

Увеличение содержания каротиноидов в биомассе *Vischeria punctata* Vischer при культивировании в лабораторном биореакторе

Татьяна А. Кузнецова¹ kuznetsova.ta1@spbstu.ru  0000-0003-0162-0896
Маруф Х. Мустафакулов¹ marufbekmmxm@gmail.com  0009-0004-4324-5646

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Институт биомедицинских систем и биотехнологий, ул. Новороссийская, 48, г. Санкт-Петербург, 184021, Россия

Аннотация. Микроводоросли *Vischeria punctata* Vischer, штамм IPPAS H-242 (ИФР РАН им. К.А. Тимирязева) культивировали в лабораторном фотобиореакторе, наилучшей средой для выхода биомассы стала среда Болда. Внесение в среду Болда цианокобаламина и тиамин не привели к увеличению выхода биомассы. Для увеличения содержания каротиноидов в биомассе микроводорослей было использовано дозированное воздействие различных концентраций перекиси водорода: от 0,1 до 0,3 мл/л суспензии микроводорослей. Одновременно с перекисью водорода в суспензию вносили пиридоксин в концентрации 50 мг/л. Перекись и пиридоксин вносились каждые двое суток при культивировании *V. punctata*, которое продолжалось 10 суток. Добавки перекиси водорода приводят к снижению продолжительности экспоненциальной фазы роста в вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л на 1 сутки, с внесением перекиси водорода 0,3 мл/л на 2 суток. Также в ответ на стрессовое воздействие отмечено уменьшение средних размеров клеток в популяции. В варианте с концентрацией перекиси водорода 0,3 мл/л происходит снижение популяционной емкости и содержания суммы каротиноидов в воздушно-сухой биомассе. В вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л отмечено увеличение доли каротиноидов в пигментном комплексе по сравнению с контролем на 18,12±0,20 и 18,92±0,14 % соответственно. Наилучшим вариантом эксперимента стало внесение 0,2 мл перекиси водорода на 1 л суспензии микроводорослей, при этом выход биомассы достоверно не отличался от контрольного варианта, содержание суммы каротиноидов возрастает на 23,1 % по сравнению с контролем и достигает 5,97±0,27 мг/г воздушно-сухой биомассы.

Ключевые слова: микроводоросли, *Vischeria punctata*, культивирование, перекись водорода, каротиноиды.

Increase in carotenoid content in *Vischeria punctata* Vischer biomass during cultivation in a laboratory bioreactor

Tatiana A. Kuznetsova¹ kuznetsova.ta1@spbstu.ru  0000-0003-0162-0896
Maruf H. Mustafakulov¹ marufbekmmxm@gmail.com  0009-0004-4324-5646

¹ Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University, Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies, Novorossiyskaya st., 48, St. Petersburg, 184021, Russia

Abstract. Microalgae *Vischeria punctata* Vischer, strain IPPAS H-242 (K.A. Timiryazev Institute of Physiology and Hydrology of the Russian Academy of Sciences) were cultivated in a laboratory photobioreactor; the best medium for biomass yield was Bold's medium. Addition of cyanocobalamin and thiamine to Bold's medium did not lead to an increase in biomass yield. To increase the carotenoid content in the microalgae biomass, dosed exposure to various concentrations of hydrogen peroxide was used: from 0.1 to 0.3 ml/l of microalgae suspension. Pyridoxine at a concentration of 50 mg/l was added to the suspension simultaneously with hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide and pyridoxine were added every two days during the cultivation of *V. punctata*, which lasted for 10 days. Hydrogen peroxide additions lead to a decrease in the duration of the exponential growth phase in the variants with the addition of 0.1 and 0.2 ml/l hydrogen peroxide for 1 day, and with the addition of 0.3 ml/l hydrogen peroxide for 2 days. Also, in response to stress, a decrease in the average cell size in the population was noted. In the variant with a hydrogen peroxide concentration of 0.3 ml/l, there is a decrease in the population capacity and the content of the sum of carotenoids in the air-dry biomass. In the variants with the addition of 0.1 and 0.2 ml/l hydrogen peroxide, an increase in the proportion of carotenoids in the pigment complex was noted compared to the control by 18.12±0.20 and 18.92±0.14%, respectively. The best variant of the experiment was the introduction of 0.2 ml of hydrogen peroxide per 1 liter of microalgae suspension, while the biomass yield did not differ significantly from the control variant, the content of the sum of carotenoids increased by 23.1% compared to the control and reached 5.97±0.11 mg/g of air-dry biomass.

Keywords: microalgae, *Vischeria punctata*, cultivation, hydrogen peroxide, carotenoids.

Введение

Микроводоросли относятся к важнейшим возобновляемым ресурсам, источникам биологически активных веществ, таких как белок, углеводы, липиды, антиоксиданты, в том числе и каротиноиды [1]. Метаболизм многих штаммов микроводорослей лабилен. В ответ на дозированное

стрессовое воздействие в биомассе микроводорослей накапливаются липиды, углеводы и антиоксиданты. УФ-излучение [2], изменение кислотности среды, снижение температуры культивирования [3] приводит к накоплению каротиноидов.

Основной способ получения каротиноидов в промышленности – химический синтез [4].

