

УДК 579.66

## РАЗРАБОТКА БЕСХЛОРОФИЛЛЬНЫХ МУТАНТНЫХ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Кутьина Н.Л. (Университет ИТМО), Дышекова С.М. (Университет ИТМО),  
Виноградов Д.С. (Университет ИТМО)

Данная работа посвящена разработке мутантных бесхлорофилльных штаммов микроводоросли *Chlorella Vulgaris* с заданными свойствами. Описан процесс проведения мутагенеза путем облучения ультрафиолетом. Полученные результаты предназначены для применения в пищевой промышленности.

**Введение.** Микроводоросли могут являться идеальным кандидатом для получения высококачественной белковой биомассы для замещения классических белковых продуктов животного происхождения. Существующие технологии выращивания микроводорослей являются ключевым ограничением к широкому распространению микроводорослей в промышленности. Главными барьерами являются: низкие показатели прироста культуры, зависимость от света и органолептические свойства биомассы, обогащенной хлорофиллом. Классические методы культивирования микроводорослей предполагают фотозависимый рост, что подходит только для ряда стран с высоким уровнем солнечного облучения и исключает северные страны, в том числе, Россию, и приводит к получению биомассы, сильно обогащенной хлорофиллом, что снижает органолептические и технологические свойства полученных продуктов. Данные ограничения могут быть преодолены созданием технологии гетеротрофного фотонезависимого роста и созданием мутантных штаммов с дефицитом хлорофилла, что не будет препятствовать гетеротрофному росту, поскольку хлорофилл не является необходимым энергособирающим пигментом, а энергия получается от расщепления сахаров. Таким образом, первоначальными задачами НИОКР являлись создание эффективной технологии для гетеротрофного роста штаммов микроводоросли *Chlorella Vulgaris* и получение мутантных (не ГМО) линий с дефицитом хлорофилла. Целью работы с мутагенезом было создание библиотеки мутантов со следующими качествами: высоким уровнем гетеротрофного роста, сравнимым с параметрами дикого типа, и дефицитом светособирающего пигмента – хлорофилла, поскольку обильное присутствие хлорофилла в биомассе может ухудшать органолептические и технические свойства биомассы.

**Основная часть.** Оригинальные штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Chlorella rupeoidosa* были заказаны из Коллекции Микроводорослей и Цианобактерий IPPAS Института Физиологии Растений им. К.А. Тимирязева РАН. Штаммы были пересеяны в жидкую питательную среду и исследованы по следующим признакам: скорость роста, содержание белка, длительность лаг-фазы и общий объем накопленной сухой биомассы.

В качестве способа получения бесхлорофилльных мутантов было использовано облучение ультрафиолетом с длиной волны 254 нм (стандартная кварцевая лампа для стерилизации биологических ламинаров и помещений), как легкодоступный и при этом эффективный метод. Стандартные рекомендации по проведению мутагенеза советуют выбирать такие условия, при которых выживаемость клеток составляет 1–10%. В этом случае достаточное число клеток получают единичные повреждения генетического материала (мутации), что, в свою очередь, обеспечивает достаточную выживаемость облученной культуры и облегчает дальнейшую селекцию, а также наследование признаков (скорость роста, предпочтение кормовых субстратов) начальной культуры.

С целью подбора оптимальной дозы облучения были построены кривые выживаемости. Для этого опытную культуру развели до ~15000 клеток/мл. Отобрали 1 мл для посева на чашку – нулевая точка. Далее, налили по 25 мл в пустые чашки и облучали ультрафиолетом с разной длительностью: 5, 10, 20, 40 минут. После облучения из каждой чашки взяли по 1 мл и выселили на чашку со средой. Спустя неделю чашки были сфотографированы на приборе Luna 2, по

полученным фотографиям счёт числа колоний вёлся с помощью ImageJ. Оптимальным временем облучения было выбрано 5 минут.

Для проведения мутагенеза отобранный штамм дикого типа был посеян в жидкую среду с концентрацией  $2 \cdot 10^6$  клеток на 1 мл. Далее, было стерильно отобрано 20 мл и влито в пустую чашку Петри. Чашка с культурой облучалась в ламинаре в течение 5 минут. Далее, облученная культура была добавлена к 80 мл свежей среды и культивировалась в течение 3 суток для проявления ожидаемого фенотипа. После этого культура высевалась по 1 мл на чашку Петри. Выбор мутантов основывался на цвете: не зелёный, что означает отсутствие или снижение уровня хлорофилла, и размере: большой размер сопряжён с быстрым ростом колонии.

**Выводы.** В ходе проведения мутагенеза были получены бесхлорофилльные штаммы желтого, коричневого и белого цветов. Ростовые характеристики мутантных штаммов незначительно отличаются от исходных штаммов дикого типа и являются приемлемыми для диапазона плановых показателей. Содержание белка в мутантных штаммах составило от 57% – до 66%, анализ проводился методом Кьельдаля. Полученные штаммы предназначены исключительно для гетеротрофного культивирования. Для этого были проведены работы по подбору и оптимизации питательной среды, в результате чего была создана полноценная технология производства высокобелковой биомассы для применения в пищевой промышленности в качестве исходного сырья. Микроводоросли являются универсальным продуктом и подходят для добавления практически во все виды пищевых продуктов, и благодаря своим свойствам имеют высокий потенциал к использованию, также, в косметической промышленности. Разработанная технология производства мутантных штаммов в 20 раз эффективнее распространенного фототрофного культивирования. В числе преимуществ, также: независимость от погодных условий и климата, быстровозводимость производственных площадок, отсутствие необходимости в уникальном оборудовании, круглогодичное производство, возможность обеспечения стабильного качества готовой продукции и стабильных поставок.

Кутьина Н.Л. (автор)

Дышекова С.М. (соавтор)

Виноградов Д.С. (соавтор)