

Двухкомпонентная модель роста микроводорослей в плотностате

Лелеков А.С. *, Тренкеншу Р.П. **

*Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь,
Россия*

Аннотация. Работа посвящена исследованию механизмов влияния света на рост культуры микроводорослей в плотностате. Плотностатный способ культивирования обеспечивает одинаковые световые условия для всех клеток, стабилизация их биохимического состава, а также постоянство всех физико-химических факторов среды. Перечислены основные подходы и принципы моделирования роста культуры микроводорослей. Применение двухкомпонентных моделей обусловлено разделением фотохимических и ферментативных процессов биосинтеза клеточных структур микроводорослей из минеральных веществ за счёт энергии высокопотенциальных форм макроэргов. Предлагаемая математическая модель представлена системой двух дифференциальных уравнений, описывающих синтез резервных составляющих биомассы за счёт света и биосинтез структурных компонентов из резервных. Модель учитывает, что часть резервных компонентов расходуется на пополнение пула макроэргов, а часть структурной составляющей может преобразовываться в резервную. Скорости синтеза структурных и резервных форм биомассы заданы линейными сплайнами и выражены через приведённые потоки энергетического или пластического субстрата. Проведена верификация модели на экспериментальных данных хлорофиллостатной культуры *Tetraselmis viridis*. Показано, что световая кривая *T. viridis* характеризуется двойной сменой лимитирующего фактора и может быть разбита на область метаболического, светового лимитирования и область насыщения. Снижение величины удельной скорости связано с уменьшением эффективности преобразования световой энергии.

Ключевые слова: интенсивность света, удельная скорость роста, фотосинтез, биосинтез, моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Низшие фотоавтотрофные организмы являются одними из древнейших обитателей Земли, их значимость для нормального протекания энергетических процессов в биосфере огромна [1]. К категории низших фотоавтотрофов относят одноклеточные водоросли и цианобактерии, которые способны к оксигенному фотосинтезу, а также характеризуются пространственным и временным разделением фотохимических и биосинтетических процессов. Таким образом, рост популяции микроводорослей можно представить, как двухкомпонентный процесс биосинтеза клеточных структур из минеральных веществ за счёт энергии высокопотенциальных форм макроэргов АТФ и НАДФ·Н, которые образуются в световых реакциях фотосинтеза. Кроме того, добавочное количество АТФ синтезируется за счёт митохондриального дыхания [2].

Метаболизм живой клетки представляет собой сложную систему с многочисленными кинетическими и регуляторными связями. Для конкретного участка

* a.lelekov@yandex.ru

** trenkens@yandex.ru

цепи метаболизма гетеротрофов разработаны системы дифференциальных уравнений, которые численно решены для заданных условий [3–5]. В общем случае попытки детального описания сложных биологических систем приводят к невозможности корректного построения математической модели из-за использования большого количества неточно определяемых параметров по сравнению с имеющейся экспериментальной информацией [6, 7]. Особенно наглядно это проявляется в альгологической практике. Например, при определении концентрации клеток или содержания пигментов в них количество экспериментальных точек часто не превышает 5–10, в то время как самые простейшие модели роста накопительной культуры микроводорослей [8, 9] содержат сопоставимое число коэффициентов. Поэтому в теоретических и практических исследованиях мы вынуждены ограничиваться лишь небольшим числом параметров, которые с требуемой точностью характеризуют исследуемый процесс. Например, при классическом подходе к моделированию роста микроводорослей в культуре широко используются такие количественные характеристики как плотность культуры, скорость роста, удельная скорость, экономический коэффициент потребления субстрата и пр.

Построение математических моделей фотобиосинтеза в значительной мере упрощает использование общепринятых аксиом биологии. Одним из главных принципов, на котором базируются теоретические основы роста микроводорослей, является положение о том, что синтез органического вещества происходит за счёт биохимических реакций с участием ферментов, каждый из которых контролируется отдельным геном [10]. В середине двадцатого века в микробиологии Моно ввёл понятие «узкого места» метаболизма [11]. Это позволяет выделить лимитирующее звено, в целом, определяющее скорость роста. Вместе с принципом смены лимитирующих факторов (принципом Блэкмана) [12] и концепцией Либиха [13], принцип «узкого места» даёт возможность не только формально описать рост микроводорослей, но и позволяет редуцировать систему уравнений. Применительно к биокинетике этот принцип формулируется как определяющее звено в цепи ферментативных реакций [14, 15]. В дальнейшем были разработаны представления о структурной организации «узкого места» метаболизма [16]. Здесь на основе вероятностного подхода получены зависимости скорости синтеза лимитирующей составляющей биомассы от величины потока элементов питания, поступающего в клетку из внешней среды.

Современные модели роста культур микроводорослей базируются на перечисленных базовых принципах моделирования и рассмотрении биомассы как суммы двух или более составляющих [17]. Например, в работе [18] представлена трёхкомпонентная модель, описывающая динамику белков, липидов и углеводов при лимитировании роста световым или минеральным потоком субстрата. Широкое распространение получили двухкомпонентные модели роста, которые в англоязычной литературе получили название DEB-model (Dynamic Energy Budget). В классическом виде DEB-модели базируются на положении, что поглощённая энергия клеткой преобразуется в резервную биомассу [19–21], которая для фотоавтотрофов может быть представлена резервными углеводами. В дальнейшем пул резервной биомассы расходуется на процессы биосинтеза структуры клетки и процессы поддержания. Стехиометрические соотношения, как для резервной, так и структурной составляющей считаются постоянными, что согласуется с предложенной ранее концепцией для гетеротрофов [22]. Изменения биохимического состава клетки обусловлены лишь различными количествами резервной и структурной части. По сравнению даже с трёхкомпонентным подходом [18], двухкомпонентные модели обладают существенно меньшим набором неизвестных параметров, что позволяет каждый коэффициент наделять биологическим смыслом. Кроме того, при стационарных условиях решения

системы дифференциальных уравнений может быть выражено в простых аналитических функциях, что избавляет от необходимости применения численных методов и связанных с ними проблем [6].

