

На правах рукописи

Мальцевская Надежда Владиславовна

**ЭНЕРГОСБЕРЕГАЮЩИЕ РЕЖИМЫ ОСВЕЩЕНИЯ
ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ СВЕТОЗАВИСИМЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Специальности:

03.01.06 – Биотехнологии (в том числе бионанотехнологии)

05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата технических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет инженерной экологии», г. Москва

Научные руководители: доктор технических наук, профессор
Бирюков Валентин Васильевич

доктор технических наук
Тулякова Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор
Складнев Дмитрий Анатольевич
Институт микробиологии
им. С.Н. Виноградского РАН

Кандидат технических наук
Баум Рудольф Филиппович
ООО «НПК «Био-Доктор»

Ведущая организация: ОАО ГосНИИсинтезбелок

Защита состоится «28» февраля 2012 года в 13 часов 30 минут.

на заседании объединённого диссертационного совета ДМ 212.204.13 при Российской химико-технологической университет им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл. д. 9) в 443 аудитории (конференц-зал)

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева

Автореферат разослан ____ января 2012 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
ДМ 212.204.13

Шакир И.В.

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Продукты, получаемые с помощью светозависимых (в том числе фототрофных) микроорганизмов, используются в пищевой, медицинской, химической и др. отраслях промышленности, в замкнутых системах жизнеобеспечения для регенерации кислорода (Семененко В.Е, 1961; Владимирова М.Г. с соавт., 1962; Ничипорович А.А. с соавт., 1962; Жаворонков В.А. с соавт., 1996; Гладышев П.А., 2007; Мельников С.С. с соавт., 2010; Варфоломеев С.Д. с соавт., 2011; Griehl C. et al., 2010). В сфере защиты окружающей среды фототрофные микроорганизмы могут быть применены для сокращения содержания парниковых газов (CO₂) в атмосфере и очистки сточных вод (Сальникова М.Я, 1977; Богданов Н.И., 2008). Всё чаще оказываются в центре внимания эти микроорганизмы с точки зрения получения биотоплива как альтернативный вариант ископаемым видам топлива в связи с ужесточением экологических норм, ростом цен на нефть и сокращения природных ресурсов (Graham L.E., 2000; Goodsell D. S., 2004). Однако культивирование светозависимых микроорганизмов сопряжено с высокими энергетическими затратами на освещение.

Одним из возможных вариантов снижения затрат электроэнергии при культивировании светозависимых микроорганизмов является применение импульсного (прерывистого) света. Работы по изучению действия импульсного света на рост и развитие светозависимых организмов проводились многими исследователями (Рабинович Е., 1959; Семененко с соавт., 1960; Шахов А.А., 1971; Шушанашвили В.И. с соавт., 1985; Emerson R. et al., 1932; Evens T.J. et al., 2000). В этих работах применялись главным образом лампы, не предназначенные для импульсного режима работы, или имеющие низкий срок работы в этом режиме, и исследования представляли главным образом научный интерес. С развитием полупроводниковой промышленности появилась возможность применения нового типа осветительных устройств – светодиодов (СД). СД-лампы характеризуются низким энергопотреблением, быстродействием и большим сроком службы. Поэтому в настоящее время тема влияния прерывания света может быть рассмотрена также в научно-практическом аспекте, как возможность снижения энергетических затрат на освещение при культивировании светозависимых организмов.

Учитывая вышесказанное, продолжение работ по развитию технологий прерывистого освещения с использованием этого нового перспективного технического средства является актуальной задачей.

Цель и задачи работы

Цель работы – показать возможность использования различных режимов освещения светозависимых микроорганизмов, реализуемых на основе СД источников излучения, для снижения энергозатрат при получении биомассы микроорганизмов и продуктов метаболизма, а также при утилизации углекислоты из воздуха. В соответствии с указанной целью в работе были поставлены следующие задачи:

1. Разработать, изготовить и экспериментально апробировать установку по культивированию фототрофных микроорганизмов с применением светодиодных источников света.
2. Изучить влияние излучения монохроматических СД с различными спектральными характеристиками на рост и развитие светозависимых микроорганизмов.
3. Разработать и изготовить установки для изучения влияния прерывистого освещения на рост и развитие светозависимых организмов в условиях твердофазного (чашки Петри) и глубинного (колбы на качалках) культивирования.
4. Проверить совместимость динамических характеристик СД для использования в режимах микроимпульсного освещения.
5. Проверить известные по литературным данным одночастотные режимы микроимпульсного освещения на примере культивирования *Chlorella sp.*
6. Разработать системы культивирования светозависимых организмов с усовершенствованием алгоритмов импульсного освещения и проверить возможность снижения энергозатрат при выбранном алгоритме освещения.
7. Изучить влияние прерывистого освещения на биохимический состав биомассы микроорганизмов.