Для цитирования

Кузнецова Т.А., Мустафакулов М.Х. Увеличение содержания каротиноидов в биомассе *Vischeria punctata* Vischer при культивировании в лабораторном биореакторе // Вестник ВГУИТ. 2024. Т. 87. № 101. С. 75–83. doi:10.20914/2310-1202-2024-101-75-83

For citation

Kuznetsova T.A., Mustafakulov M.X. Increase in carotenoid content in *Vischeria punctata* Vischer biomass during cultivation in a laboratory bioreactor. Vestnik VGUIT [Proceedings of VSUET]. 2024. vol. 87. no. 101. pp. 75–83. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2024-101-75-83

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License

Биотехнологическое получение каротиноидов из микроводорослей связано с недостаточным изучением каротиногинеиза и факторов позволяющих увеличить содержание каротиноидов в биомассе без уменьшения ее выхода.

Синтез каротиноидов описан в строме хлоропластов и на мембранах тилакоидов [5, 6], а также в цитоплазме микроводорослей [6]. Большое внимание обращено на микроводоросли (например, *Chloromonas reticulata* Gobi, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus almeriensis* [7]), накапливающие вторичные каротиноиды вне хлоропластов – нефотосинтетические пигменты, локализованные во внетилакоидных структурах (липидных глобулах) [1]. В стрессовых условиях накопление вторичных каротиноидов связано с накоплением липидов [7,19]. Каротиноиды выполняют важную светособирающую, структурную функцию [8]. Ксантофиллы виолаксантинового цикла в присутствии активных форм кислорода защищают хлорофиллы и липиды от разрушения и обеспечивают устойчивость тилакоидных мембран при высокой интенсивности света [9].

Активные формы кислорода постоянно генерируются в электронно-транспортных цепях митохондрий и хлоропластов [8]. Молекулы H_2O_2 не заряжены, имеют низкую реакционную способность, в водных растворах они на расстояниях до 1 мкм. В небольших концентрациях молекулы перекиси являются внутриклеточными мессенджерами, в концентрациях от 1 до 50 мМ они токсичны для клеток [2]. Частью антиоксидантных систем являются ферментативные системы, удаляющие активные формы кислорода (супероксиддисмутаза, каталаза и др.), а также полиеновые соединения, к которым относятся каротиноиды [10,18]. Их антиоксидантная активность определяется наличием двойных связей в молекуле. Антиоксидантная активность каротиноидов *in vitro* зависит от содержания активных форм кислорода в среде [8].

Vischeria punctata Vischer – пресноводная микроводоросль, обитатель почв [10], неприхотлива при культивировании [11]. Штаммы этой микроводоросли перспективны, так как способны накапливать липиды, незаменимые жирные кислоты [12,20], например эйкозопентоеновую кислоту [11, 13]. Биомасса микроводоросли рассматривается как субстрат для получения биогаза [12]. При культивировании ее на бедных питательными средах эта микроводоросль накапливает экзо- и эндополисахариды [13]. Однако особенности культивирования и метаболизм *V. punctata* до конца не изучены. Биомасса *V. punctata* описана как источник β -каротина

(до 5,9% сухого веса) при скорости производства биомассы до 9,8 г/л [14]. *V. punctata* и родственные ей виды *V. helvetica* и *V. stellate* синтезируют β -кротин до 50% от общего содержания каротиноидов при культивировании микроводорослей в фотобиореакторе по типу пузырьковой колонки [14]. Микроводоросли рода *Vischeria*, как представитель рода *Eustigmatophyceae*, продуцируют ксантофиллы: виолаксантин, антераксантин и зеаксантин [9].

Цель работы – определение режима направленного культивирования микроводорослей *V. punctata* для увеличения содержания каротиноидов в биомассе.

Материалы и методы

Образцы микроводоросли *V. Punctate* Vischer (штамм IPPAS H-242) была получена из коллекции Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

Маточную культуру микроводоросли хранили при температуре от 3 до 4 °С. После шести месяцев хранения маточная культура обновлялась, культивировалась на среде Болда [12] до фазы замедленного роста.

Для культивирования микроводоросли использовали лабораторный биореактор, представляющий собой барботажную колонну объемом 500 мл. Барботирование воздухом в режиме 1,5 л/мин. позволяет перемешивать клеточную суспензию. Определение концентрации клеток при культивировании проводили нефелометрически каждые сутки [5], предварительно суспензию перемешивали. Оптическую плотность определяли спектрофотометром ЮНИКО 1201, при длине волны 750 нм, в кювете сравнения – питательная среда. Для определения оптической плотности каждые сутки отбирали аликвоту (10 мл), до необходимого объема доливали питательную среду. Применение сливно-долиной системы при культивировании микроводорослей позволяет удлинить период экспоненциального роста и увеличить плотность клеток на конец культивирования. Начальная концентрация клеток микроводоросли в питательной среде составляла не более 5 млн кл/мл. Режим освещенности день – 16 часов, ночь – 8 часов, лампа дневного света (ФАР), интенсивность освещенности – 20 кЛк на м², T(K) – 400. Культивирование проводили до фазы стабилизации, когда прекращается рост клеток в популяции микроводорослей. Удельную скорость роста находили по формуле:

$$\mu = \ln(x_2/x_1)/(t_2 - t_1), \quad (1)$$

где x_1 и x_2 – концентрация клеток, млн клеток на мл в момент времени t_1 и t_2 , соответственно.

Полученную при культивировании суспензию микроводорослей отстаивали в течение двух суток. После отделения питательной среды, сконцентрированную биомассу микроводорослей центрифугировали в режиме – 6000 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость декантировали. Осадок высушивали на воздухе в тёмном месте при T от 20 до 25 °С до постоянного веса. Хранили воздушно-сухую биомассу в закрытых стерильных ёмкостях при температуре 4–5 °С.

Экстракцию фотосинтетических пигментов проводили 96%-ным этанолом при ультразвуковом облучении на приборе «WiseClean WUC-A06H». Навеску воздушно-сухой биомассы 0,025 г. заливали 10 мл 96%-ного этанола (ГОСТ 5962–2013) и облучали на ультразвуковой ванне «WiseClean WUC-A06H» в режиме 35 кГц, при температуре 40 °С в течение 30 минут. Экстракт отделяли от биомассы центрифугированием в режиме 3500 об/мин в течение 5 минут на приборе CM-6MT. Содержание фракций фотосинтетических пигментов в этанольных экстрактах определяли спектрофотометрическим методом [14], определяли оптическую плотность при длинах волн 470 нм (сумма каротиноидов), 649 нм (хлорофилл b), 664 нм (хлорофилл a).

Для оценки состояния популяции клеток при культивировании в разных режимах проводили микроскопирование прижизненных препаратов при увеличении в 640 раз (микроскоп МикМед-6). Микрофотографии делали цифровой камерой IS-500 при использовании компьютерной программы MC-foto. Анализировали не менее 10 полей зрения в каждом варианте, измеряли не менее 50 клеток с помощью программы Levenhuk. Пересчет в микрометры проводили с помощью коэффициента пересчета, для которого проводили измерения объект-микрометра (ОМП, 0,01 мм, ГОСТ 7513–55).

Полученные результаты статистически обрабатывались: находили среднее значение и ошибку средней. Достоверность отличий определяли, пользуясь критерием Стьюдента.

Результаты

Подбор оптимальной питательной среды для наращивания биомассы *V. punctata*. В известных базах данных по микроскопическим водорослям рекомендовано для культивирования *V. punctata* среды Прата и Болда (BBM 3N) [11] и модифицированы среда Болда (BBM 3N + V) [10], которая отличается наличием витаминов – цианокобаламина и тиамин гидрохлорида. Среда Болда и ее модифицированный вариант по сравнению со средой Прата, богаты нитратами, дополнительно включают соли цинка, кобальта и молиб-

дена. Для определения оптимальной среды культивирования был проведен опыт с использованием трех рекомендованных сред (рисунок 1).

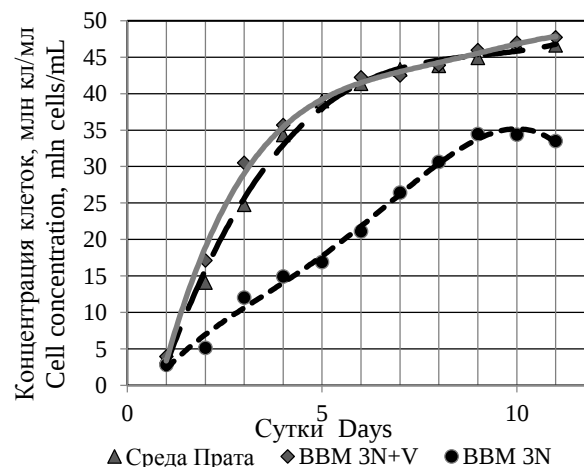


Рисунок 1. Кривые культивирования *Vischeria punctata* в различных питательных средах

Figure 1. Cultivation curves of *Vischeria punctata* in different nutrient media

Лог-фаза в вариантах не превышала суток, что характеризует высокую метаболическую активность популяции микроводоросли в маточной культуре. Максимальная скорость роста в среде Болда и ее модифицированном варианте наблюдали в первые 6 суток культивирования, далее она снижалась и к 9–10 суткам наступала фаза стабилизации. Концентрация клеток в суспензии достигала $47,0 \pm 4,5$ млн кл/мл, при этом существенных различий в росте популяции *V. punctata* в среде Болда и ее модифицированном варианте не наблюдалось (таблица 1).

Среда Прата оказалась менее продуктивной, прирост биомассы наблюдался до 10 суток культивирования, при этом концентрация клеток в суспензии достигала $35,0 \pm 3,0$ млн кл/мл. На 11 сутки культивирования начинается фаза истощения.

Значение pH в питательных средах находилось в пределах 4,7–5,0. При культивировании *V. punctata* в течение 10–11 суток происходило увеличение значений pH до 9,88 в среде Прата, до 10,27 и в среде Болда и 10,02 в модифицированной среде Болда, что связано с усвоением нитрат-ионов из среды. Зашелачивание среды способствует флокуляции клеток, при этом их метаболическая активность снижается, рост популяции замедляется.

Выход воздушно-сухой биомассы достигает $2,32 \pm 0,21$ и $2,26 \pm 0,11$ г/л (среда BBM 3N и BBM 3N + V соответственно), что выше, чем в среде Прата ($1,15 \pm 0,20$ г/л).

Таблица 1.

Выход воздушно-сухой биомассы после культивирования *Vischeria punctata* в рекомендованных средах

Table 1.

Yield of air-dried biomass after cultivation of *Vischeria punctata* in recommended media

Питательная среда Nutrient medium	Удельная скорость роста в экспоненциальную фазу, μ Specific growth rate in exponential phase, μ	Популяционная емкость, К, млн кл/мл Population capacity, K, mln cl/mL	pH на конец культивирования pH at the end of cultivation	Выход биомассы, г/л Biomass yield, g / l
Среда Прата	0,279	33,49	9,88	1,15
BBM 3N	0,543	46,60	10,27	2,32
BBM 3N + V	0,442	47,69	10,02	2,26

Таким образом, наиболее эффективной для наращивания биомассы *V. punctata* оказалась среда BBM3N, добавка витаминов не имела существенного значения для накопления биомассы.

Исследование влияния добавки пиридоксина и различных концентраций перекиси водорода на показатели культивирования *V. punctata*. Дозированное внесение перекиси водорода и пиридоксина в питательную среду Болда проводили в первые сутки культивирования *V. punctata*, и каждые двое суток до конца

культивирования, при этом суспензию микро-водорослей хорошо перемешивали. Перекись водорода в вариантах вносили в концентрациях от 0,1 до 0,3 мл/л суспензии микроводорослей. Совместно с перекисью в питательную среду вносили пиридоксин в концентрации 50 мг/л суспензии микроводорослей среды во всех вариантах (таблица 2). В контрольный вариант перекись и пиридоксин не вносили. Остальные условия культивирования (режим освещенности, температура) были такими же, как и в предыдущем эксперименте.

Таблица 2.

Схема эксперимента (базовая среда Болда)

Table 2.

Experimental design (Bold's base environment)

Вариант Option	V питательной среды, мл V of nutrient medium, ml	V H ₂ O ₂ , мл на 500 мл V H ₂ O ₂ , ml per 500 ml	M пиридоксина, мг на 500 мл M pyridoxine, mg per 500 ml
контроль control	500	0	0
2	500	0,05	25
3	500	0,10	25
4	500	0,15	25

Продолжительность лаг-фазы в экспериментальных вариантах и в контроле не превышала суток. Экспоненциальная фаза роста в контрольном варианте на шестые сутки переходила в фазу замедленного роста (при концентрации 35,68 млн кл/мл). В вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л суспензии микроводорослей экспоненциальная фаза завершалась на пятые сутки культивирования (при концентрации 39,31 и 36,86 млн кл/мл соответственно). В варианте со внесением перекиси водорода 0,3 мл/л суспензии микроводорослей экспоненциальная фаза завершалась на четвертые сутки культивирования (при концентрации 29,13 млн кл/мл) (рисунок 2).

Продолжительность культивирования *V. punctata* составляла 10 суток, при этом максимальная концентрация клеток достигала в вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л (47,47 и 47,58 млн кл/мл соответственно). В варианте с добавлением перекиси водорода 0,3 мл/л суспензии микроводорослей

концентрация клеток достигала 42,34 млн кл/мл, что ниже значений в контрольном варианте.

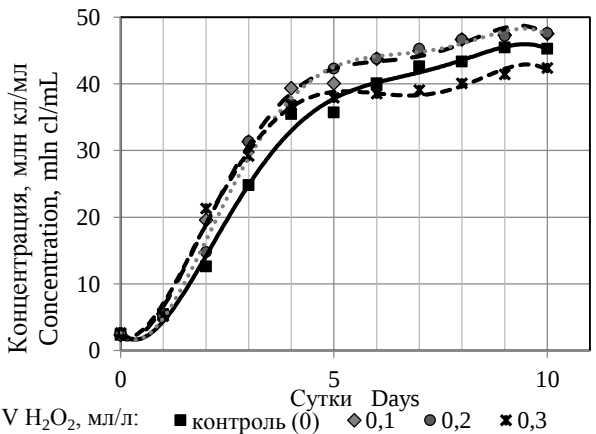


Рисунок 2. Кривые культивирования суспензий водорослей в среде (BBM3N) с добавлением перекиси водорода разной концентрации

Figure 2. Curves of cultivation of algae suspensions in a medium (BBM3N) with the addition of hydrogen peroxide of different concentrations

В фазу стабилизации оценивали состояние популяции микроводорослей по микроскопической картине прижизненных неокрашенных препаратов. Наиболее информативным показателем, характеризующим средний размер клеток в популяции, стала площадь проекции клеток (таблица 3). При увеличении объема вносимой перекиси водорода площадь проекции уменьшается пропорционально количеству вносимой добавки.

В вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л (варианты 2 и 3) отмечена тенденция к увеличению популяционной емкости по сравнению с контролем, что связано со стимулирующим влиянием фактора роста пиридоксина, увеличился выход воздушно-сухой биомассы.

В варианте 4 происходит снижение популяционной емкости, что расцениваем как следствие неблагоприятного влияния наивысшей концентрации вносимой перекиси водорода (0,15 мл на 500 мл) на ростовые характеристики популяции микроводоросли.

Содержание пигментов в биомассе *V. punctata*, полученной при влиянии добавок пиридоксина и различных концентраций перекиси водорода. Спектрофотометрическим методом определяли содержание фракций пигментного комплекса (хлорофилла а, хлорофилла б и суммы каротиноидов) и их соотношения (таблица 4).

Таблица 3.

Выход воздушно-сухой биомассы после культивирования микроводоросли *Vischeria punctata* при добавлении перекиси водорода и пиридоксина

Table 3.

Yield of air-dried biomass after cultivation of microalgae *Vischeria punctata* with the addition of hydrogen peroxide and pyridoxine

Вариант Option	Удельная скорость роста в экспоненциальную фазу, μ Specific growth rate in exponential phase, μ	Популяционная емкость, К, млн кл/мл Population capacity, K, million cells / ml	Площадь проекции клеток, $\mu\text{м}^2$ Projection area of cells, μm^2	Выход биомассы, г/л Biomass yield, g/l
Контроль control	0,549	45,42	15,54 $\pm$ 0,84	2,32
2	0,572	47,47	15,58 $\pm$ 1,02*	2,52
3	0,556	47,58	14,69 $\pm$ 1,11	2,66
4	0,667	42,34	14,46 $\pm$ 0,90	2,30

Примечание: $\pm$ доверительный интервал; * достоверные отличия с вероятностью 95%.

Note: $\pm$ confidence interval; * significant differences with a probability of 95%.

Таблица 4.

Сводная таблица содержания пигментов в биомассе в различных вариантах эксперимента

Table 4.

Summary table of pigment content in biomass in different experimental variants

Содержание пигментов, мг/г сухой биомассы The pigment content, mg/g dry biomass	Образцы биомассы, полученные в различных условиях культивирования Biomass samples obtained under various cultivation conditions			
	Контроль Control	Концентрация H_2O_2 мл/л суспензии <i>V. punctata</i> Concentration of H_2O_2 ml/l of <i>V. punctata</i> suspension		
		0,1	0,2	0,3
Хлорофилл а Chlorophyll a	16,17 $\pm$ 0,69	18,35 $\pm$ 1,1**	17,50 $\pm$ 0,76*	17,73 $\pm$ 0,81*
Хлорофилл б Chlorophyll b	7,04 $\pm$ 0,54	8,09 $\pm$ 0,588**	8,09 $\pm$ 0,54*	8,61 $\pm$ 0,39**
Сумма каротиноидов Sum of carotenoids	4,85 $\pm$ 0,08	5,84 $\pm$ 0,29**	5,97 $\pm$ 0,27**	4,36 $\pm$ 0,29*
Сумма пигментов Pigment amount	28,06 $\pm$ 1,24	32,28 $\pm$ 1,79**	31,56 $\pm$ 1,47**	30,70 $\pm$ 0,1, 27*
Доля каротиноидов от суммы пигментов, % The proportion of carotenoids from the amount of pigments, %	17,32 $\pm$ 0,59	18,12 $\pm$ 0,49*	18,92 $\pm$ 0,34**	14,20 $\pm$ 0,539**
Соотношение хлорофиллов а/б The ratio of chlorophyll a/b	2,30 $\pm$ 0,12	2,27 $\pm$ 0,12	2,17 $\pm$ 0,10	2,06 $\pm$ 0,10*
Хл (а + б)/Кар Ch(a + b)/car	4,78 $\pm$ 0,20	4,52 $\pm$ 0,15	4,29 $\pm$ 0,10	6,04 $\pm$ 0,22*

Примечание: $\pm$ доверительный интервал; * достоверные отличия с вероятностью 95%, ** – достоверные отличия с вероятностью 99%

Note: $\pm$ confidence interval; * significant differences with a probability of 95%, ** significant differences with a probability of 99%

По результатам эксперимента было определено достоверное увеличение содержания суммы фотосинтезирующих пигментов в биомассе микроводорослей в вариантах с дозированным внесением перекиси водорода и пиридоксина, что связано с активирующим влиянием пиридоксина. Самая большая прибавка содержания суммы пигментов (на 15,0% по сравнению

с контролем) отмечена в варианте с минимальной концентрацией вносимой перекиси 0,1 мл/л суспензии микроводорослей. Увеличение добавки перекиси снижает нарастание содержания пигментов: в варианте с добавкой 0,2 мл/л суспензии – на 12,5%, в варианте с добавкой 0,3 мл/л суспензии – на 9,4%.

Также отмечаем, что с увеличением доли вносимой перекиси происходит снижение содержания фракции хлорофилла а и увеличение содержания хлорофилла б, что связано с окислением хлорофилла а. Эта закономерность отражена в изменении отношения фракций хлорофиллов (таблица 4).

В вариантах с концентрацией вносимой перекиси 0,1 и 0,2 мл/л достоверно увеличивается содержание суммы каротиноидов по сравнению с контролем, на 20,4 и 23,1% соответственно. В этих вариантах проявился адаптационный потенциал популяции *V. punctata*. В варианте с внесением перекиси водорода 0,3 мл/л суспензии микроводорослей адаптационные возможности популяции микроводорослей недостаточны для преодоления стрессового воздействия. В этом варианте мы видим значимое уменьшение содержания суммы каротиноидов на 10,1% по сравнению с контролем.

В вариантах происходит изменение содержания различных видов пигментов, поэтому мы определили относительную величину: долю каротиноидов от суммы фотосинтезирующих пигментов. В вариантах с добавлением перекиси в концентрациях 0,1 и 0,2 мл/л происходит достоверное увеличение доли каротиноидов в пигментном комплексе по сравнению с контролем на 4,6 и 9,2% соответственно. А в варианте с внесением перекиси 0,3 мл/л доля каротиноидов существенно снизилась, на 18,0%, что предположительно связано с высокой стрессовой нагрузкой на антиоксидантные системы микроводорослей.

Обсуждение

Известно, что в хлоропластах образуются активные формы кислорода (АФК), в том числе и перекись водорода, которые при определенных условиях негативно влияют на мембраны тилакоидов [16]. Перекись водорода способна вызывать широкий спектр повреждений, в том числе связанных с перекисным окислением липидов (ПОЛ) [2, 3]. Перекись водорода также способна к окислению сульфгидрильных групп белков в клетках, эта характеристика может объяснять ингибирующее воздействие перекиси на ферменты цикла Кельвина [17].

Важное значение для осуществления фотосинтеза имеет как общее содержание фотосинтезирующих пигментов, так и соотношение различных видов пигментов. Внесение перекиси водорода в суспензию микроводорослей при культивировании в концентрациях от 0,1 до 0,3 мл/л совместно с пиридоксином (25 мг/л) один раз в двое суток, не приводит к уменьшению содержания суммы пигментов, но приводит к существенному изменению их соотношения, что характеризует значимое влияние на метаболизм фотосинтезирующих пигментов.

У высших растений в стрессовых условиях снижение показателя отношения суммы хлорофиллов к сумме каротиноидов в пигментном комплексе «Ch(a + b)/car» является следствием ПОЛ, которое сопровождается накоплением в фотосинтезирующих тканях малонового диальдегида (МДА) [16]. В нашем исследовании этот показатель снижается в вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л по сравнению с контролем, однако учитывая отсутствие снижения суммы пигментов, фракций хлорофиллов и высокую интенсивность нарастания биомассы при культивировании, мы можем говорить о компенсированном стрессе.

В варианте с внесением 0,3 мл/л перекиси водорода происходит снижение содержания суммы каротиноидов в биомассе, что приводит к увеличению соотношения «Ch(a + b) / car», учитывая сниженные ростовые характеристики, мы характеризуем состояние этой популяции как стрессовое без оптимальной его компенсации.

Заключение

По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

Наилучшее нарастание биомассы *V. punctata* (IPPAS H-242) отмечено в среде Болда. Среда Прада менее продуктивна и скорее подходит для сохранения культуры при холодильном хранении. Добавки витаминов в модифицированной среде Болда не привели к увеличению выхода биомассы *V. punctata* при культивировании.

Внесение перекиси водорода в концентрациях от 0,1 до 0,3 мл/л и 50 мг/л пиридоксина каждые двое суток в течение всего периода культивирования привело к уменьшению продолжительности экспоненциальной фазы роста. В контроле она длилась до 6 суток, в вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л она укорачивается до 5 суток, а в варианте с внесением 0,3 мл/л перекиси водорода она длится до 4 суток. Выход биомассы и популяционная емкость в вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л увеличивается по сравнению с контролем.

Анализ микроскопической картины показал, что в вариантах с внесением перекиси водорода наблюдается тенденция к уменьшению средних размеров клеток в популяции пропорционально доле вносимой перекиси.

Влияние добавки перекиси водорода разной концентрации в сочетании с пиридоксином не привело к уменьшению суммарного содержания фотосинтезирующих пигментов, однако отразилось на соотношении различных видов пигментов в исследуемом комплексе. Перекись

водорода способствует окислению хлорофилла а, что отразилось в уменьшении соотношения хлорофилла а к хлорофиллу б. В вариантах с внесением перекиси водорода 0,1 и 0,2 мл/л отмечено увеличение доли каротиноидов в пигментном комплексе по сравнению с контролем на $18,12 \pm 0,20$ и $18,92 \pm 0,14\%$ соответственно. Усиленный каротиногенез отражает компенсаторные реакции на дозированное стрессовое воздействие, которое связано с ПОЛ. В варианте с внесением перекиси водорода 0,3 мл/л содержание каротиноидов снижается по сравнению с контрольным вариантом, что характеризует некомпенсированное стрессовое состояние популяции микроводорослей.

Максимальное содержание каротиноидов отмечено в варианте с внесением перекиси водорода 0,2 мл/л и составляет $5,97 \pm 0,27$ мг на г воздушно-сухой биомассы микроводоросли, что достоверно выше этого показателя в контроле на 41,3%.

Рекомендованный способ направленного культивирования *V. punctata* (штамм IPPAS H-242) позволит получить биомассу с увеличенным содержанием каротиноидов, без уменьшения выхода биомассы при культивировании. Полученную биомассу можно использовать для получения не только каротиноидов, но и других ценных биоактивных соединений для применения в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности.

Литература

- 1 Дымова О.В., Новаковская И.В., Патова Е.Н. Влияние условий культивирования на содержание каротиноидов в клетках водоросли *Chloromonas reticulata* (Goroschankin) Gobi // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем. XVII Всероссийская науч.-практ. конф. с международным участием. Киров, 05 декабря 2019 года. Книга 2. С. 260–262.
- 2 Головки Т.К., Силина Е.В., Лашманова Е.А., Козловская А.В. Активные формы кислорода и антиоксиданты в живых системах: интегрирующий обзор // Теоретическая и прикладная экология. 2022. № 1. С. 17–26. doi: 10.25750/1995–4301–2022–1–017–026
- 3 Радюкина Н.Л., Михеева Л.Е., Карбышева Е.А. Низкомолекулярные антиоксиданты в клетках цианобактерий и растений // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139. № 3. С. 254–266. doi: 10.1134/S0042132419030062.
- 4 Ядерец В.В., Карпова Н.В., Глаголева Е.В., Петрова К.С. и др. Каротиноиды: обзор основных биотехнологических способов и условий получения // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14, № 1(48). С. 41–54. doi:10.21285/achb.905
- 5 Кузнецова Т.А., Никитина М.С., Севастьянова А.Д. Направленное культивирование *Chlorella sorokiniana* с целью увеличения синтеза каротиноидов // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2019. Т. 81. № 4(82). С. 34–39. doi: 10.20914/2310–1202–2019–4–34–39
- 6 Пат. № 2758355 C1 C12N 1/12. Способ направленного культивирования биомассы микроводоросли *Chlorella sorokiniana*: / Е.Б. Аронова, Ю.Г. Базарнова, Ю.А. Смятская. № 2021109499. Заявл. 06.04.2021. Оpubл. 28.10.2021.
- 7 Rodríguez-Concepción M., Avalos J., Bonet M.L. A global perspective on carotenoids: metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health // Progress in lipid research (Ed. Elsevier), V. 70. P. 62–93.
- 8 Маслова Т.Г., Марковская Е.Ф., Слемнев Н.Н. Функции каротиноидов в листьях высших растений (обзор) // Журнал общей биологии. 2020. Т. 81. № 4. С. 297–310. doi: 10.31857/S0044459620040065
- 9 CCAP 887/3 *Vischeria punctata*. Culture Collection of algae & protozoa. URL: <https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-887-3>.
- 10 Каталог коллекции культур микроводорослей IPPAS (ИФР РАН им. К.А. Тимирязева). IPPAS H-242 *Vischeria punctata* Vischer. URL: <http://cellreg.org/catalog/>
- 11 Кривова, З.В., Мальцев Е.И., Куликовский М.С. Влияние азотного голодания на жирнокислотный состав штаммов рода *Vischeria* // Изучение водных и наземных экосистем: история и современность: Тезисы докладов Международной научной конференции, посвящённой 150-летию Севастопольской биологической станции – Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского и 45-летию НИС «Профессор Водяницкий», Севастополь, 13–18 сентября 2021 года. Севастополь: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН", 2021. С. 591–592.
- 12 Babich O., Budenkova E., Kashirskikh, E., Dolganyuk V. et al. Study of the Polysaccharide Production by the Microalga *Vischeria punctata* in Relation to Cultivation Conditions // Life. 2022. № 12, 1614. URL: <https://doi.org/10.3390/life12101614>.
- 13 Alcaíno J., Baeza M., Cifuentes V. Cifuentes V. Carotenoid Distribution in Nature // Biology, Environmental Science Sub-cellular biochemistry. 2016.V. 79. P. 3-33. doi: 10.1007/978–3–319–39126–7_1
- 14 Пат. № 2695879 C1, RU, A23J 3/20. Способ получения пигментного комплекса из биомассы одноклеточных водорослей рода *Chlorella* / Ю.Г. Базарнова, Т.А. Кузнецова, Ю.А. Смятская № 2018142406. Заявл. 01.12.2018. Оpubл. 29.07.2019.
- 15 Mulenga C., Clarke C., Meincken M. Physiological and growth responses to pollutant-induced biochemical changes in plants: A review. 2020. Pollution. 2020. Vol. 6. pp. 827-848. doi:10.22059/poll.2020.303151.821
- 16 Viviani, A., Verma, B. C., Giordani, T., Fambrini, M. L-Ascorbic acid in plants: From biosynthesis to its role in plant development and stress response. Agrochimica: International Journal of Plant Chemistry, Soil Science and Plant Nutrition of the University of Pisa. 2021. V. 65. № 2. P. 151-171.

- 17 Wang J. Hu, X., Chen, J., Wang, T. et al. The Extraction of β -Carotene from Microalgae for Testing Their Health Benefits. *Foods*. 2022. V. 11. P. 502. doi: 10.3390/foods11040502
- 18 Wang L. Liu Z., Jiang H., Mao X. Biotechnology advances in β -carotene production by microorganisms // *Trends in Food Science & Technology*. 2021. V. 111. P. 322-332. doi:10.1016/j.tifs.2021.02.077
- 19 Rozenberg J. M., Sorokin B.A., Mukhambetova A.N., Emelianova A.A. et al. Recent advances and fundamentals of microalgae cultivation technology // *Biotechnology Journal*. 2024. V. 19. №. 3. P. 2300725.
- 20 Martins C. B., Ferreira O., Rosado T., Gallardo E. et al. Eustigmatophyte strains with potential interest in cancer prevention and treatment: Partial chemical characterization and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity // *Biotechnology Letters*. 2021. V. 43. P. 1487-1502. doi: 10.1007/s10529-021-03122-0

21

References

- 1 Dymova O.V., Novakovskaya I.V., Patova E.N. and others. The influence of cultivation conditions on the content of carotenoids in the cells of the algae *Chloromonas reticulata* (Goroschankin) Gobi // *Biodiagnostics of the state of natural and natural-technogenic systems: Materials of the XVII All-Russian scientific and practical conference with international participation*, Kirov. 2019. Vol. 2. pp. 260–262. (in Russian).
- 2 Golovko T.K., Silina E.V., Lashmanova E.A., Kozlovskaya A.V. Reactive oxygen species and antioxidants in living systems: an integrating review // *Theoretical and Applied Ecology*. 2022. no. 1. pp. 17–26. doi: 10.25750/1995–4301–2022–1–017–026. (in Russian).
- 3 Radyukina N.L., Mikheeva L.E., Karbysheva E.A. Low molecular weight antioxidants in cyanobacterial and plant cells // *Advances in modern biology*. 2019. Vol. 139. no. 3. pp. 254–266 doi: 10.1134/S0042132419030062. (in Russian).
- 4 Yaderets V.V., Karpova N.V., Glagoleva E.V. Petrova K.S. et al. Carotenoids: a review of the main biotechnological methods and conditions for production // *News of universities. Applied chemistry and biotechnology*. 2024. Vol. 14, no. 1(48). pp. 41–54 doi: 10.21285/achb.905 (in Russian).
- 5 Kuznetsova T.A., Nikitina M.S., Sevastyanova A.D. Directed cultivation of *Chlorella sorokiniana* to increase carotenoid synthesis // *Bulletin of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2019. Vol. 81. no. 4(82). pp. 34–39 doi: 10.20914/2310–1202–2019–4–34–39 (in Russian).
- 6 E.B. Aronova, Yu. G. Bazarnova, Yu. A. Smyatskaya. Method for directed cultivation of *Chlorella sorokiniana* microalgae biomass Patent RF, no. 2758355. (in Russian).
- 7 Rodríguez-Concepción M., Avalos J., Bonet M.L. A global perspective on carotenoids: metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health // *Progress in lipid research* (Ed. Elsevier). 2018. Vol. 70 pp. 62–93.
- 8 Maslova T.G., Markovskaya E.F., Slemnev N.N. Functions of carotenoids in the leaves of higher plants (review) // *Journal of General Biology*. 2020. Vol. 81, no. 4. pp. 297–310 doi: 10.31857/S0044459620040065 (in Russian).
- 9 CCAP 887/3 *Vischeria punctata*. Culture Collection of algae & protozoa. URL: <https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-887-3>.
- 10 Catalogue of the IPPAS microalgae culture collection (K.A. Timiryazev Institute of Physiology and Microbiology of the Russian Academy of Sciences). IPPAS H-242 *Vischeria punctata* Vischer. (in Russian). URL: <http://cellreg.org/catalog>
- 11 Krivova, Z.V., Maltsev E.I., Kulikovskiy M.S. The effect of nitrogen starvation on the fatty acid composition of strains of the genus *Vischeria* // *Study of aquatic and terrestrial ecosystems: history and modernity: Abstracts of the International Scientific Conference dedicated to the 150th anniversary of the Sevastopol Biological Station – A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas and the 45th anniversary of the research vessel Professor Vodyanitsky, Sevastopol, September 13–18, 2021. – Sevastopol: Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Research Center "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences", 2021. pp. 591–592 (in Russian).*
- 12 Babich O., Budenkova E., Kashirskikh, E. Dolganyuk V et al. Study of the Polysaccharide Production by the Microalga *Vischeria punctata* in Relation to Cultivation Conditions // *Life*. 2022. no. 12. pp. 1614. doi: 10.3390/life12101614
- 13 Alcáíno J., Baeza M., Cifuentes V. Cifuentes Carotenoid Distribution in Nature // *Biology, Environmental Science Sub-cellular biochemistry*. 2016. Vol. 79. pp. 3-33. doi: 10.1007/978–3–319–39126–7_1
- 14 Yu. G. Bazarnova, T.A. Kuznetsova, Yu. A. Smyatskaya Method for obtaining a pigment complex from the biomass of unicellular algae of the genus *Chlorella*. Patent RF, no. 2695879 C1. (in Russian).
- 15 Mulenga C., Clarke C., Meincken M. Physiological and growth responses to pollutant-induced biochemical changes in plants: A review. *Pollution*. 2020. Vol. 6. pp. 827-848. doi:10.22059/poll.2020.303151.821
- 16 Viviani, A., Verma, B. C., Giordani, T., Fambrini, M. L-Ascorbic acid in plants: From biosynthesis to its role in plant development and stress response. *Agrochimica: International Journal of Plant Chemistry, Soil Science and Plant Nutrition of the University of Pisa*. 2021. Vol. 65. no 2. pp. 151-171.
- 17 Wang J. Hu, X., Chen, J., Wang, T. et al. The Extraction of β -Carotene from Microalgae for Testing Their Health Benefits. *Foods* 2022, Vol. 11, pp. 502. doi: 10.3390/foods11040502
- 18 Wang L. Liu Z., Jiang H., Mao X. Biotechnology advances in β -carotene production by microorganisms // *Trends in Food Science & Technology*. 2021. Vol. 111. pp. 322-332. doi:10.1016/j.tifs.2021.02.077
- 19 Rozenberg J. M., Sorokin B.A., Mukhambetova A.N., Emelianova A.A. et al. Recent advances and fundamentals of microalgae cultivation technology // *Biotechnology Journal*. 2024. Vol. 19. no. 3. pp. 2300725. doi: 10.1002/biot.202300725
- 20 Martins C. B., Ferreira O., Rosado T., Gallardo E. et al. Eustigmatophyte strains with potential interest in cancer prevention and treatment: Partial chemical characterization and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity // *Biotechnology Letters*. 2021. Vol. 43. pp. 1487-1502. doi: 10.1007/s10529-021-03122-0

Сведения об авторах

Татьяна А. Кузнецова к.б.н., доцент, институт биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, ул. Новороссийская, 48, г. Санкт-Петербург, 184021, Россия, kuznetsova.ta1@spbstu.ru
 <https://orcid.org/0000-0003-0162-0896>

Маруф Х. Мустафакулов магистр, Институт биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, ул. Новороссийская, 48, г. Санкт-Петербург, 184021, Россия, marufbekmmxmr@gmail.com
 <https://orcid.org/0009-0004-4324-5646>

Вклад авторов

Татьяна А. Кузнецова обзор литературных источников по исследуемой проблеме, планирование и проведение экспериментов, выполнение расчетов, оформление и обсуждение результатов.

Маруф Х. Мустафакулов написал рукопись, корректировал её до подачи в редакцию и несет ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about authors

Tatiana A. Kuznetsova Cand. Biological Sciences, assistant professor, Institute of Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, st. Novorossiyskaya, 48, St. Petersburg, 184021, Russia, kuznetsova.ta1@spbstu.ru

 <https://orcid.org/0000-0003-0162-0896>

Maruf H. Mustafakulov student, Institute of Biomedical Systems and Biotechnology, Peter the Great Sankt. Petersburg Polytechnic University, st. Novorossiyskaya, 48, St. Petersburg, 184021, Russia, marufbekmmxmr@gmail.com

 <https://orcid.org/0009-0004-4324-5646>

Contribution

Tatiana A. Kuznetsova a review of literary sources on the studied problem, planning and conducting experiments, performing calculations, writing and discussing the results.

Maruf H. Mustafakulov wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 22/10/2024	После редакции 15/11/2024	Принята в печать 27/11/2024
Received 22/10/2024	Accepted in revised 15/11/2024	Accepted 27/11/2024