Количество исследований роста и биохимического состава микроводорослей в культуре огромно, однако большинство опытов проведено с периодической культурой микроводорослей. Несмотря на относительно небольшое число экспериментальных работ с непрерывными культурами микроводорослей, основные успехи в области изучения роста микроводорослей достигнуты именно при работе в таких режимах выращивания. Особенностью непрерывных культур является возможность достижения динамически равновесного состояния благодаря подаче в фотобиореактор свежей питательной среды и отбора части культуральной суспензии. В этом случае стабилизируются все кинетические характеристики культуры, строго контролируется воспроизводимость результатов, любой анализ производится без вмешательства в процессы роста. В общем случае различают два способа управления ростом культуры микроводорослей (либо их комбинацию): плотностат, когда фиксируется определённая плотность культуры или хемостат – постоянство скорости протока среды. Оба способа принципиально различаются как по технической реализации, так и по создаваемым для клеток микроводорослей условиям среды.

Хемостат характеризуется наличием того или иного лимитирующего фактора. Область работы плотностата характеризуется экспоненциальным (неограниченным) ростом культуры. Низкие плотности культуры обеспечивают отсутствие самозатенения клеток, высокие концентрации всех биогенных элементов исключают ограничение скорости роста. В таких условиях реализуются максимальные скорости синтеза биомассы. Собственно экспоненциальный рост начинается с момента окончания адаптации клеток к новым условиям. Устойчивый экспоненциальный рост клеток микроводорослей без светового или минерального лимитирования возможен только в плотностате. Наличие системы контроля плотности культуры позволяет подобрать такой режим выращивания микроводорослей, при котором плотность культуры до и после разбавления будут практически одинаковы. Таким образом, возможно получить непрерывный стационарный динамический процесс, который позволяет исследовать влияние главного фактора среды – световых условий. В предыдущей работе [23] рассмотрена зависимость содержания хлорофилла *a* от интенсивности света, однако кинетика удельной скорости роста и биомассы микроводорослей в плотностате не анализировалась. Предложенная ранее модель зависимости удельной скорости роста от интенсивности света [24] не описывает область фотоингибирования.

Цель данной работы – на основе базовой двухкомпонентной модели, объяснить зависимость удельной скорости и плотности культуры микроводорослей от интенсивности света в плотностате.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Математическая модель

Для переходных процессов в отсутствие самозатенения клеток, базовая система уравнений, описывающая динамику трансформации структурных и резервных форм биомассы микроводорослей, имеет вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dB_{str}}{dt} = \frac{q_{rs} \mu_{mrs} B_{str}}{\epsilon_{sat}} \left| \begin{array}{l} \epsilon, \epsilon < \epsilon_{sat} \\ \epsilon_{sat}, \epsilon \geq \epsilon_{sat} \end{array} \right. - \mu_r B_{str} \\ \frac{dB_{res}}{dt} = \mu_m B_{str} \left| \begin{array}{l} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{array} \right. - \frac{\mu_{mrs} B_{str}}{\epsilon_{sat}} \left| \begin{array}{l} \epsilon, \epsilon < \epsilon_{sat} \\ \epsilon_{sat}, \epsilon \geq \epsilon_{sat} \end{array} \right. + q_{sr} \mu_r B_{str} \end{array} \right. \quad (1)$$

где B_{str} , B_{res} – структурная и резервная части биомассы; μ_m – максимальная удельная скорость фотосинтеза; i_0 – нормированная на насыщающую внешняя облучённость; ε , ε_{sat} – соотношение и насыщающее соотношение резервная / структурная биомасса; μ_{mrs} – максимальная удельная скорость преобразования резервной биомассы в структурную; q_{rs} , q_{sr} – эффективность перехода резервной биомассы в структурную и обратно; μ_r – удельная скорость распада структуры.

Биомассу микроводорослей можно рассматривать в виде суммы структурной и резервной форм, а, значит, продуктивность культуры равняется сумме скоростей компонентов:

$$\frac{dB}{dt} = \frac{dB_{str}}{dt} + \frac{dB_{res}}{dt},$$

$$\frac{dB}{dt} = \mu_m B_{str} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - (1 - q_{rs}) \frac{\mu_{mrs} B_{str}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r B_{str} (1 - q_{sr}).$$

Соответственно, удельная скорость роста имеет вид:

$$\mu = \frac{1}{B} \frac{dB}{dt} = \mu_m \frac{B_{str}}{B} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - (1 - q_{rs}) \frac{B_{str}}{B} \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r \frac{B_{str}}{B},$$

$$\mu = \frac{\mu_m}{(1 + \varepsilon)} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - (1 - q_{rs}) \frac{\mu_{mrs}}{(1 + \varepsilon) \varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \frac{\mu_r (1 - q_{sr})}{(1 + \varepsilon)}. \quad (2)$$