Научная новизна

- Показано, что светоизлучающие диоды по своим динамическим характеристикам могут быть использованы для реализации микроимпульсного освещения при культивировании светозависимых микроорганизмов;
- Разработана лабораторная установка для изучения влияния параметров микроимпульсного освещения на процесс культивирования светозависимых микроорганизмов в условиях твердофазного (чашки Петри) и глубинного (колбы на качалках) культивирования;
- Показано, что при использовании микроимпульсного освещения в «ночной» период циркадно-циклического режима достигается более заметное снижение удельных энергозатрат на образование биомассы, но эффект прерывистости зависит от уровня освещённости в период светового импульса;
- Установлено, что опубликованные в литературе режимы микроимпульсного освещения (10 мкс – световая фаза - и 10000 мкс – темновая) при круглосуточном режиме их применения не обеспечивают стабильного роста микроводоросли *Chlorella sp.*, соизмеримого по характеристикам с режимом постоянного освещения. То же относится к одночастотным режимам прерывания освещения с другими характеристиками;
- Предложен и экспериментально подтверждён суперпозиционный способ микроимпульсного освещения, в котором сочетаются низкочастотный и высокочастотный режимы импульсного освещения. При этом высокочастотный режим освещения подключается в период фазы отсутствия света в низкочастотном режиме. Установлено, что при определённом соотношении длительностей световых импульсов и фаз отсутствия света такой режим обеспечивает снижение удельных энергозатрат на получение биомассы в сравнении с режимом постоянного освещения в 10-50 раз;

- Показано, что биохимические характеристики биомассы микроводорослей, полученной в режимах постоянного и импульсного освещения, практически не различаются.

Положения, выносимые на защиту:

- Использование СД при культивировании светозависимых микроорганизмов для реализации микроимпульсного режима освещения с длительностью цикла микроимпульсов, соизмеримого с длительностями фаз фотосинтеза.

- Лабораторная установка для подбора режимов микроимпульсного освещения с реализацией варьируемой длительности световой и темновой фазы в процессе культивирования фототрофов (получено положительное решение о выдаче патента на эту установку по заявке №2010108212 от 18.11.2011.

- Установленный факт, что микроимпульсный режим освещения с одночастотным алгоритмом широтно-импульсной модуляции не обеспечивает стабильного протекания процессов культивирования микроводорослей *Chlorella sp.*

- Совмещённый импульсный режим освещения, в котором в период темновой фазы низкочастотного импульсного режима происходит включение высокочастотного импульсного режима освещения. Показано, что этот режим позволяет получить существенное снижение энергозатрат на выращивание микроводорослей *Chlorella sp.*

- Установленный факт, что биохимические характеристики биомассы *Chlorella sp.*, выращенной при микроимпульсном режиме освещения, практически не изменяются по сравнению с полученными при постоянном режиме освещения.

Практическая ценность результатов

- Найденные режимы прерывистого освещения могут быть применены для реализации промышленных систем культивирования микроводорослей при использовании искусственных источников света, что может дать существенную (двукратную и более) экономию по удельным энергозатратам.

- Техническая документация на разработанную установку передана в Институт промышленной биотехнологии МГУИЭ и ООО «Бигор-сервис».

- Разработанная установка без больших переделок может быть применена для поиска энергосберегающих условий выращивания высших растений при искусственном освещении (например, в парниковых хозяйствах).

- Установка используется в МГУИЭ для проведения лабораторных работ студентов и в научных исследованиях.

Область применения

Для многоцелевого культивирования светозависимых микроорганизмов в закрытых системах (в биореакторах): для получения биомассы светозависимых микроорганизмов, для получения ценных питательных веществ (биоактивные добавки, кормовая биомасса, биомасса с биотопливными составляющими), в сфере защиты окружающей среды (очистка стоков), для регенерации воздуха на земле и в космосе.

Апробация

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на: на выставках «НТТМ-2007» (диплом), «Химия – 2007», «NTMEX – 2007»; «Росбиотех – 2007» (медаль), «Rusnanotech-2008», «Росбиотех-2008» (медаль), «Мир биотехнологий-2009»; VI международной научно-практической конференции «Экологические проблемы промышленных мегаполисов» в 2009 году; научных конференциях студентов и молодых учёных МГУИЭ в 2008, 2009, 2010 годах; на конкурсе научных работ на соискание премии «Фонда им. Л.А. Костандова» – 2010 (медаль и премия). Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» в 2010 году, на VI Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» - 2011.

Публикация результатов

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 5 в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, получено положительное решение о выдаче патента на «Способ культивирования фототрофов и установку для его осуществления» по заявке №2010108212 от 18.11.2011.

Структура и объем диссертации

Материалы диссертации изложены на 208 страницах машинописного текста и включают 56 рисунков и 25 таблиц. Диссертация состоит из введения, 9 глав, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 228 научных источников и приложений (инструкция по эксплуатации: «Установка для культивирования светозависимых микроорганизмов с импульсным освещением»).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель исследований, научная новизна и практическая ценность полученных результатов, указан личный вклад соискателя.

1. Аналитический обзор литературы. Приведены основные работы, связанные с поставленной задачей поиска энергосберегающей технологии культивирования светозависимых микроорганизмов с применением СД. Разобраны основные этапы фотосинтетических реакций. Рассмотрены типы фотобиореакторов (ФБР) для культивирования светозависимых микроорганизмов. Обоснован выбор источников света, применённых в работе. Проведён анализ литературных данных с описанием исследований, посвящённых данной проблеме.

2. Материалы и методы. Объекты исследований – зелёные микроводоросли *Chlorella sp.* и *Scenedesmus rubescens*, а также каротинсинтезирующие дрожжи *Phaffia rhodozyma*. Для культивирования *Chlorella sp.* применяли среду Тамия (Сальникова М.Я, 1977), для *Scenedesmus rubescens* среды Сетлик и Сетлик-стресс (Griehl С. et al, 2010). В работе использованы светодиоды следующих типов: RL – 3W744 цветовая температура (Тс) 5000 К, мощность 0,06 Вт; светодиодные ленты типа SMD 3528, Тс = 5000 К, мощность 0,12 Вт, однотипные СД «EDIXEON»

с мощностью 1 Вт: JWEX-1LA1, $T_c = 3000-3500$ К; JWEB-1LA1 (460 – 475 нм), JWET-1LA2 (515 – 535 нм), JWER-1LA3 (620 – 630 нм).

