



ТЕХНОЛОГИЯ ХИМИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ДРЕВЕСИНЫ И ПРОИЗВОДСТВО ДРЕВЕСНО-ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИТОВ

Научная статья

УДК 57.083.1

DOI: 10.37482/0536-1036-2023-6-162-175

Культивирование *Dunaliella salina* на питательной среде из нейтрально-сульфитных щелоков

Р.А. Иксанов¹, аспирант; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4043-6779>

А.В. Канарский¹, д-р техн. наук; ResearcherID: [O-8113-2016](https://orcid.org/0000-0002-3541-2588),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3541-2588>

З.А. Канарская¹, канд. техн. наук; ResearcherID: [AAG-2997-2020](https://orcid.org/0000-0002-8194-6185),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8194-6185>

В.М. Гематдинова², канд. техн. наук; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2777-3842>

Е.В. Белкина³, инж.

¹Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. Карла Маркса, д. 68, г. Казань, Россия, 420015; rishat.iksanov@yandex.com[✉], alb46@mail.ru, zosya_kanarskaya@mail.ru


²Казанский инновационный университет им. В.Г. Тимирязова, ул. Московская, д. 42, корп. 1, г. Казань, Россия, 420111; venera.nas14@yandex.ru

³ООО «Прикамский картон», ул. Бумажников, д. 1, г. Пермь, Россия, 614037; ekaterina.Belkina@pcbkr.ru

Поступила в редакцию 08.01.23 / Одобрена после рецензирования 16.04.23 / Принята к печати 21.04.23

Аннотация. Установлена эффективность культивирования микроводорослей *Dunaliella salina* на питательной среде из нейтрально-сульфитных щелоков, полученных при варке целлюлозы из древесины березы, с дополнительным внесением хлорида натрия. Микроводоросли *D. salina* выделены из донного осадка Кояшского озера Керченского полуострова. Показано, что на физиологическую активность микроводорослей влияет количество внесенного в питательную среду хлорида натрия. При добавлении в питательную среду до 5 % хлорида натрия микроводоросли *D. salina* проявляют галотолерантные свойства. С увеличением количества хлорида натрия до 30 % – галофильные свойства. Наилучшие кинетические характеристики роста *D. salina* при культивировании на питательной среде из нейтрально-сульфитных щелоков отмечены при галофильной физиологической активности. Выход биомассы микроводорослей *D. salina* при культивировании на питательной среде из нейтрально-сульфитных щелоков без внесения и при внесении 5 % хлорида натрия выше по сравнению с добавлением 15 и 30 % хлорида натрия. Однако накопление белка имеет противоположную зависимость, в частности, количество белка в культуральной жидкости с 15 и 30 % хлорида натрия больше, чем при содержании хлорида натрия 5 %. С увеличением продолжительности культивирования до 240 ч наблюдается снижение pH питательной среды с 7,04 до 4,70, что обусловлено усвоением микроводорослями минерального и связанного с органическими веществами азота, присутствующего в питательной среде

© Иксанов Р.А., Канарский А.В., Канарская З.А., Гематдинова В.М., Белкина Е.В., 2023

 Статья опубликована в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии CC BY 4.0

из нейтрально-сульфитных щелоков. Установлено, что при культивировании микроводоросли ассимилируют как редуцирующие, так и красящие вещества, присутствующие в питательной среде, следствием является интенсивный рост клеток. При увеличении продолжительности культивирования микроводорослей наблюдается рост числа клеток в культуральной жидкости до $4 \cdot 10^6$ кл./мл, при этом они синтезируют внеклеточный фермент ксиланазу, что способствует дополнительному образованию редуцирующих веществ в питательной среде за счет ферментативного гидролиза ксилана. Результаты исследований показывают перспективность использования нейтрально-сульфитных щелоков в биотехнологии при культивировании микроводорослей *D. salina* для получения биопродуктов.

Ключевые слова: нейтрально-сульфитный щелок, галофилы, микроводоросли *Dunaliella salina*, физиологическая активность, кинетические характеристики роста, выход биомассы, белок

Для цитирования: Иксанов Р.А., Канарский А.В., Канарская З.А., Гематдинова В.М., Белкина Е.В. Культивирование *Dunaliella salina* на питательной среде из нейтрально-сульфитных щелоков // Изв. вузов. Лесн. журн. 2023. № 6. С. 162–175. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2023-6-162-175>

Original article

Cultivation of *Dunaliella salina* Microalgae in the Nutrient Medium from Neutral-Sulfite Alkalis

Rishat A. Iksanov¹, Postgraduate Student;

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4043-6779>

Albert V. Kanarsky¹, Doctor of Engineering; ResearcherID: [O-8113-2016](https://orcid.org/0000-0002-3541-2588),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3541-2588>

Zosya A. Kanarskaya¹, Candidate of Engineering; ResearcherID: [AAG-2997-2020](https://orcid.org/0000-0002-8194-6185),

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8194-6185>

Venera M. Gematdinova², Candidate of Engineering;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2777-3842>