Выражение (2) показывает, что удельная скорость роста культуры зависит от действующей интенсивности света, соотношения резервной и структурной биомассы, а также доли структурной биомассы. Можно доказать [25], что для условий стационарного динамического равновесия непрерывной культуры удельная скорость роста микроводорослей в целом равна удельным скоростям структурной и резервной частей. Поэтому для нахождения зависимости удельной скорости роста от интенсивности света для упрощения математических преобразований будем использовать систему:

$$\begin{cases} \mu = \frac{q_{rs} \mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m}{\varepsilon} \begin{cases} i_0, i_0 < 1 \\ 1, i_0 \geq 1 \end{cases} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon \varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} + \frac{q_{sr} \mu_r}{\varepsilon} \end{cases} \quad (3)$$

Решение системы (3) позволяет получить искомые зависимости соотношения резервная / структурная биомасса и удельной скорости роста от интенсивности света. Недостатком полученных выражений будет постоянство удельной скорости роста при высоких значениях облучённости. Следовательно, некоторые коэффициенты системы (3), которые ранее [24] предполагались постоянными таковыми не являются.

Рассмотрим максимальные удельные скорости фотосинтеза μ_m и преобразования резервной биомассы в структурную μ_{mrs} . По определению, эти параметры пропорциональны общему количеству ключевого фермента (или мультиферментного комплекса) [26]. Если биомасса B содержит ключевой комплекс F_0 в количестве f на единицу структурной составляющей, а эффективность преобразования энергии макроэргов в химическую энергию биомассы – φ , то для максимальной удельной скорости можно записать:

$$\mu_{max} = \frac{\varphi}{\theta^0} \zeta f \mu^e. \quad (4)$$

где θ_0 – коэффициент перевода энергетических единиц в единицы биомассы (калорийность), ζ – свободная энергия одной молекулы макроэрга, μ_e – активность ключевого фермента.

По сути, определяемая таким образом максимальная удельная скорость не зависит от внешних потоков минерального и энергетического (светового) питания микроводорослей, а определяется содержанием ключевого фермента f , его активностью μ_e , эффективностью преобразования энергии и калорийностью. Так как ключевой фермент является белком, то его долю в структурной биомассе можно считать постоянной ($f = \text{const}$). Постоянство соотношений между структурными частями биомассы микроводорослей подтверждается экспериментальными данными. Например, в предыдущей работе [23] для цианобактерии *A. platensis* по данным [27] рассчитано стехиометрическое соотношение для структурных липидов, углеводов и белков – 0.14 : 0.27 : 1 соответственно.

В свою очередь, активность каталитического центра зависит от различных причин (например, положение молекулы субстрата относительно каталитического центра в начальный момент взаимодействия, скорость молекулы, локальные физико-химические условия). Для того, чтобы точно описать кинетику субстратзависимой биологической реакции, необходимо знать закон распределения активности. В некоторых случаях количественные закономерности, описывающие скорость субстратзависимых реакций, не зависят от вида распределения активности фермента, а определяются лишь математическим ожиданием этой величины, которое в условиях плотностата можно считать постоянным ($\mu_e = \text{const}$).

Если рассматривать световое ограничение скорости роста микроводорослей, то лимитирующим звеном является скоростью образования фотосинтетических углеводов. Большинство исследователей склоняются к тому, что самой медленной стадией фотосинтеза является активность первого и главного компонента цикла Кальвина РБФК (Rubisco) [28]. Для фотосинтеза величину коэффициента калорийности также можно считать константой. Известно, что калорийность глюкозы составляет 4.2 ккал/г [10].

Снижение удельной скорости фотосинтеза определяется снижением эффективности преобразования световой энергии в химическую энергию углеводов при высоких интенсивностях света, которое сопровождается активацией механизмов нефотохимического тушения [29–31]. При высокой облучённости происходит накопление восстановленных форм АТФ и НАДФ·Н. При этом избыточная световая энергия приводит к увеличению времени жизни синглетного возбужденного состояния хлорофилла, образованию долгоживущих триплетных состояний, накоплению протонов в люмене хлоропласта, а также активных форм кислорода, которые и вызывают деструкцию фотосинтетического аппарата [32, 33]. Несмотря на широкое распространение гипотезы о фотодеструктивном окислении пигментов, в некоторых работах она подвергается сомнению. Например, для диатомеи *Th. weissflogii* показано, что скорость распада хлорофилла a не зависит от внешней интенсивности света, при этом доля хлорофиллида и других продуктов распада не превышает 2 % клеточного содержания хлорофилла a [34]. В таком случае эффективность преобразования световой энергии зависит не от количества пигментов, а от структурной организации лимитирующего звена. Вопрос о локализации этого звена на сегодняшний день остаётся открытым. По некоторым данным это один из компонентов электрон-транспортной цепи, пигмент, который при высокой облучённости переходит в неактивное состояние и "запирает" цепь. Подробно эти вопросы рассмотрены в [16], где на основе вероятностного подхода получены выражения для скорости фотосинтеза и эффективности при различном количестве реакционных центров фотосинтеза, ёмкости "субстратного депо", временной организации потока субстрата и пр.

Таким образом, физиологические механизмы снижения эффективности фотосинтеза могут быть различными, и их выяснение требует детального рассмотрения и не вписывается в рамки данной работы. Для решения поставленной в данной работе задачи используем параметрическое выражение, описывающее кинетику зависимости φ от интенсивности света [16]. Для уницентральной организации лимитирующего звена и 100 % доле продуктивных реакций можно записать упрощённую зависимость:

$$\varphi = \varphi_0 \frac{\sum_{q=0}^Q i_0^q}{\sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q}, \quad (5)$$

где φ , φ_0 – эффективность и максимальная эффективность фотосинтеза; i_0 – нормированная на насыщающую интенсивность света (приведённая плотность потока квантов на реакционный центр фотосинтеза); Q – ёмкость субстратного депо (количество молекул интермедиатов, которые имеют время жизни сопоставимое или больше времени оборота реакционного центра фотосинтеза).

