцин у середовище культивування спіруліни призводить до фрагментації трихом мікрородості, ступінь інтенсивності якої залежить як від концентрації внесеного гліцину, так і від фази росту культури, на якій вноситься гліцин.

Фрагментація трихом мікрородості призводить до інтенсифікації процесу розмноження спіруліни і, відповідно, до збільшення її продуктивності внаслідок збільшення кількості трихом з невеликою кількістю клітин, які

швидко ростуть. Внесення гліцину дозволяє збільшувати швидкість росту спіруліни і досягти високої густини культури навіть тоді, коли вона припиняє нарощувати біомасу.

Найбільша концентрація біомаси спіруліни у культуральному середовищі (до 2,1 г сух. реч./л) може бути досягнута при внесенні до нього гліцину у концентраціях 100-150 мг/л на фазі уповільнення росту (при густині культури приблизно 1,0 г сух. реч./л).

Література

1. *Дробецкая И.В.* Использование мочевины при выращивании синезеленой микроводоросли *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. в накопительной культуре // Экология моря. — 2002. — № 60. — С. 53—59.
2. *Рудик В.Ф., Бульмага В.П., Кирняк Т.В., Чапурина Л.Ф.* Продуктивность и биохимический состав *Spirulina platensis* (nordst.) geitl, Calu-835 при культивировании в присутствии координационных соединений Zn(II) // Альгология. — 2003. — № 3. — С. 322—330.
3. *Шнюкова Є.І.* Фотоорганотрофний і гетеротрофний ріст гормогонієвих синьозелених водоростей. //Укр.бот.журн. — 1984.— № 4, т.41. — С. 49—54.
4. *Nishio Naomichi, Nagai Shiro.* Enhancement of biomass and pigment *Marquez Facundo J.*, production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture // J. Chem. Technol. And Biotechnol. — 1995. — 62, № 2. — P. 159—164.
5. *Xie Qun, Wang Ming-xue, Yan Hong-Hai* Действие сложных аминокислот на рост, содержание хлорофилла и выделение кислорода у *Chlorella rupeoidosa*. Shanghai shuichan daxue хуебао=J. Shanghai Fish. Univ. — 2006. — 15, № 2 — С. 190—194.
6. *Henrikson R.* Earth Food Spirulina // Renore Enterprises, Inc. Laguna Beach, California. — 1989. — P. 25—95.
7. *Campanella L., Crescentini G., Avino P.* Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on Spirulina // Analisis. — 1999. — 27, № 6. — P. 533—540.
8. *Santillan C.* Mass production of Spirulina // Experientia. — 1982. — 38, N 1. — P. 40—43.; *Ciferri O.* Spirulina, the edible Microorganism // Microbiol. Rev. — 1983. — 47, N 4. — P. 551—578.
9. *Belay A.* The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management // J. Amer. Nutr. Assoc. — 2002. — 5, N 2. — P. 27—48.
10. *Duncan P.L.* and *Klesius P.H.* Effects of Feeding Spirulina on Specific and Nonspecific Immune Responses of Channel Catfish. // Journal of Aquatic Animal Health. — 1996. — N8. — P. 308—313.
11. *Seshadri C.V.* Large Scale Nutritional Supplementation with spirulina alga. All India Project. Shri Amm Murugappa Chettiar Research Centre (MCRC) Madras. — 1993 — 79 p.
12. *Рудик В.Ф., Гудумак В.С.* Усовершенствование способа определения абсолютно сухой биомассы спирулины. — Кишин. гос. ун-т. — Кишинев, 1989. — 6 с. — Библиогр. — Деп. в Молд. НИИ НТИ 22.02.89 №1085-М89.

**ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ГЛИЦИНА НА РОСТ
МИКРОВОДОРОСЛИ SPIRULINA PLATENSIS (GOM.) GEITL**

А.В. Котинский, А.И. Салюк, Г.С. Батищева
Национальный университет пищевых технологий

В статье проведено исследование влияния глицина как органического источника азота и углерода на рост спирулины. Согласно полученным результатам исследований было определено, что внесение глицина в культуральную среду приводит к интенсификации роста спирулины. Определено, что наибольшее накопление биомассы (до 2,1 г сухого вещества/л) может быть достигнуто внесением в культуральную среду глицина в концентрациях 100—150 мг/л при плотности культуры приблизительно 1,0 г сухого вещества/л. Установлено, что глицин приводит к фрагментации трихом микроводоросли, интенсивность которой зависит как от концентрации внесенного глицина, так и от фазы роста культуры, на которой он вносится. Фрагментация трихом приводит к интенсификации процесса размножения спирулины и, соответственно, к увеличению ее продуктивности в результате увеличения количества быстро растущих трихом с небольшим количеством клеток. Внесение глицина позволяет увеличивать скорость роста спирулины и достичь высокой плотности культуры даже тогда, когда она прекращает наращивать биомассу.

Ключевые слова: *спирулина, глицин, накопление биомассы, фрагментация трихом.*