Для изучения светодинамических характеристик СД использовали аналоговый (С1-68) и цифровые осциллографы (аналогово-цифровой преобразователь ЛА-50USB, осциллограф двухканальный запоминающий АСК-3002). Освещённость определяли с помощью люксметра ТКА-31.

Концентрацию биомассы микроорганизмов определяли по сухому весу и фотометрически по построенным градуировочным графикам зависимости оптической плотности от концентрации биомассы. Суммарные каротиноиды определяли путём экстракции ацетоном отмытой биомассы с одновременным разрушением клеток стеклянными бусами фирмы "Sigma" (425-600 мкм) на шейкере по методике, описанной в (Johnson E.A. et al., 1979) с использованием спектрофотометра "Shimadzu UV-120". Измерения проводили при длине волны 474 нм, (максимум поглощения астаксантина в ацетоне).

Температуру измеряли с помощью инфракрасного пирометра X-line pIRO-300. Для определения аминокислотного состава использовали ТСХ (тонкослойную хроматографию) в системе растворителей н-бутанол/уксусная кислота/вода с окрашивающим нингидриновым растворителем. Содержание белка в биомассе микроводорослей определяли по методу Кьельдаля, липидов – гравиметрическим методом, общих углеводов – антроновым методом. Определение массовой концентрации сахаров осуществляли по методу Бертрана.

Для статистической обработки данных определяли дисперсию воспроизводимости по выходному показателю (концентрации биомассы), усреднённую по всему массиву однотипных данных, и доверительный интервал с использованием критерия Стьюдента. Планирование эксперимента при поиске оптимального соотношения длительности световых импульсов и интервалов между импульсами проводили по схеме ортогональных латинских прямоугольников с расчётом эффектов на основе аддитивно-решетчатого и мультипликативно-решетчатого математического описания.

3. Роль затрат на освещение при культивировании светозависимых организмов с использованием традиционных источников света (люминесцентных ламп).

Экспериментально получена кривая зависимости освещённости от толщины слоя суспензии микроводоросли *Chlorella sp.* (концентрация 1 г/л) при освещённости со стороны источника излучения 10 клк (рис. 1).

Известно, что для интенсивного роста биомассы требуется освещённость в среднем не менее 5 клк. Из графика рис. 1 следует, что такая средняя освещённость слоя имеет место при толщине слоя порядка 2 – 3 см. Отсюда вытекают и требования

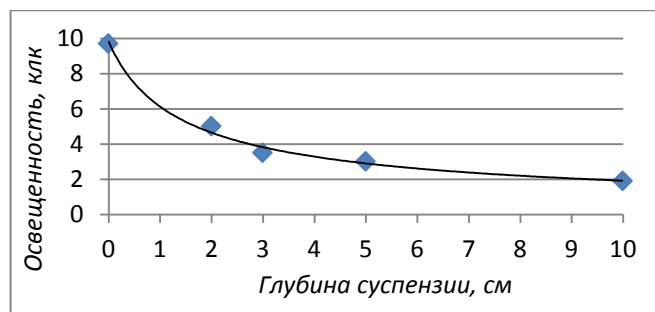


Рис. 1 Зависимость освещённости от глубины слоя суспензии *Chlorella sp.*

к конструктивному оформлению эффективного фотобиореактора: культуральная жидкость в рабочем объёме фотобиореактора должна быть «развёрнута» таким образом, чтобы эффективная площадь источника освещения была «покрыта» слоем жидкости такой толщины. Наиболее близко таким требованиям удовлетворяют панельные ФБР.

Нами проведён оценочный расчёт затрат энергии на освещение для модельного панельного реактора объёмом 100 л, площадь освещения 5000 м², при исходных данных использования стандартных люминесцентных светильников мощностью 72 Вт (0,36 м²). При толщине слоя 2 см, концентрации микроводоросли 1 г/л (по сухому весу), средней освещённости слоя 5 клк в расчёте принята средняя скорость роста биомассы 2 г/(л·сут). При этих условиях приведённые затраты электроэнергии (ЭЭ) только на освещение составляют 120 – 130 кВт·ч/кг сухой биомассы. Для сравнения, приведённые затраты на все энергетические нужды при культивировании хлебопекарных дрожжей составляют 1,6 кВт·ч/ кг сухой биомассы.

Отсюда видно, что задача снижения энергозатрат на освещение при культивировании светозависимых организмов является актуальной.