Ekaterina V. Belkina³, Engineer

¹Kazan National Research Technological University, ul. Karl Marx, 68, Kazan, 420015, Russian Federation; rishat.iksanov@yandex.com[✉], alb46@mail.ru, zosya_kanarskaya@mail.ru

²Kazan Innovation University named after V.G. Timiryasov, ul. Moscovskaya, 42, Kazan, 420111, Russian Federation; venera.nas14@yandex.ru

³ООО “Prikamsky cardboard”, ul. Bumazhnikov, 1, Perm, 614037, Russian Federation; ekaterina.Belkina@pcb.ru

Received on January 8, 2023 / Approved after reviewing on April 16, 2023 / Accepted on April 21, 2023

Abstract. The effectiveness of cultivation of microalgae *Dunaliella salina* in the nutrient medium from neutral-sulfite alkalis obtained during the production of cellulose from birch wood, with additional sodium chloride addition was established. *D. salina* microalgae were isolated from the bottom sediment of the Koyash Lake of the Kerch Peninsula. It was shown that the physiological activity of microalgae was affected by the amount of sodium chloride introduced into the nutrient medium. When up to 5 % sodium chloride is added

to the nutrient medium. *D. salina* microalgae exhibit halotolerant properties when up to 5 % of sodium chloride is added to the nutrient medium. With an increase in the amount of sodium chloride introduced up to 30 %, *D. salina* culture exhibits halophilic properties. The best kinetic characteristics of the growth of *D. salina* when cultivated in the nutrient medium from neutral sulfite alkalis were observed at halophilic physiological activity. The yield of biomass of *D. salina* microalgae when cultivated in the nutrient medium without and when 5 % sodium chloride was added to the nutrient medium from neutral-sulfite alkalis is higher compared to the addition of 15 and 30 % sodium chloride to the nutrient medium. However, the accumulation of protein has an opposite dependence, in particular, the protein content of the culture fluid, in which 15 and 30 % sodium chloride was applied is higher than that when 5 % sodium chloride was applied. With an increase in the duration of cultivation up to 240 hours, a decrease in the pH of the nutrient medium from 7.04 to 4.70 was observed, this was due to the assimilation by microalgae of mineral and organic-bound nitrogen present in the nutrient medium from neutral-sulfite alkalis. It was established that during cultivation microalgae assimilate both reducing substances and coloring substances present in the nutrient medium, which results in intensive cell growth. With an increase in the duration of cultivation of microalgae, an increase in the number of cells in the culture fluid to $4 \cdot 10^6$ cl/ml was observed, which at the same time synthesize the extracellular enzyme xylanase, which contributes to the additional formation of reducing substances in the nutrient medium due to the enzymatic hydrolysis of xylan. The obtained research results show the prospects of using neutral-sulfite alkalis in biotechnology in the cultivation of *D. salina* microalgae for the production of biological products.

Keywords: neutral-sulfite liquor, halophiles, *Dunaliella salina* microalgae, physiological activity, kinetic characteristics of growth, biomass yield, protein

For citation: Iksanov R.A., Kanarsky A.V., Kanarskaya Z.A., Gematdinova V.M. Cultivation of *Dunaliella salina* Microalgae in the Nutrient Medium from Neutral-Sulfite Alkalis. *Lesnoy Zhurnal* = Russian Forestry Journal, 2023, no. 6, pp. 162–175. (In Russ.). <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2023-6-162-175>

Введение

На предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности при производстве целлюлозы, бумаги, картона и других видов продукции образуются вторичные ресурсы переработки древесины, различающиеся по физико-химическим свойствам. Значительное количество вторичных ресурсов в растворенном состоянии аккумулируется в технологических средах: в варочных и отбельных растворах, а также в концентрированных промывных водах. Состав веществ, попадающих в технологические среды, разнообразен и зависит от вида используемого древесного сырья, способов получения волокнистых полуфабрикатов и изготовления из них конечных продуктов. Химическая и гидробаротермическая обработка древесного сырья и волокнистых полуфабрикатов сопровождается растворением компонентов древесины в технологических средах. Дальнейшее разделение волокнистых полуфабрикатов и компонентов древесины ведет к образованию щелоков, а многократное использование промывной воды обуславливает концентрирование в них веществ в виде высокодисперсной клетчатки и растворенных высокомолекулярных и низкомолекулярных органических и минеральных веществ [1].

Технологические среды целлюлозных производств содержат олиго- и моносахариды (ксиланы, маннаны, маннозы, галактаны), органические кислоты,

фурфурол, смолы и т. п. Эти среды окрашены в коричневый, желтоватый или серовато-коричневый цвета, что объясняется присутствием в них растворенных фрагментов лигнина.

Неорганические вещества в технологических средах также разнообразны, их состав определяется минеральными веществами, присутствующими в древесине, и химическими реагентами, применяемыми для получения волокнистых полуфабрикатов (преимущественно это соединения натрия, серы и хлора) [2].