Если ёмкость субстратного депо равна одной единице субстрата ($Q = 1$), получим:

$$\varphi = \varphi_0 \frac{1 + i_0}{1 + i_0 + i_0^2}.$$

Если в субстратном депо помещается две единицы субстрата:

$$\varphi = \varphi_0 \frac{1 + i_0 + i_0^2}{1 + i_0 + i_0^2 + i_0^3}.$$

Графически зависимость эффективности от приведённой плотности потока квантов при различной ёмкости субстратного депо представлена на рисунке 1. С возрастанием ёмкости субстратного депо, характер кривой кинетической изменяется. При низких интенсивностях света наличие депо позволяет повысить эффективность реакции до максимальной. Аналогичные выводы в [16] получены при возрастании количества лимитирующих звеньев (мультицентральной организации), причём зависимость эффективности реакции от облучённости также может быть описана выражением (5).

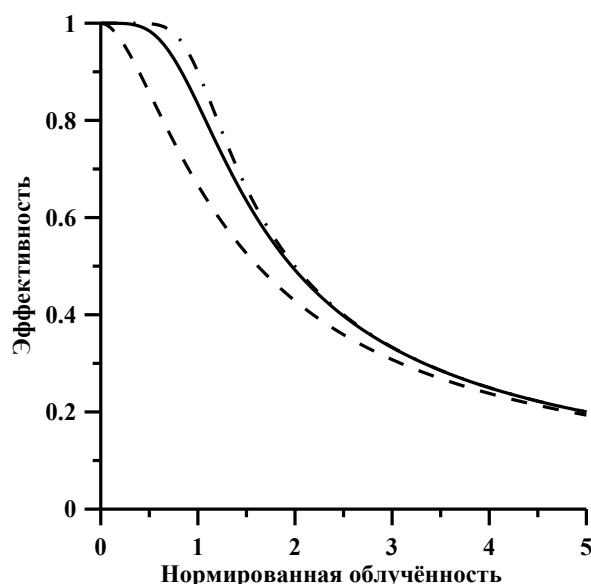


Рис. 1. Зависимость эффективности фотосинтеза от приведённой плотности потока квантов при различной ёмкости субстратного депо: пунктирная линия – $Q = 1$, сплошная – $Q = 4$, штрихпунктирная – $Q = 8$.

Отметим, что максимальная удельная скорость преобразования резервной биомассы в структурную μ_{mrs} также будет описываться выражением (4). Какой мультиферментный комплекс ограничивает скорость преобразования макромолекулярных форм биомассы у микроводорослей точно неизвестно. Укажем только, что для выяснения конкретного узкого места разработаны подходы, которые помогут выявить его локализацию [3, 35]. Примем, что эффективность данного процесса также является светозависимой, хотя и опосредованно. При высоких облучённостях происходит накопление одного из интермедиатов, что приводит к блокировке синтеза структурной составляющей биомассы. В микробиологии такие механизмы известны как лимитирование скорости реакции избыточной концентрацией субстрата, которые обусловлены взаимодействием фермента с несколькими молекулами субстрата [36].

С учётом (4) и (5), получим искомые зависимости удельной скорости роста и плотности культуры от интенсивности света для условий плотностата. Математические выводы аналогичны, приведённым в работах [23, 24]. Ограничимся лишь окончательными выражениями для каждого участка.

1. Область зависимости μ и ε от света: $\varepsilon_{\min} \leq \varepsilon \leq \varepsilon_{\text{sat}}, i_{\text{cp}} \leq i_0 \leq i_{\text{sat}}$.

Данный диапазон облучённости (от "компенсационного пункта" фотосинтеза – ε_{\min} , i_{cp} , до светового насыщения роста – ε_{sat} , i_{sat}) характеризуется увеличением как удельной скорости роста, так и соотношения резервная / структурная биомасса. Эффективность реакций фотосинтеза и преобразования макромолекулярных форм биомассы, а также соответствующие удельные скорости можно считать максимальными и постоянными. Система уравнений (3), описывающая динамику трансформации структурных и ресурсных форм биомассы микроводорослей, примет вид:

$$\begin{cases} \mu = \frac{\mu_{mrs} q_{rs} \varepsilon}{\varepsilon_{\text{sat}}} - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m i_0}{\varepsilon} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{\text{sat}}} + \frac{q_{sr} \mu_r}{\varepsilon} \end{cases}.$$

Зависимость ε от облучённости:

$$\varepsilon = -\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{\min}}{q_{rs}} + \frac{\varepsilon_{\min} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{\text{cp}})}. \quad (6)$$

Выражение для удельной скорости роста:

$$\mu = \frac{\mu_{mrs} q_{rs}}{\varepsilon_{\text{sat}}} \cdot \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{\min}}{q_{rs}} + \frac{\varepsilon_{\min} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{\text{cp}})} - \frac{\mu_{mrs} q_{rs}}{\varepsilon_{\text{sat}}} \cdot \left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}} + \mu_r\right). \quad (7)$$

В случае режима выращивания, когда происходит стабилизация оптической плотности культуры на максимуме поглощения хлорофилла a (хлорофиллостат), биомасса микроводорослей в фотобиореакторе будет расти с увеличением ε :

$$B = B_{\text{str}} + B_{\text{res}} = B_{\text{str}} + \varepsilon B_{\text{str}} = B_{\text{str}} (1 + \varepsilon).$$

$$B = B_{\text{str}} \left(1 - \frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{\min}}{q_{rs}} + \frac{\varepsilon_{\min} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{\text{cp}})} \right). \quad (8)$$

2. Область увеличения ε и снижения μ : $\varepsilon_{\text{sat}} \leq \varepsilon \leq \varepsilon_{\max}, i_{\text{sat}} \leq i_0 \leq i_{\max} = 1$.