4. Разработка и испытание экспериментальных систем культивирования. Разработаны и введены в эксплуатацию следующие устройства:

- 1) Установка для культивирования светозависимых микроорганизмов на твёрдой среде с применением освещения разных спектров (рис. 2)
- 2) Установка для культивирования микроорганизмов на твёрдой среде – с возможностью регулирования частоты и длительности импульса периодического освещения. Максимальная освещённость каждой светодиодной лампы ≤ 1,5 клк (рис. 3)

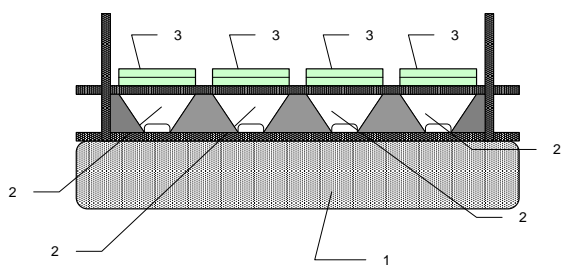


Рис. 2. Схема установки для культивирования светозависимых микроорганизмов на твёрдой среде с применением освещения разных спектров
1 – источник питания;
2 – светодиодная лампа с рефлектором;
3 – Чашка Петри с питательной средой и биомассой микроводорослей).

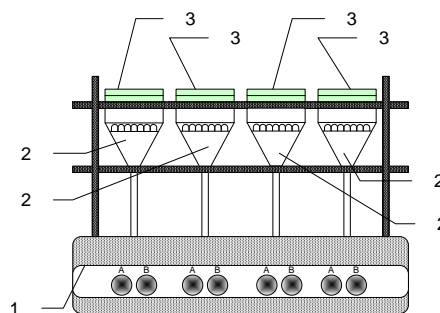
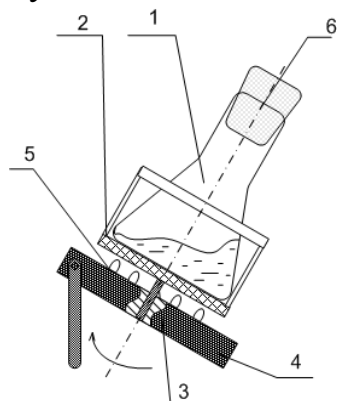


Рис. 3. Экспериментальная установка для микроимпульсного освещения с возможностью регулирования частоты и длительности импульса.
1 – генератор импульсов с возможностью регулирования частоты (A) и длительности импульса (B);
2 – светодиодная лампа с рефлектором;
3 – чашка Петри с питательной средой и биомассой микроводорослей.

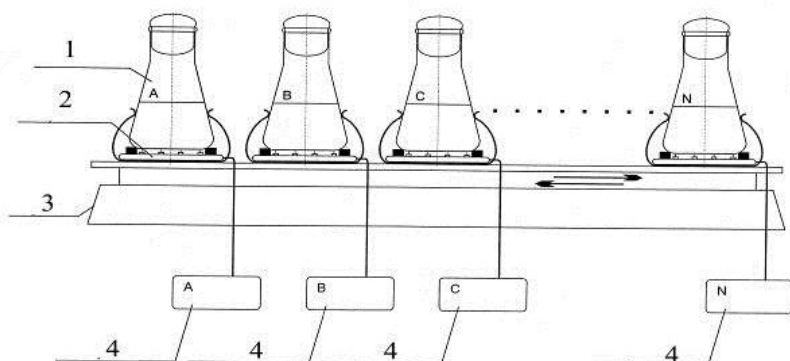
3) Наклонное устройство для глубинного культивирования в колбах (рис. 4). В установке предусмотрена возможность варьирования освещённости путём включения/выключения СД от 0 до 1800 лк.



- 1 – колба с суспензией микроорганизмов;
- 2 – прозрачная платформа с гнездом для колбы;
- 3 – вал;
- 4 – блок с вмонтированным внутри двигателем для перемешивания суспензии;
- 5 – светодиоды типа;
- 6 – ватная пробка для стерильного подвода воздуха из атмосферы внутрь колбы.

Рис. 4. Схема устройства для культивирования светозависимых микроорганизмов наклонного типа

4) Многоканальная установка для культивирования микроорганизмов с регулируемыми интервалами периодического освещения (рис. 5). Максимальная освещённость осветительного устройства 10 клк



- 1 – культиваторы (колбы);
- 2 – источник освещения – светоизлучающие диоды;
- 3 – шейкер;
- 4 – источник электропитания – генератор импульсов.

Рис. 5 Многоканальная установка для культивирования микроводорослей в жидкой среде с переменным периодическим освещением.

Проверено, удовлетворяют ли светодинамические характеристики СД с люминофором возможности реализации микроимпульсных режимов освещения, опубликованных в литературе (прямоугольные импульсы с длительностью от 10 мкс и интервалами между ними от 10000 мкс). Подтверждена прямоугольная форма светового импульса и отсутствие существенных её искажений при данных частотах (рис. 6).

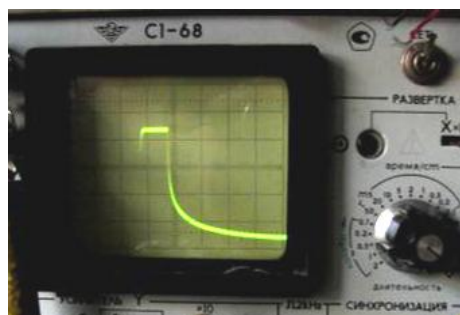


Рис. 6. Осциллограмма импульса

5. Постоянное (непрерывное) освещение в системах культивирования. Проведены эксперименты по культивированию светозависимых организмов при постоянном свете (белом или монохроматическом). Опыты вели

на установке для культивирования светозависимых микроорганизмов на твёрдой среде с применением освещения разных спектров.