Использование вторичных ресурсов, содержащихся в жидких технологических средах (щелоках сульфат-целлюлозного производства), сводится к термической регенерации химикатов и сжиганию органических веществ с получением тепловой энергии, что экономически оправдано. Из сульфитных, бисульфитных и нейтрально-сульфитных щелоков получают лигносульфонаты. Углеводы сульфитных щелоков используют в качестве субстратов при производстве кормовых дрожжей, этанола. В этом случае требуется предварительная подготовка щелоков к биохимической переработке, которая заключается в удалении из среды веществ, отрицательно влияющих на жизнедеятельность микроорганизмов. Исследуется возможность комплексной биохимической переработки бисульфитных и нейтрально-сульфитных щелоков с получением кормового белка и молочной кислоты [3]. Однако для реализации такой технологии также необходима предварительная подготовка щелоков с превращением их в безопасные для микроорганизмов субстраты, что увеличивает затраты на организацию производства биопродуктов. В этой связи целесообразен поиск микроорганизмов, способных адаптироваться к веществам, присутствующим в щелоках (без предварительной обработки), и синтезировать необходимые биопродукты [4].

Анализ публикаций позволяет сделать вывод об интересе ученых и инженеров к использованию в биотехнологии микроорганизмов, обладающих галофильными свойствами [5]. Галофильные микроорганизмы способствуют биодеградации некоторых опасных органических и неорганических соединений как в аэробных, так и в анаэробных условиях [6, 7, 9, 10]. Сточные воды, содержащие высокие концентрации данных соединений, обрабатываются этими бактериями в гиперсалиновых средах. Биоремедиация тяжелых металлов, таких как кадмий, ртуть, мышьяк и т. д., из сточных вод осуществляется галофильными бактериями. Соединения, например фенол, формальдегид, фосфорорганические и др., успешно разлагаются галофильными бактериями, включая представителей семейств Halomonadaceae, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, которые разлагают нефтяные углеводороды в солевых условиях и зарекомендовали себя как деструкторы углеводородов [11]. Ввиду своих особенностей многие галофильные организмы могут использоваться для очистки сточных вод, т. к. данные среды имеют достаточную соленость, содержат различные органические кислоты и пентозные сахара. Предполагается, что галофилы можно применять в устойчивых биоэнергетических технологиях для преодоления ожидаемой нехватки нефти и проблем, связанных с глобальным потеплением [12, 22].

Исследователи обращают внимание на микроводоросли *Dunaliella salina*, которые рекомендуется использовать в различных отраслях промышленности

для переработки вторичных ресурсов производства [12]. Свойство микроводорослей *D. salina* существовать в средах с высокой концентрацией органических соединений и способность удалять токсичные продукты производства из сточных вод обуславливают перспективность данного вида для применения при получении ферментов в целях дальнейшего использования в биотехнологии. Показано, что микроводоросли *D. salina* синтезируют β -каротиноиды при культивировании на дешевых питательных средах, приготовленных из вторичных ресурсов фармацевтической промышленности, производства красителей, пищевых добавок и т. д. [13]. Микроводоросли *D. salina* возможно использовать в качестве индикатора различных токсичных соединений, находящихся в кормовых продуктах. Ввиду чувствительности данных микроорганизмов к оксидам металлов, отравляющим компонентам, микроводоросли *D. salina* позволяют контролировать загрязнение воздушного пространства [14, 15]. В некоторых работах указано, что в результате химических реакций друг с другом микроводоросли способны реагировать с различными штаммами микроорганизмов для синтеза фосфорных соединений. Данным симбиозом можно ускорить вывод токсичных элементов в средах для обеспечения образования нитратов и сокращение химического потребления кислорода. Благодаря осмотическим свойствам микроорганизмы *D. salina* способны выдерживать экстремальные условия существования и синтезировать такое вещество, как гидроксипутират [8, 16–19].

Цель – рассмотрение возможности культивирования микроводорослей *D. salina* на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока.

Для достижения поставленной цели было определено влияние внесенного хлорида натрия и температуры культивирования:

на усвоение углеводов нейтрально-сульфитного щелока микроводорослями *D. salina*;

на кинетические параметры роста микроводорослей *D. salina* при культивировании на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока;

на синтез биомассы и белка при культивировании *D. salina* на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования были микроводоросли *D. salina*, выделенные из донных осадков Кояшского озера Керченского полуострова. Пробу отбирали во время цветения поверхности озера красным цветом. Для анализа использовали культуру, по фенотипическим признакам соответствующую колонии микроводоросли *D. salina*: форма – круглая, цвет – желто-оранжевый, поверхность – гладкая, непрозрачная, профиль – плоский, край – гладкий. Культивирование микроводорослей на питательной среде Гисса показало, что выделенная из донного осадка культура имеет сахаролитическую активность.