На данном участке в случае постоянной величины эффективности, удельная скорость роста будет постоянна и максимальна, при этом мы наблюдаем линейный рост соотношения резервная / структурная биомасса [24]. Однако, в связи со снижением эффективности согласно выражению (5), удельная скорость роста также будет уменьшаться, соотношение ε будет расти нелинейно. По форме кинетических кривых зависимости μ и ε от интенсивности света при достаточном количестве экспериментальных точек можно судить о размере субстратного депо.

Система уравнений (3) имеет вид:

$$\begin{cases} \mu = \mu_{mrs} q_{rs} - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m i_0}{\varepsilon} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon} + \frac{q_{sr} \mu_r}{\varepsilon}. \end{cases}$$

Удельная скорость роста определяется из первого уравнения системы с учётом выражения (5):

$$\mu = q_{rs} \mu_{max}^{rs} \sum_{q=0}^Q i_0^q / \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q - \mu_r. \quad (9)$$

Соотношение резервной и структурной биомассы для данного участка растёт вплоть до насыщающего значения:

$$\varepsilon = \frac{\mu_{max}^{photo} \sum_{q=0}^Q i_0^q i_0 - \mu_{max}^{rs} \sum_{q=0}^Q i_0^q + q_{sr} \mu_r \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q}{q_{rs} \mu_{max}^{rs} \sum_{q=0}^Q i_0^q - \mu_r \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q}.$$

Когда интенсивность света достигает максимального значения ($I_0 = I_{0max}, i_0 = 1$), реализуется максимальное значение соотношения резервная / структурная биомасса ε_{max} , которое далее остаётся постоянным:

$$\varepsilon_{max} = \frac{\mu_{max}^{photo} (Q+1) - \mu_{max}^{rs} (Q+1) + q_{sr} \mu_r (Q+2)}{q_{rs} \mu_{max}^{rs} (Q+1) - \mu_r (Q+2)}. \quad (10)$$

Выражение (10) показывает, что ε_{max} определяется не только кинетическими коэффициентами, но и структурной организацией лимитирующего звена.

Для хлорофиллостата плотность культуры на данном участке:

$$B = B_{str} \left(1 + \frac{\mu_{max}^{photo} \sum_{q=0}^Q i_0^q i_0 - \mu_{max}^{rs} \sum_{q=0}^Q i_0^q + q_{sr} \mu_r \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q}{q_{rs} \mu_{max}^{rs} \sum_{q=0}^Q i_0^q - \mu_r \sum_{q=0}^{Q+1} i_0^q} \right). \quad (11)$$

3. Облучённость и соотношение резервной и структурной биомассы достигают насыщающих значений $\varepsilon = \varepsilon_{max}, \varepsilon \geq \varepsilon_{max}; i_0 \geq 1$.

На данном интервале удельная скорость роста продолжает снижаться согласно выражению (9), наблюдается стабилизация биохимического состава клеток микроводорослей, а также плотности культуры.

Верификация модели

Рассмотрим экспериментальные данные роста культуры *Tetraselmis (Platymonas) viridis* в плотностате при различном уровне поверхностной освещённости. Методика

эксперимента подробно описана в [37]. Все физико-химические факторы среды поддерживали в оптимуме для данного вида. Непрерывный процесс обеспечивали путём дискретных сливов (через 0.5–4 ч) и доливов свежей питательной среды до первоначального объёма. В опыте стабилизировали оптическую плотность культуры в области красного максимума поглощения хлорофилла *a*, измеренную относительно поглощения биомассы в целом: $\Delta D_{680} = D_{680} - D_{730}$. Это позволило поддерживать концентрацию хлорофилла *a* постоянной (хлорофиллостат). При изменении поверхностной облучённости плотность культуры через некоторое время (1–2 суток) достигала новых стационарных значений. Такой режим позволяет стабилизировать биохимический состав, возрастную структуру популяции клеток, концентрацию метаболитов и др. [26]. Интегральный коэффициент поглощения света составлял около 40 % с учётом энергетического спектра лампы, толщина слоя суспензии плоскопараллельного фотобиореактора – 3 см. Величина коэффициента поглощения свидетельствует о том, что все клетки платимонаса находились в одинаковых световых условиях, самозатенением клеток можно пренебречь: известно, что одна клетка поглощает около 40 % падающей световой энергии [38]. Влияние элементов минерального питания на удельную скорость роста культуры можно исключить, так как при проточном режиме культивирования с высокими скоростями протока концентрация биогенов остаётся на довольно высоком уровне [39]. Лимитирование роста водорослей углекислым газом также можно исключить, в виду того, что суспензию непрерывно барботировали газо-воздушной смесью с 3–4 % углекислоты со скоростью 6–7 л/мин на 1 л культуры. При таких концентрациях CO₂ фотосинтез клеток зелёных водорослей протекает с максимально высокими скоростями [40]. Таким образом, удельная скорость роста μ , плотность культуры B и её биохимический состав определялся только поверхностной облучённостью I_0 . Экспериментальные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Зависимость удельной скорости роста, плотности культуры *T. viridis* и содержания хлорофилла *a* от поверхностной облучённости в плотностате

$I_0, \text{Вт}\cdot\text{м}^{-2}$	$\mu, \text{ч}^{-1}$	$B, \text{г СВ}\cdot\text{м}^{-2}$	$\beta, \%$
20	0.074	3.38	1.68
30	0.092	3.78	1.50
40	0.090	4.08	1.39
50	0.108	4.58	1.24
60	0.106	4.54	1.25
80	0.097	5.25	1.08
110	0.092	5.79	0.98
200	0.071	6.76	0.84
350	0.050	6.60	0.86
500	0.035	6.60	0.86

Анализируя данные таблицы 1, можно сделать вывод, что с ростом поверхностной облучённости происходит увеличение удельной скорости роста и биомассы культуры в целом, при этом доля хлорофилла *a* снижается. Ранее [23] нами была проанализирована кинетика содержания хлорофилла *a* в биомассе, предложена упрощённая модель, описывающая зависимость содержания хлорофилла *a* от облучённости для любого вида микроводорослей, определена насыщающая интенсивность света, которая составила 155 Вт·м⁻². Однако насыщение по удельной скорости роста происходит при значительно более низкой облучённости – 50 Вт·м⁻². Это свидетельствует о том, что насыщение по μ и насыщение по β определяются различными лимитирующими звеньями в цепи фотобиосинтеза.

В контексте предлагаемого в данной работе двухкомпонентного подхода, ограничение скорости роста культуры связано с лимитированием скорости фотосинтеза или скоростью ферментативного преобразования резервных форм биомассы в структурные компоненты. Таким образом, для диапазона малых облучённостей ($i_{cp} \leq i_0 \leq i_{sat}$), удельная скорость роста возрастает и описывается выражением (7). Далее μ снижается в связи с уменьшением эффективности преобразования световой энергии. Для интенсивностей света выше насыщающих i_{sat} зависимость μ от i описывается выражением (9).

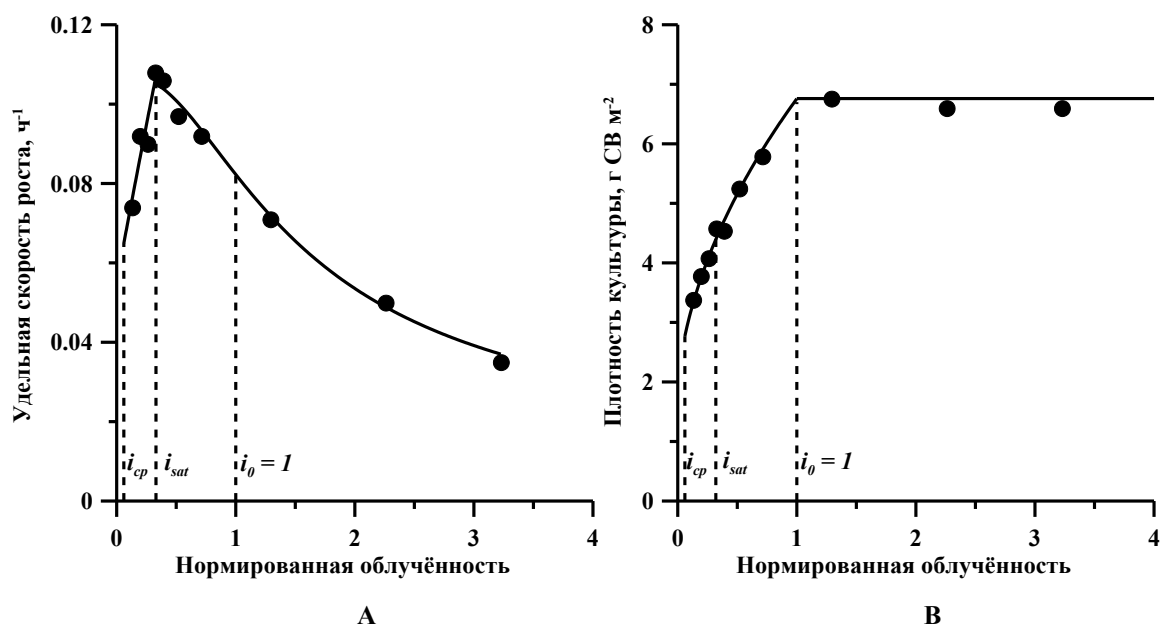


Рис. 2. Зависимость удельной скорости роста (А) и плотности хлорофиллостатной культуры *T. viridis* (В) от облучённости. Линия – аппроксимация экспериментальных данных выражениями (7–9, 11). Пунктирные линии показывают точки смены лимитирующего фактора.

На рисунке 2 представлены аппроксимации выражениями (7–9, 11) экспериментальных данных, приведённых в таблице 1. Значения кинетических коэффициентов указаны в предыдущей работе [23]. Пунктирными линиями отмечены точки переключения лимитирующих факторов: "компенсационного пункта" – $I_{cp} = 9.3$, насыщения удельной скорости роста – $I_{sat} = 50$, стабилизации биохимического состава и плотности культуры – $I_{max} = 155 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$. По результатам аппроксимации определена ёмкость субстратного депо $Q = 2$. Полученные значения Q и остальных коэффициентов модели могут рассматриваться как оценочные ввиду небольшого количества экспериментальных точек.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используя общепринятые положения о разделении световой и темновой стадий фотобиосинтеза, предложены выражения, позволяющие описывать зависимости удельной скорости роста микроводорослей, соотношения резервная / структурная биомасса и плотности культуры от интенсивности света для плотностата. Полученная модельная форма световой кривой, в целом, соответствует известным экспериментальным данным. Ключевым аспектом предлагаемого подхода является то, что световую кривую нельзя рассматривать как единое целое и необходимо разделять на участки (области). С ростом облучённости происходит смена лимитирующего фактора, что выражается в изменении функциональной зависимости μ от интенсивности света. В соответствии с предлагаемой двухкомпонентной моделью на

кривой можно выделить не менее трёх участков: световое лимитирование, метаболическое лимитирование, а также область насыщения. Диапазоны сверхвысоких (выше $500 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$) и малых облучённостей (ниже "компенсационного пункта" фотосинтеза) находятся за границей физиологической нормы и в данной работе не рассматривались. Максимальные удельные скорости фото- и биосинтеза можно считать постоянными только в области невысокой интенсивности света, при которой эффективность преобразования световой энергии максимальна. Уменьшение удельной скорости роста при высоких значениях облучённости связано со снижением ϕ , которое сопровождается активацией механизмов нефотохимического тушения. В случае метаболического ограничения роста, эффективность преобразования резервной биомассы в структурную также зависит от света, хотя и опосредованно. Световая зависимость эффективности фото- или биосинтеза описывается вероятностной моделью, учитывающей структурную организацию лимитирующего звена. Физиологические механизмы снижения эффективности фотобиосинтеза могут быть различными, и их выяснение требует детального рассмотрения.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме "Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса" № гос. регистрации 121030300149-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Билич Г.Л., Крыжановский В.А. *Биология. Полный курс. В 3-х т. Т. 2. Ботаника.* М.: Издательский дом «ОНИКС 21 век», 2002. 544 с.
2. *Физиология растений: Уч. для студ. вузов.* М.: Изд-во «Академия», 2005. 640 с.
3. Минкевич И.Г. Математические проблемы организации метаболических путей из биохимических реакций. *Математическая биология и биоинформатика.* 2016. Т. 11. № 2. С. 406–425. doi: [10.17537/2016.11.406](https://doi.org/10.17537/2016.11.406)
4. Drozdov-Tikhomirov L.N, Scurida G.I, Serganova V.V. Inner metabolic fluxes in multienzyme systems: lysine synthesis on acetate by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnologia (Moscow).* 1986. V. 2. № 8. P. 28–37.
5. Назипова Н.Н., Елькин Ю.Е., Панюков В.В., Дроздов-Тихомиров Л.Н. Расчёт скоростей метаболических реакций в живой растущей клетке методом баланса стационарных метаболических потоков (метод БСМП). *Математическая биология и биоинформатика.* 2007. Т. 2. № 1. С. 98–119. doi: [10.17537/2007.2.98](https://doi.org/10.17537/2007.2.98)
6. Алексеев В.В., Крышев И.И., Сазыкина Т.Г. *Физическое и математическое моделирование экосистем.* С.-Пб.: Гидрометеоиздат. 1992. 367 с.
7. Фурсова П.В., Левич А.П. *Математическое моделирование в экологии сообществ. Обзор литературы.* М.: ВИНТИ, 2002. 181 с.
8. Перт С. Дж. *Основы культивирования микроорганизмов и клеток.* М.: Мир, 1978. 330 с.
9. Pearl R., Reed L.J. On the Mathematical Theory of Population Growth. *Metron.* 1923. V. 3. № 1. P. 6–9.
10. Вилли К., Детье В. *Биология (Биологические процессы и законы).* М.: Мир, 1975. 822 с.
11. Monod J. The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 1949. V. 3. P. 371–394.
12. Blackman F.F. Optima and limiting factors. *Ann. Bot. Lond.* 1905. V.19. P. 281–295.
13. Liebig J. *Chemistry in its Application to Agriculture and Physiology.* Ed. Ph. D. Playfair. L.: Philadelphia, 1847. 135 p.
14. Чернавский Д.С., Иерусалимский Н.Д. К вопросу об определяющем звене в