Представленные в таблице 1 экспериментальные данные показывают, что хотя по накоплению биомассы зелёный свет показывает довольно высокие результаты, это объясняется просто аномально высокой освещённостью, создаваемой этими светодиодами при той же мощности, что и красные. После пересчёта прироста биомассы по отношению к освещённости (последняя графа таблицы) результаты согласуются с данными о влиянии различного спектра освещения, известными из литературы.

Таблица 1

Результаты экспериментов по влиянию монохроматических и белых СД при культивировании *Chlorella sp.*

Цвет излучения СД	Характеристики СД (цветовая температура / длина волны)	Энерго-потребление, Вт	Конечная концентрация биомассы, г/л	Освещённость, клк	Приведённая концентрация биомассы относительно освещённости, г/л/клк
Белый	3200 К	1	0,760	1,90	0,40
Синий	460-475 нм	1	0,136	1,18	0,12
Зелёный	515-535 нм	1	0,664	8,75	0,08
Красный	620-630 нм	1	0,696	5,20	0,13

Проведены также эксперименты по культивированию *Phaffia rhodozyma*, на наклонном устройстве для глубинного культивирования в колбах, где вели поиск оптимальной освещённости для синтеза микроорганизмами каротиноидов (астаксантина). Получены результаты эксперимента, демонстрирующие наличие экстремума по накоплению каротиноидов и по оптической плотности суспензии при освещённости в диапазоне от 0 до 1800 лк. При этом получена максимальная концентрация каротиноидов при освещённости 700 лк (сумма каротиноидов по астаксантину 6 мг/г).

6. Одночастотное микроимпульсное освещение. Основной задачей этого раздела являлась проверка режимов микроимпульсного освещения, в том числе соизмеримого по длительности с естественными фазами фотосинтеза (световой и темновой). Высказана гипотеза, что основная экономия может быть получена за счёт отказа от освещения в период «темновой» фазы, протекающей по законам ферментативной кинетики и не требующей света. Создание микроимпульсной системы создаёт синхронную культуру, в которой «зарядка» фотосинтетических центров происходит через определённые интервалы времени, в течение которых происходит «расходование» заряженных элементов за счёт их участия в ферментативных реакциях. Очевидно, что длительность времени, достаточного для завершения темновой фазы не может быть

постоянной, а зависит от условий культивирования, температуры, pH, концентраций некоторых субстратов и пр.

Проведены эксперименты на чашках Петри по одночастотному прерывистому освещению с различными длительностями светового импульса и интервалов между импульсами на установке для твердофазного культивирования микроорганизмов с возможностью регулирования частоты и длительности импульса периодического освещения.

Показано, что одночастотное прерывистое освещение с различными длительностями светового импульса (от 0,001 с до 0,00001 с) и интервалов между импульсами (0,01 с) не позволяют получить прирост биомассы относительно контроля свыше 13%, хотя при этом удельные затраты ЭЭ в всех случаях значительно меньше контроля. Применение прерывистого освещения с длительностью импульсов 0,00001 и 0,0001 с показало минимальный прирост биомассы. Однако удельные затраты ЭЭ относительно контроля снизились в 1,3 – 200 раз (в зависимости от длительности светового импульса).

Кроме того, данные эксперимента показывают, что полное подтверждение основной гипотезы не получено. Можно предположить, что при определённом наборе условий культивирования существует некая оптимальная длительность темновой фазы T_0 , которая является основой для выбора параметров прерывистого освещения. При величине длительности интервала T между световыми импульсами прерывистого микроимпульсного освещения $T \leq T_0$ можно ожидать, что микробная клетка «не почувствует» этой прерывистости, и скорость роста будет такой же, как и при постоянном освещении. Иначе говоря, относительный прирост биомассы $\Delta X_{\text{пр}}$ при прерывистом освещении к приросту при непрерывном $\Delta X_{\text{непр}}$ будет равен $\Delta X_{\text{пр}}/\Delta X_{\text{непр}}=1$. Наоборот, если длительность интервала $T > T_0$, то период $(T-T_0)$ будет непродуктивным для клетки, т.к. в этот период нет запаса «заряженных светом» фотосистем.

Следствием этой гипотезы является зависимость относительного прироста биомассы $\Delta X_{\text{пр}}/\Delta X_{\text{непр}}$ от длительности интервала T между световыми импульсами, представленная на рис. 7

Из графика следует, что снижение эффективности по сравнению с контролем может быть вызвано тем, что выбранная длительность темновой фазы была велика, и её следовало бы снизить. Очевидно, что эта величина (T_0) не является постоянной для всех фототрофных организмов, и её следует уточнять в эксперименте, учитывая также условия проведения процесса.

Циркадно-циклический режим освещения. Нами было выдвинуто предположение, что прерывистый тип освещения может быть успешно

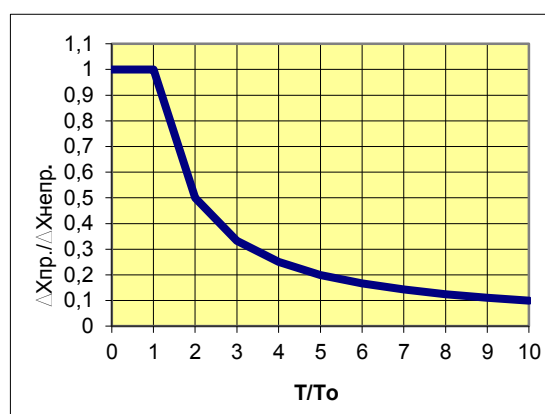


Рис. 7. Предполагаемая зависимость относительного прироста биомассы от длительности интервала между световыми импульсами при прерывистом освещении.