Для приготовления питательной среды использовали нейтрально-сульфитный щелок, образующийся при получении целлюлозы высокого выхода (55 %) из березы. Нейтрально-сульфитный щелок имел следующие характеристики: сухих веществ – 9,4 %; взвешенных веществ – 1000 мг/л; редуцирующих веществ (РВ) – 5,3 %; зольность – 27,4 %; рН – $5,3 \pm 0,2$; сера в органическом

соединении, лигнин и лигносульфонаты – 2,58; 16,00 и 45,00 % в пересчете на сухое вещество соответственно; остаточное содержание SO_2 – 24,16 г/л в ед. SO_2 . Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определен углеводный состав нейтрально-сульфитного щелока (г/л):

Арабиноза.....	1,21±0,12
β-дезоксиглюкоза.....	0,58±0,06
Целлобиоза.....	61,14±6,11
Фруктоза.....	9,04±0,90
Галактоза.....	2,02±0,20
Глюкоза.....	5,21±0,52
Рамноза.....	1,07±0,11
Ксилоза.....	3,14±0,31
Манноза.....	менее 0,1

В питательную среду для культивирования микроводорослей дополнительно вносили хлорид натрия в количестве 5, 10, 15 и 30 % по отношению к общей массе нейтрально-сульфитного щелока. Для сравнения использовали питательную среду без хлорида натрия.

Непрерывное культивирование микроводорослей проводили на водном шейкере New Brunswick Scientific Innova 3100/C76 (США), варьируя температуру от 15 до 35 °С, при 140 об./мин в помещении с повторно-кратковременной освещенностью 300 лм/м² в течение 12 ч и 12-часовым отсутствием освещения.

Физиологическую активность культивируемых микроводорослей контролировали: по изменению оптической плотности культуральной жидкости, измеренной на фотометре КФК-2 при длине волны 540 нм; путем определения количества клеток в соответствии с принятой в микробиологии методикой; по изменению рН, потреблению РВ и накоплению биомассы. Определение рН культуральной жидкости проводили на приборе рН-150МИ (Россия). Подсчет количества клеток – на микроскопе Olympus CX43 (Япония) с использованием счетной камеры Горяева. Установление содержания восстанавливающих сахаров (РВ) – по методике [20]. Расчет кинетических характеристик роста микроводорослей – по принятой в микробиотехнологии методике [21]. Ксиланазную активность определяли стандартным методом [23]. Выход синтезируемой биомассы – взвешиванием осадка, выделенного из культуральной жидкости центрифугированием при 8000 об./мин в течение 15 мин и последующей сушкой. Содержание белка устанавливали методом Бредфорда по ГОСТ 31488–2012 «Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности ксиланазы» с использованием спектрофотометра Tecaninfinite M200 Pro (Австрия) при длине волны 595 нм.

Полученные экспериментальные результаты обрабатывали в программе Microsoft Excel (версия 15.05.05501.1000).

Результаты исследования и их обсуждение

Предварительные исследования с внесением 10 % хлорида натрия в питательную среду из нейтрально-сульфитного щелока при продолжительности культивирования 240 ч показали, что температура культивирования микрово-

дорослей влияет на содержание РВ, оптическую плотность (A) и рН культуральной жидкости (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние температуры культивирования на содержание РВ,
 A и рН культивируемой жидкости**
**The effect of cultivation temperature on the РВ, optical density and рН
of the cultivated liquid**

Показатель	Температура культивирования, °С				
	15	20	25	30	35
РВ, %	0,62	0,38	0,48	0,38	0,29
A	0,45	0,58	0,44	0,56	0,53
рН	6,09	6,00	6,27	6,93	6,94

При внесении хлорида натрия в питательную среду и с ростом температуры культивирования увеличивается потребление микроводорослями РВ, повышаются оптическая плотность и рН культуральной жидкости.

При варьировании температуры глубинного культивирования микроводорослей от 15 до 35 °С при внесении 10 % хлорида натрия в питательную среду из нейтрально-сульфитного щелока и продолжительности культивирования 240 ч установлено, что увеличение температуры культивирования благоприятно влияет на ростовые характеристики культуры *D. salina* (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние температуры культивирования на удельную скорость роста
и продолжительность генерации клеток микроводорослей *D. salina***
**The effect of the cultivation temperature on the specific growth rate
and cell generation time of *D. salina* microalgae cells**

Температура культивирования, °С	Удельная скорость роста культуры, ч ⁻¹	Продолжительность деления (генерации) клетки, ч
5	0,01	6,93
10	0,01	6,93
15	0,07	9,91
25	0,71	1,36
30	0,36	1,93

Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что при внесении 10 % хлорида натрия в питательную среду из нейтрально-сульфитного щелока и с увеличением температуры культивирования повышается удельная скорость роста культуры и снижается продолжительность генерации клеток. При этом, согласно полученным результатам, благоприятной температурой культивирования микроводорослей *D. salina* является 25 °С.

Дальнейшее определение взаимного влияния продолжительности культивирования и количества внесенного хлорида натрия на эффективность культивирования микроводорослей *D. salina* на питательной среде, приготовленной из нейтрально-сульфитного щелока, проводили при температуре 25 °С.