- системе ферментативных реакций. *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1965. Т. 5. С. 665–672.
15. Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. *Математическое моделирование в биофизике*. М.: Наука, 1975. 344 с.
 16. Тренкеншу Р.П. *Кинетика субстратзависимых реакций при различной организации метаболических систем*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. 89 с.
 17. Flynn K.J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interaction in phytoplankton. *J. Plan. Res.* 2001. V. 23. P. 977–997.
 18. Тренкеншу Р.П., Новикова Т.М. Простейшие модели роста микроводорослей. 10. Динамика общего биохимического состава клеток. *Морской экологический журнал*. Т. 13. № 4. С. 71–78.
 19. Meer J. An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation. *J. Sea Research*. 2006. V. 56. № 2. P. 85–102 doi: [10.1016/j.seares.2006.03.001](https://doi.org/10.1016/j.seares.2006.03.001)
 20. Monaco C.J., McQuaid C.D. Applicability of Dynamic Energy Budget (DEB) models across steep environmental gradients. *Scientific reports*. 2018 V. 8. doi: [10.1038/s41598-018-34786-w](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34786-w)
 21. Nisbet R.M., Jusup M., Klanjscek T., Pecquerie L. Integrating dynamic energy budget (DEB) theory with traditional bioenergetic models. *J. Experim. Biol.* 2012. V. 215. P. 892–902. doi: [10.1242/jeb.059675](https://doi.org/10.1242/jeb.059675)
 22. Минкевич И.Г. *Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов*. М.: Ижевск, 2005. 352 с.
 23. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Моделирование содержания хлорофилла а в культурах микроводорослей. *Математическая биология и биоинформатика*. 2020. Т. 15. № 2. С. 158–171. doi: [10.17537/2020.15.158](https://doi.org/10.17537/2020.15.158)
 24. Тренкеншу Р.П. Влияние света на рост микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности. *Вопросы современной альгологии*. 2019. № 1 (19). С. 1–7. doi: [10.33624/2311-0147-2019-1\(19\)-1-7](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2019-1(19)-1-7)
 25. Тренкеншу Р.П. Динамическая модель биотрансформации резервных и структурных форм биомассы микроводорослей в темноте. *Вопросы современной альгологии*. 2016. № 2 (12). URL: <http://algology.ru/967> (дата обращения: 11.05.2021).
 26. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей в культуре*. Белгород: ООО «Константа», 2017. 152 с. doi: [10.21072/978-5-906952-28-8](https://doi.org/10.21072/978-5-906952-28-8)
 27. Torzillo G., Sacchi A., Materassi R., Richmond A. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 1991. V. 3. P. 103–109.
 28. Медведев С.С. *Физиология растений: учебник*. С.-Пб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. 336 с.
 29. Horton P., Ruban A.V. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J. Experim. Bot.* 2005. V. 56. № 411. P. 365–373. doi: [10.1093/jxb/eri023](https://doi.org/10.1093/jxb/eri023)
 30. Niyogi K., Li X., Müller P. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 2001. V. 125. № 4. P. 1558–1566. doi: [10.1104/pp.125.4.1558](https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558)
 31. Tamoi M., Nagaoka M., Miyagawa Y., Shigeoka S. Contribution of fructose-1,6-bisphosphatase and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase to the photosynthetic rate and carbon flow in the Calvin cycle in transgenic plants. *Plant & Cell Physiology*. 2006. V. 29. №10. P. 380–390. doi: [10.1093/pcp/pcj004](https://doi.org/10.1093/pcp/pcj004)
 32. Nelson J.R. Rates and possible mechanism of light-dependent degradation of pigments

- in detritus derived from phytoplankton. *J. Mar. Res.* 1993. V. 51. No 1. P. 155–179.
33. Рубин А.Б. *Биофизика*: в 2 т. М.: Мир, 2002. 448 с.
 34. Goericke R., Welschmeyer N.A. Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. 1. The ¹⁴CO₂-labeling kinetics of chlorophyll a. *J. Phycol.* 1992. V. 28. P. 498–507. doi: [10.1111/j.0022-3646.1992.00498.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00498.x)
 35. Устинин Д.М., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Сопряжение различных методов компьютерного моделирования в комплексной модели фотосинтетической мембраны. *Компьютерные исследования и моделирование*. 2013. Т. 5. № 1. С. 65–81.
 36. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. *Биокинетика. Практический курс*. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 720 с.
 37. Терсков И.А., Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Светозависимый рост водоросли *Platymonas viridis* в непрерывной культуре. *Известия Академии наук СССР. Серия биологическая*. 1981. Т. 2. № 10. С. 103–108.
 38. Фуряев Е.А. *Микроспектрофотометрические характеристики клеток водорослей в различных условиях культивирования*: автореф. дис. канд. биол. наук. Красноярск, 1979. 23 с.
 39. Боровков А.Б., Гудвиллович И.Н. Особенности накопления и соотношения пигментов в культуре *Dunaliella salina* Teod. при различной поверхностной освещённости. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2018. Т. 3. № 3. С. 626–629.
 40. Пронина Н.А. Организация и физиологическая роль CO₂-концентрирующего механизма при фотосинтезе микроводорослей. *Физиология растений*. 2000. Т. 47. № 5. С. 801–810.

Рукопись поступила в редакцию 22.03.2021, переработанный вариант поступил 28.04.2021.
Дата опубликования 15.05.2021.

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

Two-Component Model of Microalgae Growth in the Turbidostat

Lelekov A.S., Trenkenshu R.P.

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

Abstract. The paper focuses on the study of light influence mechanisms on microalgae culture growth in the turbidostat. The method of turbidostat culture provides the same light conditions for all cells, stabilization of their biochemical composition, as well as the constancy of all physicochemical factors of the environment. The main approaches and principles of modeling the microalgae culture growth are presented. Modern models are shown to be based on classical concepts of considering cell biomass as the sum of two or more compounds. The use of two-component models for microalgae is due to both photochemical and enzymatic processes of biosynthesis of cell structures from mineral substances due to the energy of high-potential forms of macroergs. The proposed mathematical model is represented by a system of two differential equations describing the synthesis of reserve biomass compounds at the expense of light and biosynthesis of structural components from reserve ones. The model takes into account that a part of the reserve compounds is spent on replenishing the pool of macroergs, and a part of the structural component can be converted into a reserve one. The rates of

synthesis of structural and reserve forms of biomass are given by linear splines and expressed in terms of the reduced fluxes of the energy or plastic substrate. The model was verified on the experimental data of the chlorophyllostata culture *Tetraselmis viridis*. It is shown that the light curve of *T. viridis* is characterized by a double change in the limiting factor and can be divided into a region of metabolic, light limiting and a region of saturation. A decrease in the specific growth rate is related to a decrease in the efficiency of light energy conversion.

Key words: *light intensity, specific growth rate, photosynthesis, biosynthesis, modeling.*