применён в условиях, когда все биохимические реакции замедляются в соответствии с внутренними ритмами самого организма (циркадными). Исходя из этого, было решено проверить влияние импульсного освещения на развитие микроорганизмов при условии применения его в «ночной период», поскольку освещение в течение всего периода ферментации микроорганизмов может быть необходимо лишь в биореакторах глубинного типа. В остальных же случаях культивирования фототрофов требуется искусственное освещение только ночью, а днём можно использовать естественное освещение, причём длительность необходимого «дневного» периода зависит от вида фототрофного организма и колеблется от 8 до 24 часов.

Длительность ночного периода в зависимости от времени года и географического положения того или иного региона меняется. В экспериментах варьировали длительность светового импульса и длительность «ночного» периода от 12 до 16 часов, культивирование вели на чашках Петри, освещённость до 1,5 клк. Результаты экспериментов представлены в табл. 2. Суточное чередование освещения, включающее постоянное (естественное) и прерывистое (искусственное) освещение, показало возможность снижения энергетических затрат не менее, чем в 6 – 8 раз, при применении импульсного освещения в течение 12 – 14 часов в сутки, в зависимости от длительности светового импульса (таблица 2).

Таблица 2

Применение импульсного освещения в качестве ночной подсветки

№	Темновой период, с	Световой импульс, с	Длительность ночного периода, ч	Относит. затраты ЭЭ, %	Относительный прирост, %	Удельные затраты ЭЭ
1.	Контроль (постоянный свет)		12	50	100	0,5
2.			14	58,3	100	0,583
3.			16	67,7	100	0,677
4.			24	100	100	1
5.	0,01	0,001	12	5	85,87	0,058
6.			14	5,83	80,30	0,073
7.			16	6,77	49,40	0,137
8.	0,01	0,0001	12	0,50	97,10	0,005
9.			14	0,583	70,45	0,006
10			16	0,677	33,02	0,021

На следующем этапе эксперименты вели в колбах на многоканальной установке для культивирования микроорганизмов с регулируемыми интервалами периодического освещения при максимально возможной освещённости до 10 клк. В эксперименте варьировали длительности светового импульса и темнового периода так, чтобы соотношение между ними оставалось одинаковым, равным 1 : 100 (результаты приведены в таблице 3). В этих

экспериментах моделировали 12-часовой «ночной период». Эти результаты показывают, что влияет на продуктивность не соотношение длительностей светового и темнового периодов импульсного освещения, а длительность циклов импульсного освещения. Кроме того, в целом по проведённым опытам показано, что относительный прирост при культивировании в колбах меньше, чем на чашках Петри. Это связано с рядом трудностей, которые могут возникать при проведении экспериментов в колбах (обрастание колб, выпадение осадка и пр.).

Таблица 3

Эксперименты по культивированию *Chlorella sp.* при одинаковом микроимпульсном соотношении «свет – темнота»

№	Длительность темнового периода, с	Длительность импульса света, с	Относит. затраты ЭЭ, %	Относит. прирост биомассы, %	Удельные затраты ЭЭ
1.	Постоянное		50	100	0,500
2.	100	1	0,5	45,2	0,011
3.	10	0,1	0,5	59,6	0,008
4.	1	0,01	0,5	45,2	0,011
5.	0,01	0,0001	0,5	27,4	0,018
6.	День/ночь		0	25,8	-

В ходе эксперимента отмечено повышение температуры на поверхности осветительных устройств в контроле (при постоянном освещении) – свыше 10° С относительно окружающей среды. В последующих экспериментах для более надёжных и точных результатов решено было проводить культивирование на чашках Петри. Было также предложено снизить температуру поверхности культиваторов путём их удаления от источников света на некоторое расстояние. Соответственно вследствие этого была снижена освещённость до 5 клк.

В дальнейших экспериментах (таблица 4) варьировали длительность темнового периода (0,01; 0,04; 0,07; 0,1 с) при постоянной длительности светового импульса 0,01 с, (освещённость 5 клк). Эти эксперименты проводили при различных длительностях «ночного периода» на многоканальной установке для культивирования микроорганизмов с регулируемыми интервалами периодического освещения.

Результаты экспериментов показали, что максимальный прирост биомассы был отмечен при длительности светового импульса от 0,1 с до 0,01, и длительности темнового периода от 0,04 до 0,07 с. При этом минимальные затраты ЭЭ на единицу биомассы без учёта «дневного прироста» характерны для режима с длительностью периодов 0,07/0,01 (они ниже, чем при постоянном освещении, в 4 – 6 раз).

Таблица 4

Относительный прирост биомассы *Chlorella sp.* в зависимости от длительности микроимпульсного темнового периода и «ночного периода»

№	Темновой период, с	Световой импульс, с	Длительность ночного периода, ч	Относит. затраты ЭЭ, %	Относительный прирост, %	Удельные затраты ЭЭ
1.	Контроль		-	100	100	1
2.	0,01	0,01	12	50	75,02	0,65
3.			14	50	50,03	1
4.			16	50	49,98	1
5.	0,04	0,01	12	20	83,69	0,24
6.			14	20	51,73	0,39
7.			16	20	49,15	0,41
8.	0,07	0,01	12	12,5	75,02	0,17
9.			14	12,5	49,15	0,25
10.			16	12,5	44,36	0,28
11.	0,1	0,01	12	9	57,60	0,16
12.			14	9	50,03	0,18
13.			16	9	35,46	0,25
14.	День/ ночь		12	0	37,15	-
15.			14	0	36,21	-
16.			16	0	29,03	-

Суперпозиционный способ микроимпульсного освещения. Известно, что в фототрофных организмах существуют две фотосистемы (Кретович В.Л., 1971), (Зитте П. с соавт., 2008). Каждая из них работает с разной длительностью. Было предложено синхронизировать прерывистое освещение, учитывая наличие этих (или каких-то других) двух фаз. Для этого было предложено наложить два типа прерывистого освещения друг на друга, получив таким образом «суперпозиционное» импульсное освещение.