На рис. 1 представлены результаты, отражающие влияние внесения хлорида натрия и продолжительности культивирования микроводорослей *D. salina* на питательной среде, приготовленной из нейтрально-сульфитного щелока, на рН культуральной жидкости. С увеличением продолжительности культивирования до 384 ч наблюдается снижение рН питательной среды и усвоение микроводорослями минерального и связанного с органическими веществами азота, присутствующего в питательной среде. Изменение рН среды связано с осмотическими свойствами микроорганизмов *D. salina*: их клетки выделяют кислотные соединения для создания пленки, препятствующей воздействию молекул NaCl на жизнеобеспечение организмов. Стоит также упомянуть, что чем больше концентрация NaCl в среде, тем более значительно изменяется ее рН, как видно на рис. 1, где рН для среды с концентрацией хлорида натрия 30 % снизилось с 5,32 до 4,90. Влияние содержания солей в питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока и продолжительности культивирования микроводорослей на рН описывается параболой с максимумом 6,05, что совпадает с графическим значением рассматриваемого показателя при продолжительности культивирования 96 и 144 ч.

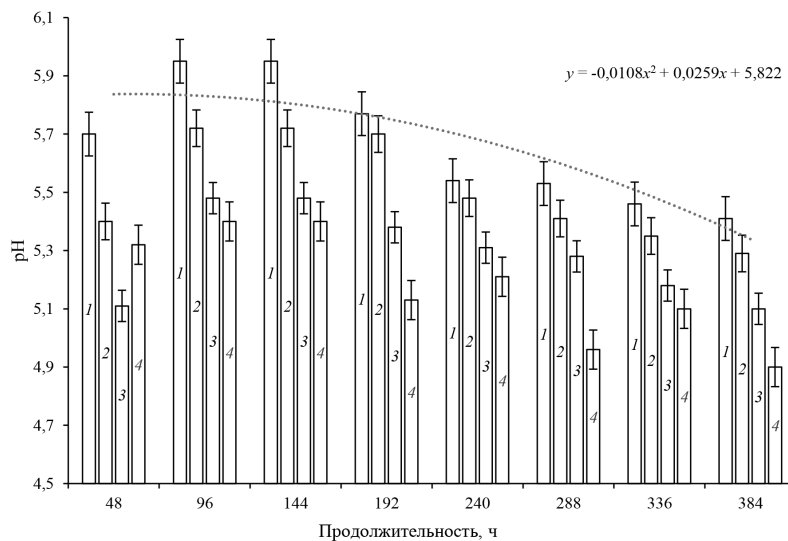


Рис. 1. Влияние внесения 0 (1), 5 (2), 15 (3) и 30 (4) % хлорида натрия и продолжительности культивирования *D. salina* на рН питательной среды из нейтрально-сульфитного щелока

Fig. 1. The effect of 0 (1), 5 (2), 15 (3) and 30 (4) % sodium chloride application and duration of *D. salina* cultivation on the pH of neutral-sulfite alkaline nutrient medium

Оптическая плотность культуральной жидкости на отрезке культивирования микроводоросли до 240 ч снижается, что обусловлено ассимилированием микроводорослями окрашенных веществ, присутствующих в питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока (рис. 2). В этот период культивирования наблюдается потребление микроводорослями РВ (рис. 3) и интенсивный рост микроводорослей, что подтверждается результатами определения количества клеток, представленными на рис. 4. При увеличении продолжительности культивирования микроводорослей более 240 ч наблюдается рост оптической плот-

ности культуральной жидкости, что, видимо, связано с продолжением роста микроводорослей и выделением внеклеточных белковых веществ, в частности ферментов, гидролизующих углеводы.

На биокаталитические реакции гидролиза углеводов в питательной среде ферментами, выделяемыми микроводорослями, указывает рост концентрации РВ в культуральной жидкости (рис. 3).

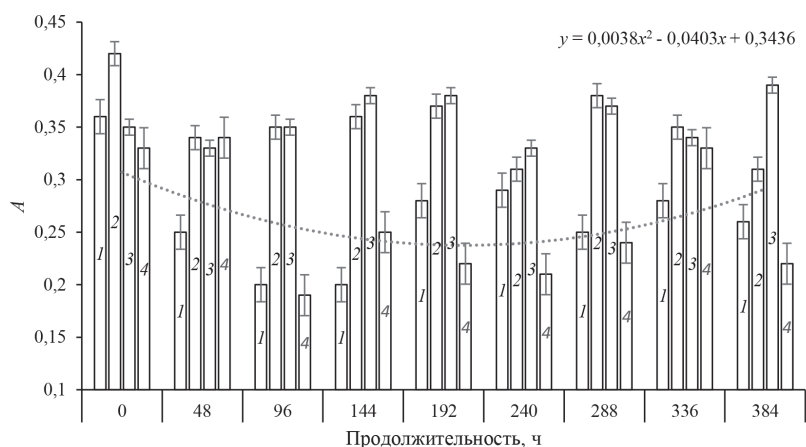


Рис. 2. Влияние количества внесенного хлорида натрия и продолжительности культивирования *D. salina* на оптическую плотность питательной среды из нейтрально-сульфитного щелока (условные обозначения 1–4 те же, что на рис. 1)

Fig. 2. The effect of the amount of added sodium chloride and duration of *D. salina* cultivation on the optical density of neutral-sulfite alkalis nutrient medium (symbols 1–4 are the same as in Fig. 1)