В этом способе должны быть подобраны 4 параметра: длительности импульсов света и темноты в «быстрой» и «медленной» фазе. Для определения оптимальных значений этих параметров был проведён опыт по применению суперпозиционного освещения с использованием метода планирования эксперимента по схеме ортогональных латинских прямоугольников (табл. 5). Наилучшие эффекты (значения факторов, соответствующие минимальным удельным энергетическим затратам) выделены курсивом. Эффекты, рассчитанные аддитивным и мультипликативным способом, в основном совпадают. Минимальные приведенные затраты энергии контроля даёт вариант, в котором «собраны» частные минимумы по всем

факторам (быстрая фаза – свет - 0,01... 0,03 с, темнота – 1 с; медленная фаза – свет – 1 с, темнота – 3 с). Это показывает целесообразность применения суперпозиционного освещения.

Таблица 5

Результаты расчётов плана латинских прямоугольников по схемам аддитивно-решетчатого и мультипликативно-решетчатого описания процесса

Наименование фактора	Варьируемые значения, с	Эффект, % затрат энергии на % прироста биомассы	
		Аддитивная модель	Мультипликативная модель
Длительность светового импульса в медленной фазе (T_3)	0,1	+1,207	+0,192
	0,25	+0,880	+0,158
	0,5	-0,739	-0,085
	1	-1,338	-0,265
Длительность светового импульса в быстрой фазе (T_1)	0,05	+0,089	+0,004
	0,03	+0,055	-0,041
	0,02	-0,005	+0,005
	0,01	-0,140	+0,032
Длительность темнового периода в медленной фазе, (T_4)	3	-0,676	-0,114
	5	-0,165	-0,039
	7	+0,345	+0,086
	10	+0,496	+0,067
Длительность темнового периода в быстрой фазе (T_2)	0,5	-0,579	-0,086
	1	-0,428	-0,085
	2	+0,071	+0,027
	3	+0,936	+0,144

На основе полученной картины влияния факторов была намечена и реализована дополнительная серия экспериментов, в результате которой показано, что при $T_1=0,01$ с, $T_2 = 0,01; 0,04$ с и $T_3 = 1$ с и $T_4 = 2$ с может быть достигнута экономия ЭЭ в 10 - 50 раз.

8. Биохимические характеристики биомассы, полученные в режимах постоянного и прерывистого освещения. Изучены две опытные партии *Chlorella sp.*, полученные методом глубинного культивирования в колбах на универсальном устройстве для культивирования со светодиодными осветительными устройствами шейкере. Первая партия была получена в условиях постоянной освещённости, вторая – в условиях замены в течение 12 часов постоянного света на импульсный («светомодулированная» биомасса микроводорослей). Проверен биохимический состав биомассы (белки, жиры, углеводы), аминокислотный состав, а также содержание витаминов. Показано,

что замена постоянного освещения на импульсное практически не изменила пищевую ценность полученного продукта.

9. Перспективы снижения энергетических затрат при культивировании *Chlorella sp.* Рассмотрены различные пути энергосбережения при культивировании светозависимых микроорганизмов: замена источников света на светодиодные лампы (снижение затрат ЭЭ на 50%); использование естественного освещения в дневной период суток; применение СД ламп с импульсным режимом освещения (снижение затрат ЭЭ на 75% и более, относительно стандартных источников света). Снижение энергозатрат может быть достигнуто также использованием естественного освещения в дневной период суток. Возможны различные комбинации вышеописанных методов. Приведены ориентировочные расчёты экономии для фотобиореактора объёмом 100 м³.

Основные результаты и выводы

1. Проведен сравнительный анализ доступных источников света для культивирования светозависимых микроорганизмов и на его основе предложено использовать для этой цели светодиодные источники света.
2. Разработаны, изготовлены и испытаны экспериментальные установки с применением светодиодов для изучения влияния спектрального состава света, параметров импульсного и микроимпульсного режимов освещения при культивировании светозависимых микроорганизмов.
3. Показано, что по светодинамическим характеристикам белые и монохроматические светодиоды могут быть использованы для реализации микроимпульсного освещения с частотой до 1000 Гц и длительностью импульса прямоугольной формы от 10 мкс.
4. Установлено, что белые светодиоды обеспечивают более высокую продуктивность при культивировании микроводорослей *Chlorella sp.*, а среди монохроматических наиболее эффективны светодиоды с длинами волн 620-630 нм излучения.
5. Установлено, что опубликованные в литературе режимы микроимпульсного освещения с частотой 1000 Гц (длительность световой фазы 10 мкс, темновой – 10000 мкс) при круглосуточном режиме их применения не обеспечивают стабильного роста микроводорослей *Chlorella sp.*, соизмеримого по характеристикам с режимом постоянного освещения. То же относится к одночастотным режимам прерывания освещения с другими характеристиками.
6. Показано, что при использовании микроимпульсного режима освещения в «ночной» период циркадно-циклического режима достигается более заметное снижение удельных энергозатрат на образование биомассы (не менее, чем в 6-8 раз, в зависимости от длительностей импульсов света и интервалов между ними), но эффект прерывистости зависит от уровня освещённости в период светового импульса.

7. Предложен суперпозиционный метод микроимпульсного освещения, учитывающий наличие двух фотосистем в биохимическом механизме фотосинтеза. По этому методу освещение включает два импульсных режима с широтно-импульсной модуляцией – низкочастотный и высокочастотный, причём высокочастотный режим функционирует в «темновых» интервалах низкочастотного режима.
8. С использованием планирования эксперимента по схеме ортогональных латинских прямоугольников получены принципиальные зависимости прироста биомассы и удельных затрат электроэнергии от параметров суперпозиционного режима – длительностей световых импульсов и интервалов между ними для низкочастотной и высокочастотной составляющей суперпозиционного режима микроимпульсного освещения.
9. На основе полученных зависимостей спланирована и реализована серия экспериментов, в которой получены варианты суперпозиционного режима освещения, обеспечивающие снижение энергозатрат на получение биомассы микроводорослей в 10 – 50 раз по сравнению с режимом постоянного освещения при незначительном снижении общего прироста биомассы.
10. Показано, что биохимические характеристики биомассы микроводорослей, полученной в режимах постоянного и импульсного освещения, практически не различаются.

Список опубликованных работ

1. Мальцевская Н.В. Лабораторный комплекс по исследованию и производству фототрофов/ Мальцевская Н.В. // Научно-практическая конференция «Научно-техническое творчество молодёжи – путь к обществу, основанному на знаниях»: Сборник научных докладов/ Мос. гос. строит, ун-т - М.: МГСУ. – 2007. – с. 254–255.
2. Мальцевская Н.В. Культивирование *Chlorella sp.* на твёрдой среде при применении освещения с различными длинами волн/ Мальцевская Н.В., Бирюков В.В.//Научная конференция студентов и молодых учёных МГУИЭ: Тезисы докладов - М.: МГУИЭ. – 2008. – с. 3.
3. Мальцевская Н.В. Культивирование фотосинтезирующих микроорганизмов с применением полупроводниковых источников света с заданными спектральными характеристиками/ Мальцевская Н.В. // Экологические проблемы индустриальных мегаполисов: Сборник трудов VI международной научно-практической конференции. – М.: МГУИЭ. – 2009. – 85–86 с.
4. Мальцевская Н.В. Культивирование *Chlorella sp.* на твёрдой среде при применении освещения с различными длинами волн. / Мальцевская Н.В. // Химическое и нефтегазовое машиностроение. – 2009. – №2. – с. 15.
5. Прохорова А.И. Влияние параметров освещённости на рост и биосинтез астаксантина дрожжами *Phaffia rhodozyma* / Прохорова А.И., Мальцевская Н.В. // Научная конференция студентов и молодых учёных МГУИЭ: Тезисы докладов. - М.: МГУИЭ. – 2009. – с. 95–96.

6. Мальцевская Н.В. Перспективы энергосбережения при биоутилизации газовых выбросов, содержащих CO₂/ Мальцевская Н.В. // Материалы Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2010 – с. 108–109
7. Мальцевская Н.В. Импульсное освещение для снижения энергозатрат на основе светодиодов при культивировании фотосинтезирующих микроводорослей/ Мальцевская Н.В. // Научная конференция студентов и молодых учёных МГУИЭ: Тезисы докладов. В 2-х т. Т.1 – М.: МГУИЭ. – 2010. – с. 3–4.
8. Мальцевская Н.В. Применение импульсных светодиодных источников света для снижения энергозатрат при культивировании фотосинтезирующих микроорганизмов/ Мальцевская Н.В., Бирюков В.В. // Химическое и нефтегазовое машиностроение. – 2010. –N 11. – с. 9
9. Мальцевская Н.В. Влияние прерывистого освещения на процесс роста фототрофного микроорганизма *Chlorella sp.*/ Мальцевская Н.В., Бирюков В.В. // Биотехнология. – 2011. – №1. – с. 47–52.
10. Мальцевская Н.В. Применение мерцающего света при культивировании *Chlorella sp* как способ снижения энергозатрат при очистке стоков и газовых выбросов/ Мальцевская Н.В., Бирюков В.В. // Вода: химия и экология. – 2011. – №2. – с. 13–17.
11. Мальцевская Н.В. Культивирование фототрофных организмов при суперпозиции двух режимов микроимпульсного освещения/ Мальцевская Н.В., Бирюков В.В., Макеев П.П., Мальцевский В.В. // Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», часть 2 (Москва, 21-25 марта, 2011 г.) М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", РХТУ имени Д.И. Менделеева. – 2011. – с. 420–421.
12. Мальцевская Н.В. Пищевая ценность биомассы фототрофов, выращенных в искусственных системах/ Мальцевская Н.В., Тулякова Т.В. // Пищевая промышленность. – 2011. – №5, с. 72–73.
13. Заявка на патент № 2010108212/10 Бирюков В.В., Макеев П.П., Мальцевский В.В., Мальцевская Н.В. Способ культивирования фототрофов и установка для его осуществления. Положительное решение о выдаче патента на изобретение от 18.11.2011.