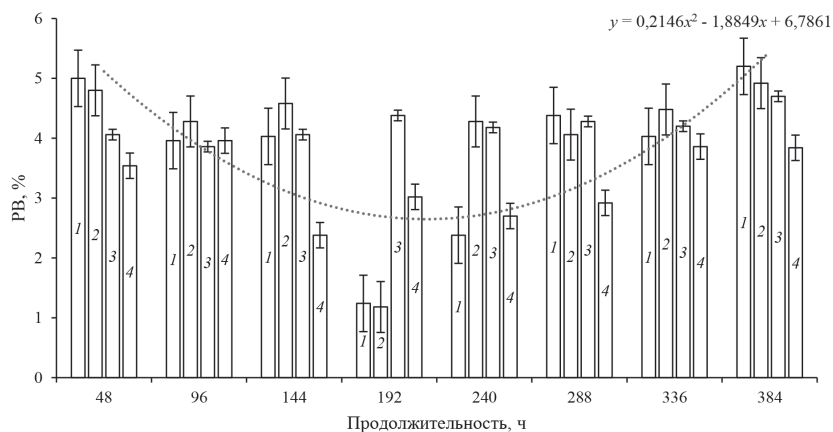


Рис. 3. Влияние количества внесенного хлорида натрия и продолжительности культивирования *D. salina* на содержание РВ в питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока (условные обозначения 1–4 те же, что на рис. 1)

Fig. 3. The effect of the amount of added sodium chloride and duration of cultivation of *D. salina* on the content of RW in nutrient medium from neutral-sulfite alkalis (symbols 1–4 are the same as in Fig. 1)

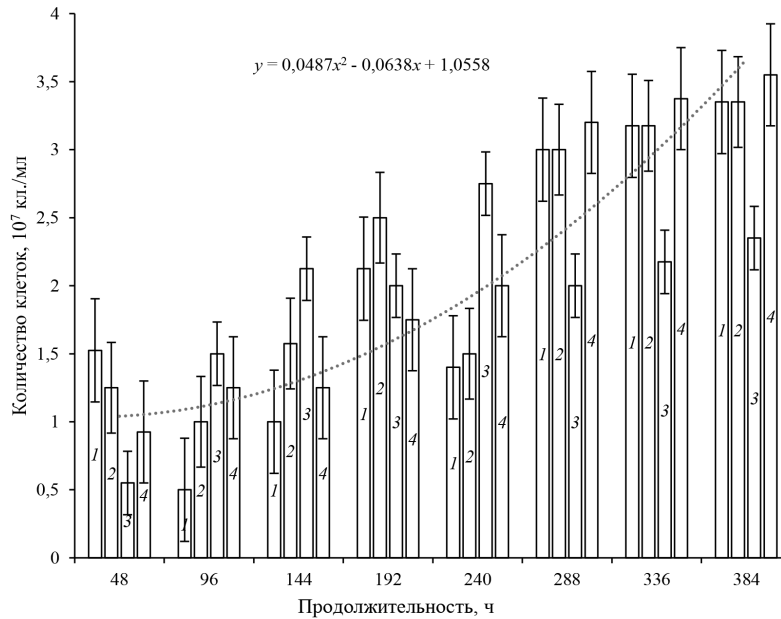


Рис. 4. Влияние количества внесенного хлорида натрия и продолжительности культивирования *D. salina* на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока на количество клеток в культуральной жидкости (условные обозначения 1–4 те же, что на рис. 1)

Fig. 4. The effect of the amount of added sodium chloride and duration of cultivation of *D. salina* on neutral-sulfite alkalis nutrient medium on the number of cells in the culture fluid (symbols 1–4 are the same as in Fig. 1)

Взаимное влияние содержания солей в питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока и продолжительности культивирования микроводорослей на оптическую плотность, количество РВ и синтез клеток описывается полиномиальными зависимостями, имеющими минимальные и максимальные значения этих показателей при продолжительности культивирования 96 и 384 ч.

Расчеты показывают, что на удельную скорость роста культуры и продолжительность деления клеток оказывает влияние содержание хлорида натрия, внесенного в питательную среду (табл. 3). Однако, как видно из представленных результатов, культура растет на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока и без внесения хлорида натрия. Скорее всего, присутствие хлорида натрия в нейтрально-сульфитном щелоке положительно сказывается на жизнедеятельности микроводорослей *D. salina*. При этом рассматриваемая культура проявляет галотолерантные свойства без внесения и с внесением 5 % хлорида натрия в питательную среду. С увеличением содержания хлорида натрия в питательной среде культура *D. salina* проявляет галофильные свойства. При этом внесение 15 % хлорида натрия вызывает снижение удельной скорости роста и увеличение продолжительности генерации клеток. Улучшению кинетических характеристик культуры способствует повышение содержания хлорида натрия в питательной среде до 30 %, что приводит к переходу культуры от галотолерантной к галофильной физиологической активности. Однако наилучшие кинетические характеристики роста культуры *D. salina* проявляются при галотолерантной физиологической активности.

Таблица 3

Влияние количества внесенного хлорида натрия на удельную скорость роста и продолжительность генерации *D. salina* при культивировании на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока

The effect of the amount of sodium chloride added on the specific growth rate and generation time of *D. salina* when cultured in the neutral-sulfite alkalis nutrient medium

Количество хлорида натрия, %	Удельная скорость роста культуры, ч ⁻¹	Продолжительность деления (генерации) клетки, ч
0	0,03	23,10
5	0,09	29,65
15	0,20	3,47
30	0,50	1,38

Следует отметить, что выход биомассы микроводорослей *D. salina* при культивировании на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока без внесения и при внесении в нее 5 % хлорида натрия ниже по сравнению с внесением 15 и 30 % хлорида натрия, как и содержание белка в культуральной жидкости с 5 % хлорида натрия меньше по сравнению с содержанием белка в культуральной жидкости, в которую добавляли 15 % хлорида натрия (табл. 4).

Таблица 4

Влияние количества внесенного хлорида натрия на выход биомассы и синтез белка при культивировании *D. salina* на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока

The effect of the amount of added sodium chloride concentration on biomass yield and protein synthesis during cultivation of *D. salina* in the neutral-sulfite alkalis nutrient medium

Количество хлорида натрия, %	Выход биомассы, %	Содержание белка, мг/мл
0	28	0,30
5	31	0,29
15	48	0,66
30	50	0,97

Выше было показано, что при увеличении продолжительности культивирования микроводорослей *D. salina* более 240 ч в питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока наблюдается увеличение концентрации РВ. Видимо, это обусловлено прежде всего присутствием в культуральной жидкости специфических белков, в частности ферментов. Это подтверждается определением ксиланазной активности культуральной жидкости после окончания культивирования микроводорослей: при внесении в питательную среду хлорида натрия в количестве 0, 5, 15 и 30 % ксиланазная активность соответственно равна 1,2; 2,0; 1,6 и 4,0 ед./мл.

Заключение

Внесение хлорида натрия в питательную среду из нейтрально-сульфитных щелоков влияет на физиологическую активность микроводорослей *Dunaliella salina*. При этом создание условий для проявления культурой *D. salina* галофильных свойств предпочтительней, т. к. при культивировании в этом случае выше удельная скорость роста культуры, меньше продолжительность генерации клеток и больше выход биомассы по сравнению с вариантом проявления этой культурой галофильных свойств.

Культивирование микроводорослей *D. salina* на питательной среде из нейтрально-сульфитного щелока сопровождается ассимилированием углерода окрашенных веществ и углеводов, что способствует увеличению числа клеток в культуральной жидкости, которые необходимо контролировать подсчетом. Косвенный метод оценки количества клеток по оптической плотности культуральной жидкости непригоден в связи с присутствием окрашенных веществ, которые усваиваются микроводорослями.

При культивировании на питательной среде из нейтрально-сульфитных щелоков микроводоросли *D. salina* синтезируют фермент ксиланазу, которая гидролизует ксиланы, что способствует образованию редуцирующих веществ в культуральной жидкости. Результаты исследований показывают возможность утилизации органических веществ из нейтрально-сульфитных щелоков с получением белковых продуктов.

Таким образом, использование нейтрально-сульфитных щелоков в биотехнологии при культивировании микроводорослей *D. salina* для получения биопродуктов является перспективным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Бадикова А.Д., Куляшова И.Н., Кудашева Ф.Х. Лигносulfонаты нейтрально-сульфитного способа варки как перспективное сырье для получения буровых реагентов // Башк. хим. журн. 2014. Т. 21, № 1. С. 64–66.

Badikova A.D., Kulyashova I.N., Kudasheva F.H. Lignosulfonates of the Neutral-Sulfite Cooking Method as a Promising Raw Material for the Production of Drilling Reagents. *Bashkir Chemical Journal*, 2014, vol. 21, no. 1, pp. 64–66. (In Russ.).

2. Кононов Г.Н., Веревкин А.Н., Сердюкова Ю.В., Миронов Д.А. Древесина как химическое сырье. История и современность. IV. Делигнификация древесины как путь получения целлюлозы. Часть I // Лесн. вестн. 2022. Т. 26, № 1. С. 97–113.

Kononov G.N., Verevkin A.N., Serdyukova Yu.V., Mironov D.A. Wood as a Chemical Raw Material. History and Modernity. IV. Delignification of Wood as a Way to Obtain Cellulose. Part I. *Forest Bulletin*, 2022, vol. 26, no. 1, pp. 97–113. (In Russ.). <https://doi.org/10.18698/2542-1468-2022-1-97-113>

3. Смирнова Е.Г., Лоцманова Е.М., Журавлева Н.М., Резник А.С., Вураско А.В., Дриккер Б.Н., Минакова А.Р., Симонова Е.И., Сиваков В.П., Первова И.Г., Маслакова Т.И., Казаков Я.В., Севастьянова Ю.В., Коптяев В.В., Дернова Е.В., Канарский А.В., Дулькин Д.А., Щербак Н.В., Дубовый В.К. Материалы из нетрадиционных видов волокон: технологии получения, свойства, перспективы применения: моногр. / под ред. А.В. Вураско. Екатеринбург: УГЛТУ, 2020. 252 с.

Smirnova E.G., Lotsmanova E.M., Zhuravleva N.M., Reznik A.S., Vurasko A.V., Driker B.N., Minakova A.R., Simonova E.I., Sivakov V.P., Pervova I.G., Maslakova T.I., Kazakov Ya.V., Sevastyanova Yu.V., Koptyaev V.V., Dernova E.V., Kanarsky A.V., Dulkan D.A., Sherbak N.V., Dubovy V.K. *Materials from Non-Traditional Types of Fibers: Technologies of Production, Properties, Prospects of Application: Monograph*. Yekaterinburg, Ural State Forestry University, 2020. 252 p. (In Russ.).

4. Чакчир Б.А., Алексеева Г.М. Фотометрические методы анализа: метод. указ. СПб.: СПХФА, 2002. 44 с.

Chakchir B.A., Alekseeva G.M. *Photometric Methods of Analysis: Methodological Guidelines*. Saint Petersburg, SPCPU Publ., 2002. 44 p. (In Russ.).

5. Beardall J., Giordano M. Acquisition and Metabolism of Inorganic Nutrients by *Dunaliella*. *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology*. New Hampshire, Science Publ., 2019, pp. 73–187. <https://doi.org/10.1201/b10300-8>

6. Benemann J.R. Opportunities and Challenges in Algae Biofuels Production. *A Position Paper in line with Algae World 2008*, 2008. 15 p.

7. Brennan L., Owende P. Biofuels from Microalgae – a Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, vol. 14, iss. 2, pp. 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

8. Engstrand P., Sundberg C., Wancke-Stahl C., Jonsson J., Starck G., Wahlgren M. Method of Producing Bleached Thermomechanical Pulp (Ttmp) or Bleached Chemithermomechanical Pulp (Ctmp), Patent US, no. US 2004/0231811 A1.

9. Fan J., Huang J., Li Y., Han F., Wang J., Li X., Wang W. Sequential Heterotrophy Dilution Photoinduction Cultivation for Efficient Microalgal Biomass and Lipid Production. *Bioresource Technology*, 2012, vol. 112, pp. 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.046>

10. Ferraz A., Guerra A., Souza-Cruz P.B., Mendonca R. Attempts to Correlate Biopulping Benefits with Changes in the Chemical Structure of Wood Components and Enzymes Produced during the Wood Biotreatment with *Ceriporiopsis subvermispora*. *Progress in Biotechnology*, 2002, vol. 21, pp. 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(02\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(02)80009-0)

11. Huang C., Wu H., Li R., Zong M. Improving Lipid Production from Bagasse Hydrolysate with *Trichosporon* Fermentans by Response Surface Methodology. *New Biotechnology*, 2012, vol. 29, iss. 3, pp. 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.008>

12. Kielkopf C.L., Bauer W.J., Urbatsch I.L. Methods for Measuring the Concentrations of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020, vol. 4, art. 102277. <https://doi.org/10.1101/pdb.top102277>

13. Kitto M.R., Rengunathan C. Is Earthen Unmixed Pond Culture Technology for *Dunaliella*, the only Way to Beat High Natural β -Carotene Prices? *Engormix*, 2012.

14. Konwar L.J., Mikkola J.P., Bordoloi N., Saikia R., Chutia R.S., Katak R. Sidestreams from Bioenergy and Biorefinery Complexes as a Resource for Circular Bioeconomy. *Waste Biorefinery*, 2018, pp. 85–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00003-3>

15. Madhuri P., Keerthana R. Effect of Pulping, Bleaching and Refining Process on Fibers for Papermaking. *International Journal of Engineering Research & Technology*, 2020, vol. 9, iss. 12, pp. 330–316.

16. Maier R.M. *Bacterial Growth. Environmental Microbiology*. Burlington, San Diego, London, Elsevier Publ., 2009, pp. 37–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>

17. Mboowa D.A. Review of the Traditional Pulping Methods and the Recent Improvements in the Pulping Processes. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2021, vol. 1, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01243-6>

18. Michaela W., Janina G., Bettina L., Raimund T., Christoph H., Hedda K. Weber Generation of PHB from Spent Sulfite Liquor Using Halophilic Microorganisms. *Microorganisms*, 2015, vol. 3, iss. 2, pp. 268–289. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3020268>
19. Orata F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 2012, pp. 83–108. <https://doi.org/10.5772/33098>
20. Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., De-Bashan L.E., Bashan Y. Heterotrophic Cultures of Microalgae: Metabolism and Potential Products. *Water Research*, 2011, vol. 45, iss. 1, pp. 11–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
21. Rathinam R., Chinnathambi A., Ganesan V. Efficacy of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) in Salt Refinery Effluent Treatment. *Asian Journal of Chemistry*, 2004, vol. 16, iss. 2, pp. 1081–1088.
22. Rullifank K.F., Roefinal M.E., Kostanti M., Sartika L. Evelyn Pulp, and Paper Industry: an Overview on Pulping Technologies, Factors, and Challenges. *OP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2020, vol. 845, art. 012005. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/845/1/012005>
23. Tafreshi H.A., Shariati M. *Dunaliella* Biotechnology: Methods and Applications. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, vol. 107, iss. 1, pp. 14–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов
Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest