

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр  
“Институт биологии южных морей  
имени А.О. Ковалевского РАН”

*на правах рукописи*

**Железнова Светлана Николаевна**

**ПРОДУКЦИОННЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *CYLINDROTHECA  
CLOSTERIUM* (EHRENBERG) REIMANN ET J.C. LEWIN 1964**

03.02.10 – гидробиология

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Рябушко Виталий Иванович

Севастополь – 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1 ПРОДУКТИВНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)</b> .....	11
<b>ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	39
2.1 Объект исследования .....	39
2.2 Методы и условия выращивания <i>C. closterium</i> .....	39
2.3 Количественное определение биохимического состава <i>C. closterium</i> .....	48
2.3.1 Белок .....	48
2.3.2 Общие липиды .....	50
2.3.3 Углеводы .....	51
2.3.4 Зольный остаток .....	53
2.4 Определение биогенных элементов .....	54
2.5 Определение тяжелых металлов .....	54
2.6 Определение содержания фукоксантина в биомассе микроводоросли .....	55
2.6.1 Получение фукоксантина в кристаллической форме .....	56
2.7 Определение жирных кислот .....	58
2.8 Статистическая обработка результатов .....	59
<b>ГЛАВА 3 ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ <i>CYLINDROTHECA CLOSTERIUM</i></b> .....	60
3.1 Морфо-экологическая характеристика .....	60
3.2 Интенсивная культура .....	65
3.3 Новая питательная среда для интенсивного культивирования .....	68
3.4 Продукционные характеристики в накопительном режиме .....	74
3.4.1 Влияние различных источников азота .....	74
3.4.2 Углеродное питание. Эффективность фиксации углерода .....	86

3.4.3 Интенсивная культура на питательной среде с гидрокарбонатом .....	90
3.4.4 Оптимизация температуры .....	96
3.4.5 Оптимизация интенсивности освещения .....	98
3.5 Продукционные характеристики культуры в двухступенчатом проточном хемостате .....	100
<b>ГЛАВА 4 БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ <i>CYLINDROTHECA CLOSTERIUM</i> ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ</b> .....	125
4.1 Биохимический состав водоросли в условиях накопительного культивирования .....	125
4.2 Биохимический состав водоросли в условиях проточного режима культивирования.....	142
<b>ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ <i>CYLINDROTHECA CLOSTERIUM</i></b> .....	156
5.1 Технология получения биомассы диатомовой водоросли с высоким содержанием фукоксантина .....	157
5.2 Спиртовой экстракт из биомассы диатомовой водоросли .....	160
5.3 Способ обогащения растительного масла фукоксантином .....	163
5.4 Фукоксантин в кристаллической форме .....	165
5.5 Полупромышленное культивирование диатомовой водоросли .....	166
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	173
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	175
<b>ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ</b> .....	176
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	178

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Морские диатомовые водоросли являются ценным природным источником биологически активных веществ (БАВ): фукоксантина (Фк) [226, 274, 280, 285], полиненасыщенных жирных кислот [60, 101], макро- и микроэлементов [114, 251], незаменимых аминокислот [158]. БАВ диатомовых водорослей обладают противоопухолевыми, радиопротекторными, иммуномодулирующими, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми, гипотензивными, антиоксидантными, антимуtagenными, гиполипидемическими и другими полезными свойствами [96, 118, 119, 146, 165, 173, 174, 176, 214]. Диатомовые водоросли содержат высокие концентрации незаменимой эйкозапентаеновой кислоты, которая способствует снижению различных патологий у человека, в т.ч. предотвращает заболевания сердечно-сосудистой системы, и должна поступать в организм из продуктов питания [10]. Скорости роста и биосинтеза ценных веществ у диатомовых водорослей достаточно высокие, поэтому они являются перспективным сырьем для создания лечебно-профилактических средств.

Из всего разнообразия диатомовых водорослей можно выделить бентосно-планктонную водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et J.C. Lewin 1964. Данная водоросль характеризуется высоким содержанием фукоксантина (2% сухой массы) [99, 276], ПНЖК (5% сухой массы), среди которых преобладают эйкозапентаеновая и арахидоновая кислоты [182, 245], содержит все незаменимые аминокислоты [158], а также все необходимые для человека микро- и макроэлементы [114, 251]. Однако эти данные разрознены и не дают представления о биотехнологическом потенциале *C. closterium*. Таким образом, актуальность исследования определяется необходимостью изучения продукционных и биохимических характеристик *C. closterium* в накопительном и проточном режимах культивирования с целью определения основных характеристик субстратзависимого роста и биосинтеза ценных веществ, а также

оптимизации получения биомассы с высокой концентрацией фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время в литературе встречаются данные в основном по накопительному режиму культивирования *C. closterium* на обеднённых питательных средах F/2 и F [62, 274]. Данные среды не позволяют получить плотную культуру и не дают полноценного понимания физиологических механизмов биосинтеза ПНЖК и фукоксантина [202, 263]. Отсутствуют данные по культивированию *C. closterium* в проточной культуре, нет полного понимания механизмов накопления ПНЖК и фукоксантина в условиях изменения температуры, облученности, спектрального состава света. Поэтому данная работа посвящена исследованию продукционных характеристик и биохимического состава *C. closterium* в интенсивной накопительной и проточной культуре, а также выявлению оптимальных условий среды для роста микроводоросли и биосинтеза ценных веществ.

**Цель работы** - изучить продукционные и биохимические характеристики интенсивной культуры диатомовой водоросли *C. closterium* в накопительном и проточном режимах культивирования для получения максимальной биомассы с высоким содержанием фукоксантина и ПНЖК.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить потребности *C. closterium* в биогенных элементах и разработать новую питательную среду для получения плотной культуры микроводоросли.

2. Определить оптимальный диапазон температур, рН, поверхностной облученности и соотношение концентраций биогенных веществ в питательной среде для роста *C. closterium* и биосинтеза ценных веществ в накопительной и проточной культуре.

3. Изучить биохимические и продукционные характеристики *C. closterium* в накопительном и проточном режимах культивирования и определить скорости синтеза фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот.

4. Разработать новые технологии получения целевых продуктов лечебно-профилактического назначения из биомассы и БАВ *C. closterium*.

**Научная новизна.** Разработана новая питательная среда для плотной культуры диатомовой водоросли *C. closterium*. Впервые показано, что при интенсивном культивировании водоросли с целью получения максимального выхода биомассы возможно, как альтернативу нитрату натрия, использование мочевины в качестве источника азота. Установлено, что *C. closterium* способна расти и вегетировать при высоких концентрациях нитрита, а добавление азота в аммонийной форме в питательную среду во время активного роста микроводоросли приводит к ингибированию всех процессов метаболизма и гибели культуры. Определены оптимальные параметры технологии выращивания *C. closterium*. Выявлен оптимальный диапазон температуры и поверхностной облучённости для роста культуры и синтеза ценных веществ. Впервые проведены исследования проточной культуры в двухступенчатом хемостате. Установлена линейная связь массовой доли фукоксантина и общих липидов в биомассе *C. closterium* для различных условий культивирования. Разработаны новые технологии, защищённые патентами РФ, получения целевых продуктов лечебно-профилактического назначения из биомассы и БАВ *C. closterium* [16, 32, 49].

**Теоретическая и практическая значимость.** Определены наблюдаемые потребности в основных биогенных элементах. Рассчитаны такие важные физиологические характеристики как максимальная удельная скорость субстратзависимого роста и константа насыщения при лимитировании роста кремнием. Подобраны оптимальные условия культивирования *C. closterium* в питательной среде по концентрации биогенных веществ, температуре, pH, освещённости для получения биомассы с высоким содержанием ПНЖК и Фк. Показано, что микроводоросль обладает значительным потенциалом для создания промышленной технологии получения фукоксантина и ПНЖК. На основе биомассы микроводоросли *C. closterium* разработаны различные лечебно - профилактические добавки [16, 32, 49].

**Методы исследования.** Альгологически чистую культуру *C. closterium* выращивали на стерильной питательной среде F/2 [135] в экстенсивном режиме. Плотную культуру в интенсивном режиме выращивали на питательной среде RS [242]. Ультраструктуру клеток изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ SU3500, Hitachi, Japan). Содержание фукоксантина определяли методом тонкослойной хроматографии со стандартом. В качестве стандарта использовали кристаллический фукоксантин, полученный из биомассы *C. closterium* и охарактеризованный методами масс- и ЯМР-спектроскопии. Содержание общих липидов определяли колориметрическим методом [39]. Жирнокислотный состав липидов *C. closterium* анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Идентификация мононенасыщенных жирных кислот (МЭЖК) выполнена на газохроматографическом комплексе «Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ на хроматографе Кристалл 5000.2 (ЗАО СКБ "Хроматэк", Россия). Массовую долю белка в биомассе водорослей определяли по методу Лоури в модификации [8], углеводы - по методу Дюбуа [104] в нашей модификации.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Соотношения биогенных элементов в питательных средах, используемых для выращивания диатомовой водоросли *C. closterium*, не являются оптимальными для её интенсивного культивирования.

2. В культуре *C. closterium* процессы роста и синтеза биологически активных веществ разобщены во времени, поэтому для получения биомассы с высоким содержанием фукоксантина и ПНЖК необходимо использовать двухступенчатое проточное культивирование.

3. Скорость синтеза фукоксантина пропорциональна скорости синтеза суммарных липидов в биомассе *C. closterium*.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечена большим количеством экспериментов и отобранных проб, многократностью повторения измерений и применением статистических методов

обработки экспериментальных данных. Все полученные результаты и выводы подкреплены данными, приведенными в рисунках и таблицах.

**Личный вклад соискателя.** Автор принимал непосредственное участие в постановке экспериментов по накопительному и проточному режиму культивирования *C. closterium*, в проведении биохимических анализов, самостоятельно интерпретировал и обобщал полученные данные. Также автор принимал участие в обсуждении результатов и написании текстов совместных статей с соавторами. Диссертационная работа написана лично соискателем.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были представлены: XIII международная научная конференция альгологов «Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований» (Борок, 2013); Молодёжная научно-практическая конференция «Экологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление прибрежной зоной» (Севастополь, 2014); Международная научная конференция «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России» (Ростов-на-Дону, 2014); IX и XI всероссийские научно-практические конференции молодых учёных (с международным участием) по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus» (Севастополь, 2015, 2019); IV международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, 2015); Международная научная конференция «Актуальные проблемы аквакультуры в современный период» (Ростов-на-Дону, 2015); Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых учёных, посвященные 125-летию Ин-та физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений» (Москва, 2015); XI, XIII и XIV международные научно-технические конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2016, 2018, Москва, 2019); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, приуроченная к 145-летию Севастопольской биологической станции» (Севастополь, 2016); Международная

научно–практическая конференция «Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ (Нарочанские чтения – 11)» (Минск – Ставрополь, 2017); III российская конференция по медицинской химии, посвященная памяти академика Николая Серафимовича Зефирова (Казань, 2017); XV всероссийская научно-практическая конференция «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 2018); III научно-практическая конференция с международным участием и научная школа по клеточной биотехнологии «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере» (Якутск, 2018); VII научно-практическая конференция молодых учёных с международным участием «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса» (Москва, 2019).

**Структура и объём работы.** Диссертация изложена на 212 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 291 источник, из них 232 иностранных. Работа содержит 19 таблиц и 64 рисунка.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 35 научных работ, из которых: 8 – в специализированных научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в т.ч. 3 патента. 5 статей входят в базу SCOPUS, 19 работ – в сборниках материалов и тезисов международных конференций. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоит в выборе и разработке методов исследования, получении экспериментальных данных, обсуждении и написании текста статей и тезисов. Права соавторов публикаций не нарушены.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность научному руководителю диссертационной работы, д.б.н. В.И. Рябушко за помощь при постановке цели и задач исследования, обсуждении результатов, участие в написании совместных работ. Особую благодарность выражаю к.х.н. М.В. Нехорошеву – за помощь в освоении методик определения фукоксантина, белков,

углеводов, липидов и жирных кислот, к.б.н. Р.Г. Геворгизу – за помощь в получении интенсивной культуры *C. closterium* и проведении экспериментальных работ по её культивированию, обсуждении результатов, м.н.с. Н.И. Бобко – за помощь в определении содержания элементов в пробах, д.б.н. Л.И. Рябушко – за консультации по экологии и определению вида в световой и электронной микроскопии, к.б.н. Л.В. Ладыгиной, за помощь в формировании экспериментальных навыков и содействие в работе, а также коллективу Отдела аквакультуры и морской фармакологии. Автор выражает благодарность Dr. Takashi Maoka (Research Institute for Production Development, Kyoto, Japan) за помощь в идентификации фукоксантина.

## ГЛАВА 1 ПРОДУКТИВНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

**Особенности диатомовых водорослей, приобретённые в результате вторичного эндосимбиоза.** Успехи в развитии науки и техники обусловили в последние годы более углубленное изучение во всем мире сырьевых, в том числе водных, биоресурсов [72]. Результаты исследования показали, что водные биоресурсы являются источником разнообразных биологически активных веществ (БАВ), которые могут использоваться для производства фармацевтической и косметической продукции, стимуляторов продуктивности сельскохозяйственных животных и растений [72, 91, 188].

Особенности химического состава морских диатомовых водорослей обуславливают повышенное к ним внимание как к сырью для производства пищевых продуктов и получения БАВ [72]. Диатомовые водоросли возникли в результате вторичного эндосимбиоза, в котором принимали участие группы зелёных, красных микроводорослей и гетеротрофный эукариот (экзосимбионт), что обуславливает уникальность их биохимического состава [74, 112] и пластичность путей метаболизма, так как диатомовые водоросли унаследовали гены зелёных, красных микроводорослей, а также цианобактерий и эукариот [156, 159, 168].

Высшие растения, зелёные и красные микроводоросли возникли в результате первичного эндосимбиоза [168, 210]. В процессе первичного эндосимбиоза цианобактерия была поглощена нефотосинтетическим эукариотом, тем самым эукариот приобрел фотосинтетический аппарат, который размещался внутри органеллы, окружённой двумя мембранами [238] (рисунок 1.1). Эндосимбиотический процесс включал перенос тысячи генов из генома цианобактерий в эукариотическое ядро хозяина [194, 232], а геном хлоропласта уменьшился до нескольких сотен генов [159, 168, 210].

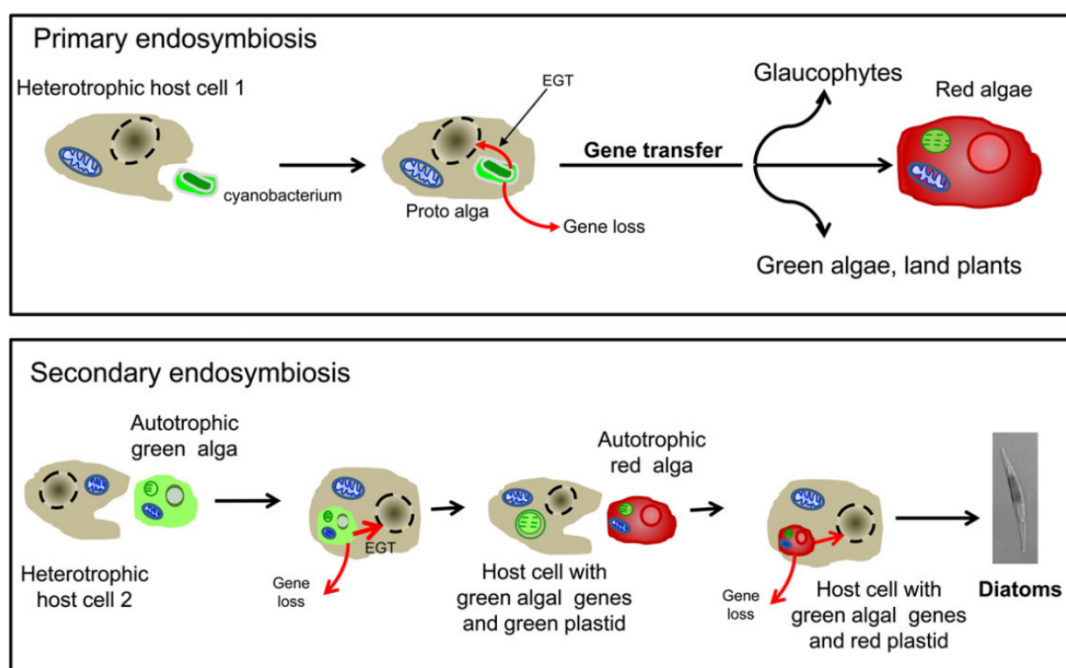


Рисунок 1.1 — Схема первичного и вторичного эндосимбиоза, в результате которых образовались диатомовые водоросли [232]

При вторичном симбиозе нефотосинтетический гетеротрофный организм, не имевший изначально пластид, получал их при захвате первичного симбионта. При этом нефотосинтетический организм вступил сначала в симбиоз с зеленой микроводорослью, а потом с красной микроводорослью, в результате чего возникли диатомовые водоросли [159]. Данный факт объясняет то, что у многих диатомовых водорослей в ядре обнаружены гены, унаследованные от зеленых и красных микроводорослей, а также от цианобактерий и эукариотических организмов. Именно вторичный эндосимбиоз обуславливает способность выживать при неблагоприятных условиях среды.

Диатомовые водоросли содержат высокие концентрации полиненасыщенных омега-3 жирных кислот [60, 101], фукоксантина [226, 285], богаты белками [158], макро- и микроэлементами [114]. БАВ диатомовых водорослей обладают противоопухолевыми, иммуномодулирующими, онкопрофилактическими, противовоспалительными, гипотензивными,

противовирусными, радиопротекторными, гиполипидемическими, антикоагулянтными, антибактериальными, противогрибковыми, антимуtagenными и другими полезными свойствами [174, 176]. Поэтому морские диатомовые водоросли являются перспективным растительным сырьём для создания лечебно-профилактических средств [91].

Среди диатомовых водорослей можно выделить вид *Cylindrotheca closterium*, который содержит комплекс компонентов, необходимых организму человека. Клетки микроводоросли богаты полиненасыщенными жирными кислотами, микро- и макроэлементами, белками, а также содержат пигмент – фукоксантин [158, 251, 263, 273, 274]. Вид не токсичен, поэтому является ценным сырьём для получения БАВ и используется в аквакультуре, как кормовой объект для моллюсков [158, 246].

Вид *C. closterium* не являясь термофильным организмом (оптимум обитания 15–19 °С), тем не менее, может существовать в широком диапазоне дневных температур (до 28 °С), и толерантна к низким ночным температурам (до 8-9 °С) [62, 243]. В природных условиях плотность *C. closterium* достигает до 2 тыс. кл.л<sup>-1</sup> [243]. Данный вид водоросли доминирует в весенне-летний период, вспышка наблюдается в марте-апреле, а также в декабре. С повышением температуры воды до +24 °С наблюдается снижение всех количественных показателей. В середине лета на малых глубинах *C. closterium* практически отсутствует [243]. *C. closterium* является морским и солоноватоводным, эвригалинным (выдерживает солёность от 10 до 40 ‰), неритическим, бентопланктонным видом, обитающим как в фитопланктоне, так в литорали и сублиторали морей [47]. *C. closterium* встречается во всех бухтах крымского побережья Чёрного моря на всех типах субстратов [41].

При культивировании в лабораторных условиях вид погибает при высоких рН (~11,0). Также надо отметить, что важным условием при интенсивном культивировании является содержание в морской воде достаточного количества кремния [195]. Очень низкая концентрация солей кремния в питательной среде

может значительно тормозить рост и развитие *C. closterium* [116]. При определённых условиях клетки *C. closterium* легко переходят от автотрофного к миксотрофному и гетеротрофному типам питания [180, 268].

**Морфология, ультраструктура и жизненный цикл *C. closterium*.** Клетки *C. closterium* одиночные, подвижные, имеют цилиндрическую форму (рисунок 1.2), створки скручены по апикальной оси, могут иметь довольно большие размеры: высота варьирует от 3,8 до 8,1 мкм, длина - от 30 до 272 мкм [242].

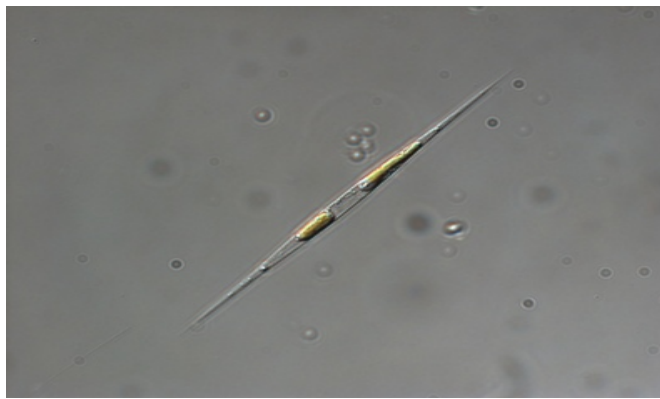


Рисунок 1.2 — Клетки диатомовой водоросли *Cylandrotheca closterium* [<http://oceandatacenter.ucsc.edu/PhytoGallery/Diatoms/cylandrotheca.html>]

Клетка диатомовой водоросли состоит из протопласта, окруженного кремнеземной оболочкой, называемой панцирем (рисунки 1.2; 1.5) [110]. Протопласт своим наружным уплотненным слоем тесно примыкает к панцирю. Поверхность панциря в свою очередь покрыта тонким пектиновым слоем. Целлюлозной оболочки, имеющейся у большинства водорослей, здесь нет. Стенки панциря пронизаны мельчайшими отверстиями, обеспечивающими обмен веществ между протопластом и окружающей средой [281].

Водоросль *C. closterium* – генетически двудомная. Размножается как с помощью вегетативного деления (основной способ), так и с помощью полового процесса [270]. В процессе вегетативного размножения происходит типичное

митотическое деление диплоидного ядра, в результате клетка уменьшает свои размеры. В клетке происходит деление ядра и хроматидов, затем протопласт материнской клетки делится на две дочерние, при этом одна дочерняя клетка имеет эпитеку, а вторая гипотеку. После деления дочерние протопласты достраивают недостающую им створку. В результате деления одна из дочерних клеток, получившая от материнской эпитеку, точно повторяет размеры материнской клетки. Вторая дочерняя клетка, получившая гипотеку, будет меньших размеров. Во время полового процесса формируется аукоспора, которая способствует восстановлению прежних размеров клетки.

Первый признак полового размножения - спаривание вегетативных клеток, которые лежат друг напротив друга (рисунок 1.3, фото 9, 11) [270]. Первое деление мейоза похоже на деление митоза и включает продольное деление клетки, разделяющее родительскую клетку на две части, включая хлоропласты и ядро (рисунок 1.3, фото 10, 12, 13). Второе мейотическое ядерное деление происходит в обеих удлинённых клетках, образовавшихся в результате первого мейотического деления (рисунок 1.3, фото 12) и не сопровождается клеточным делением. Клетки становятся короче (рисунок 1.3, фото 10, 13–15), внутри клеток образуются гаметы. В конце процесса каждая клетка содержит по две сферических гаметы.

Одно из двух дочерних ядер в каждой гамете вырождается (рисунок 1.3, фото 16). После завершения процесса гаметогенеза каждая клетка, содержащая гаметы, сливается с ближайшей клеткой, которая тоже содержит гаметы (рисунок 1.3, фото 18, 19). В результате образовывается зигота. Зигота расширяется, превращаясь в аукоспору (рисунок 1.4).

Именно образование аукоспоры восстанавливает прежние размеры клетки. Таким образом, благодаря половому процессу клетки диатомовой водоросли не вырождаются. У *C. closterium* встречается как изогамия, так и автогамия.

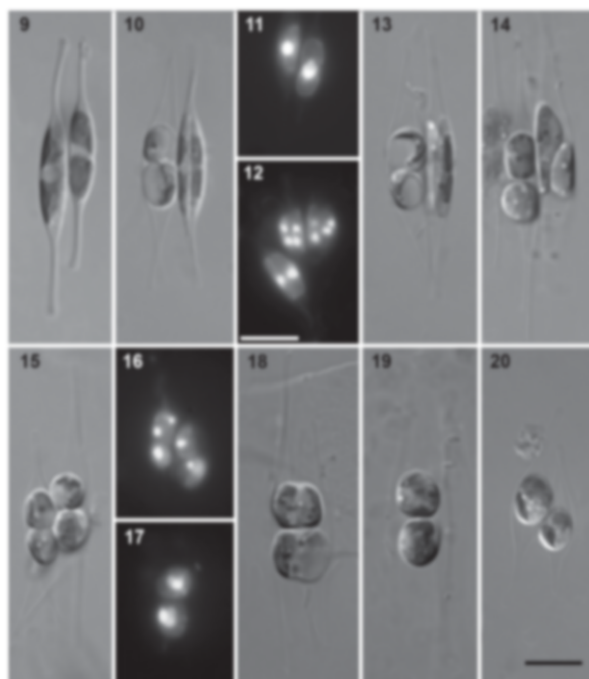


Рисунок 1.3 — Стадии полового процесса у *Cylandrotheca closterium* [270]

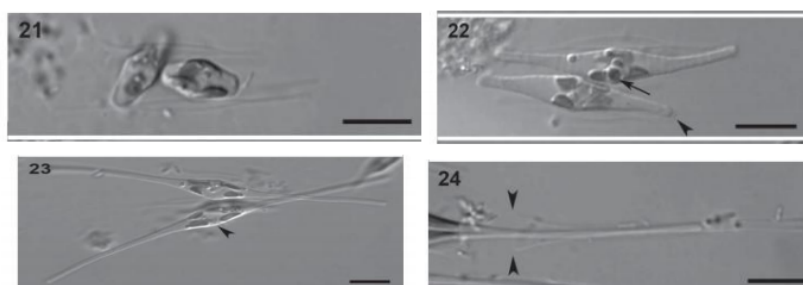


Рисунок 1.4 — Образование аукоспоры и начальное образование клеток у *Cylandrotheca closterium* [270]

Кремнистый панцирь выполняет несколько основных функций: механическую, гидродинамическую и оптическую [103]. Обнаружено, что кремнистый панцирь диатомовых водорослей способен противостоять давлению в диапазоне от 1 до 7 Н·мм<sup>-2</sup>, что эквивалентно 100–700 т·м<sup>-2</sup> [138]. Помимо механической защиты и фильтрации питательных веществ, кремнистый панцирь играет основополагающую роль в манипулировании светом, повышая тем самым эффективность фотосинтеза в условиях, когда свет не так легко доступен.

Кремнистый панцирь диатомовой водоросли выполняет функции сбора и фокусировки света, избирательной передачи света и фотолюминесценции [103].

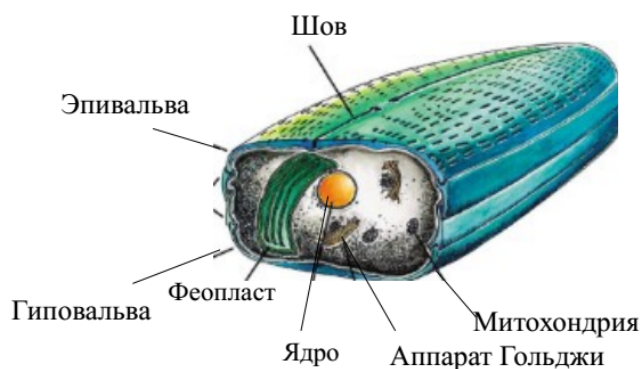


Рисунок 1.5 — Схематическое изображение общих структурных особенностей клетки диатомовой водоросли [110]

Одной из основных функций наноструктур панциря бентосных диатомовых водорослей является уменьшение интенсивности потока синего света. Свет может рассеиваться в бороздках кремнистого панциря, чтобы равномерно попадать на хлорофиллы внутри диатомовых водорослей для усиления процессов фотосинтеза. С другой стороны, когда интенсивность падающего света слабая, хлорофиллы внутри диатомей приближаются к внутренней наноструктуре панциря, чтобы уловить данные длины волн для фотосинтеза [281].

Панцирь может выдерживать действие высоких температур, концентрированных кислот и щелочей, состоит из двух почти равных частей: эпитеки и гипотеки (рисунок 1.6 А) [192]. Эпитека – наружная, большая часть панциря, заходит своими краями на внутреннюю половину – гипотеку [103, 249]. Эпитека и гипотека состоят из створки и пояскового ободка. Створки и их концы бывают самых различных очертаний (рисунок 1.6 А).

Особенности строения панциря диатомей заложены в основу их классификации [103, 249]. Наиболее сложное устройство имеет так называемый каналовидный шов - канал, расположенный в складке стенки створок. По одному

краю каждой створки проходит киль (узкий выступ), в котором расположен каналовидный шов. Киль гипотеки и киль эпитеки расположены на противоположных сторонах створок. Только у представителей рода *Cylindrotheca* шов спирально окружает панцирь. Шов характеризуется наличием множества фибул, которые соединяются с поверхностью клапана (рисунок 1.6 Б).

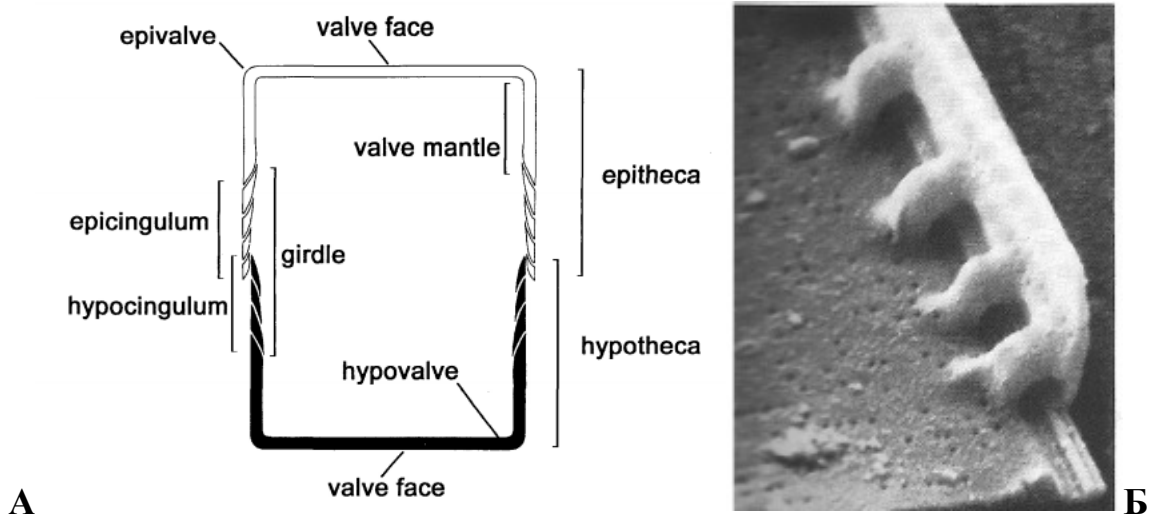


Рисунок 1.6 — Строение панциря пеннатных диатомовых водорослей (А); каналовидный шов и фибулы (Б) на створке у представителей рода *Cylindrotheca* [192]

Как известно, панцирь диатомовые водоросли образуют из диоксида кремния (80 % панциря). Процесс образования кремнистого панциря начинается с образования под плазмалеммой трехслойной мембраны – силикалеммы, в которой возникают так называемые пузырьки отложения кремнезема [272]. Проходя через силикалемму, кремнезём концентрируется в пузырьке. Большую роль в ассимиляции диоксида кремния из окружающей среды играют силаффины и длинноцепочечные полиамины, которые также обнаружены в составе кремнистой оболочки [144, 169]. Силаффины - это пептиды, которые имеют многочисленные посттрансляционные модификации. Силаффины диатомовых водорослей рода *Cylindrotheca* содержат остатки лизина, которые связаны с ε-аминогруппами

длинноцепочечных полиаминов. Именно благодаря этой модификации силафаны могут осаждать диоксид кремния в слабокислой среде [144, 169].

Биогенный кремнезём синтезируется внутриклеточно за счет полимеризации мономеров кремниевой кислоты [249]. Кроме кремнезема в состав панциря входит примесь некоторых металлов (железо, алюминий, магний). В центральной части клетки – одно ядро и два хлоропласта (рисунок 1.5). В результате процесса вторичного эндосимбиоза у *C. closterium* сформировались четыре мембраны, окружающие хлоропласты (рисунок 1.7) [143].

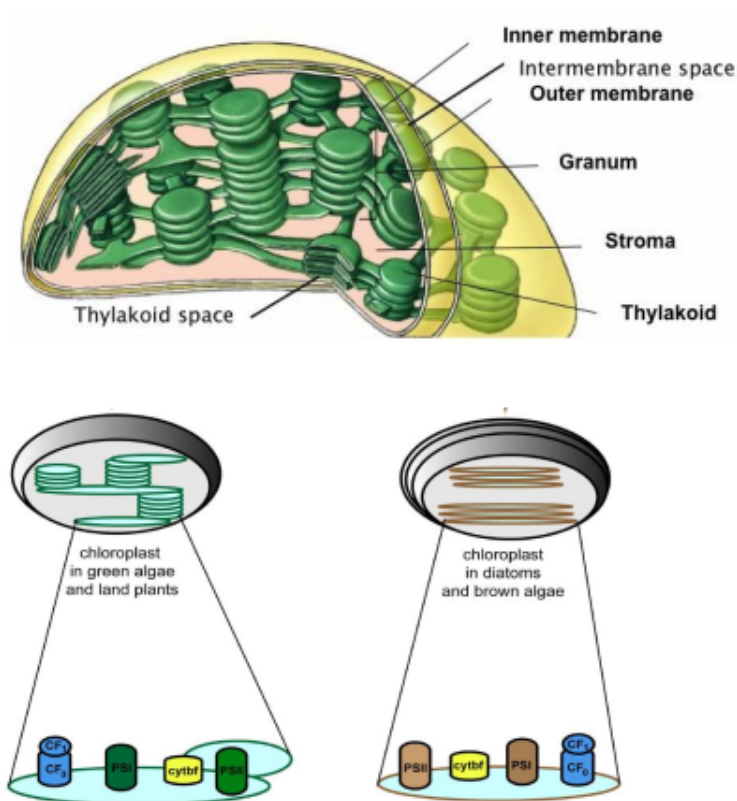


Рисунок 1.7 — Структура хлоропласта высших растений. Сравнение организации тилакоидных мембран диатомовых водорослей с другими видами водорослей [143]

Внешняя мембрана связана с эндоплазматической сетью [161]. В результате вторичного эндосимбиоза хлоропласты диатомовых приобрели большое сходство с хлоропластами красных водорослей [159, 210]. В составе хлоропласта диатомовых

обнаружено значительное содержание белков групп зеленых водорослей, митохондрии диатомовых были заимствованы от нефотосинтетического экзосимбионта [159, 210]. Однако ультраструктура хлоропластов значительно отличается от ультраструктуры хлоропластов высших растений и зеленых макро- и микроводорослей.

Тилакоидные мембраны не дифференцированы на грани, отсутствуют стромальные ламеллы. Тилакоиды в хлоропласте собраны в стопки по три (рисунок 1.7, показаны коричневым цветом) и образуют анастомозы, когда одиночный тилакоид от одной стопки присоединяется к другой. Тилакоидные мембраны высших растений и зелёных водорослей расположены внутри хлоропласта, собраны в стопки, образуют грани (показаны зелёным цветом), связанные между собой ламеллами [130].

Фотосинтетический аппарат у *C. closterium* ничем не отличается от высших растений и зеленых водорослей и состоит из четырёх комплексов: фотоокислительной фотосистемы II (PSII), цитохрома  $b_6 / f$  (cytbf), фотосистемы I (PSI) и  $H^+$  - транслоцирующей АТФ-синтазы (CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>) [213]. Следует отметить, что данные комплексы в *C. closterium* расположены равномерно, в отличие от зелёных водорослей. Фотосистемы (PS) состоят из реакционного центра (RC) и светособирающих комплексов (LHCs). В LHCs обнаружены тетрапирролы и каротиноиды. Все LHCs и пигменты находятся именно в тилакоидных мембранах [177, 278].

**Пигментный состав *C. closterium*.** У *C. closterium* идентифицированы следующие каротиноиды:  $\beta$ -каротин, фукоксантин, диатоксантин, диадиноксантин, виолаксантин, зеаксантин, неофукоксантин [136, 170]. Предшественником данных каротиноидов в биосинтезе является бета-каротин, поэтому *C. closterium* не способна синтезировать такие ксантофиллы, как  $\alpha$ -каротин или лютеин. Хлорофилл *b*, присутствующий у высших растений, у *C. closterium* заменяется на хлорофилл *c* (*Chl c*) [170]. Поэтому окраска хлоропластов и соответственно клеток желто-коричневая, которая обусловлена отсутствием

хлорофилла *b*, а также высоким содержанием ксантофиллов. Среди различных форм хлорофиллов *c* (*Chls c*), идентифицированных в диатомовых в т.ч. у *C. closterium*, наиболее распространенными являются *Chl c1* и *Chl c2*. Хлорофилл *c* изменяет спектр поглощения, создает мощную полосу поглощения в синей области и слабую полосу поглощения в красной области [170].

Из всего состава каротиноидов *C. closterium* фукоксантин – светособирающий каротиноид, содержание которого значительно превышает количество всех остальных каротиноидов [177, 278]. Ряд специалистов считает *C. closterium* наиболее перспективным продуцентом Фк, т.к. на его долю приходится 78 % общего содержания каротиноидов, что составляет 1,7 % сухой массы, а содержание диадиноксантина и β-каротина составляет 11 % и 8 % от общего содержания каротиноидов [225]. При неблагоприятных факторах среды пигментный состав претерпевает существенные изменения. При этом происходит частичная деградация диадиноксантина, диатоксантина, β-каротина и накопление Фк, содержание которого может достигать 90 % общего содержания каротиноидов.

Многие исследования на различных клеточных линиях *in vivo* подтвердили, что именно Фк обладает антираковой активностью [145, 173, 217, 283] и оказывает антипролиферативный эффект за счет влияния на различные молекулы, включая белки Bcl-2, MAPK, NFκB, каспазы, GADD45 и некоторые другие молекулы, которые участвуют в остановке клеточного цикла раковых клеток и их апоптозе. Следовательно, Фк может быть использован в качестве химиотерапевтического средства при онкологических заболеваниях.

Большая часть пигментов находится в хлорофилл *a/c*- белковых светособирающих комплексах (LHCs) тилакоидов мембран и локализованы в липидной части мембраны [177]. Фк в клетках *C. closterium* присутствует в виде хлорофилл *a/c* белковых комплексов (FCPs), которые могут быть связаны с фотосистемой I (PSI) и фотосистемой II (PSII). Данные комплексы играют важнейшую роль в клетке – собирают световую энергию и преобразуют её для дальнейших процессов фотосинтеза. При этом взаимосвязь Фк с белковой

основой приводит к батохромному (красному) смещению и FCPs, поглощает в основном длины волн 470 и 550 нм, сине-зелёную область спектра света, преобладающую в глубинных водах. В последнее время был изучен молекулярный состав данных комплексов [90, 170].

В фукоксантин-хлорофилл а/с собирающих комплексах (FCPs) соотношение концентраций хлорофилла *a* к Фк постоянно и составляет 1 : 1, в то время как другие LHCs связывают гораздо больше молекул хлорофилла (*Chl*), чем молекул каротиноидов. Например, LHCs II состоит из 14 молекул *Chl* и только 4 молекул каротиноидов [134, 177]. На рисунке 1.8 показано строение фукоксантин - хлорофилл а/с комплексов диатомовых водорослей.

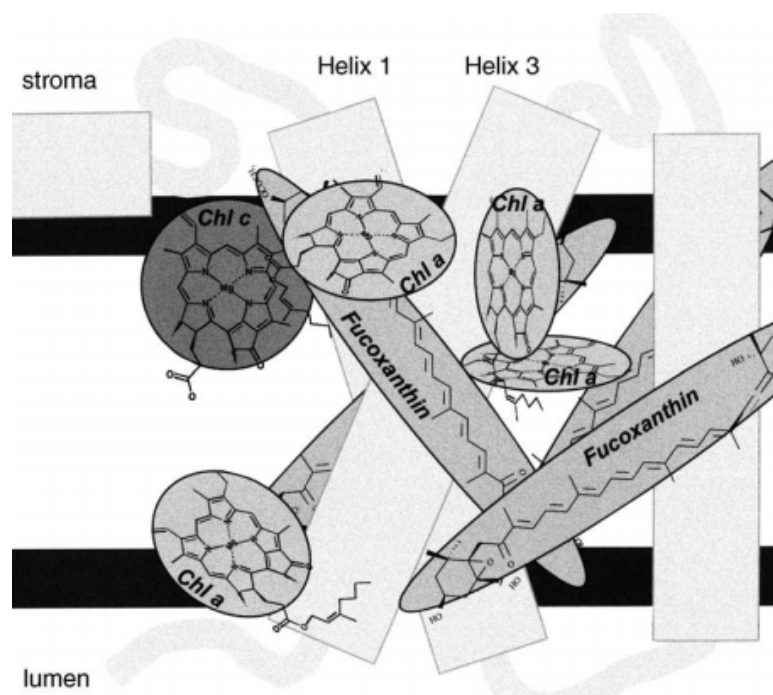


Рисунок 1.8 — Модель фукоксантин -хлорофилл а/с собирающих комплексов (FCPs). Вторичная структура основана на гомологии последовательностей с белками LHC [277], пигменты расположены с учетом консервативных сайтов связывания, а также результатов спектроскопии [219]. *Chl c* расположен в непосредственной близости от *Chl a* и два фукоксантина расположены так же, как лютеины в LHCII

На мономер FCPs приходится не меньше четырех молекул Фк и общее соотношение Chl *a* : Фк : Chl *c*<sub>2</sub> в комплексе составляет 4 : 4 : 1 [229]. FCPs, как и LHCs высших растений, встраиваются в тилакоидные мембраны с помощью трех мембранных  $\alpha$ -спиралей. Однако обнаружено, что FCPs имеют меньший размер, по сравнению с LHCs высших растений, что в свою очередь, делает их более гидрофобными [270, 277]. Все известные FCPs имеют молекулярную массу от 17 до 23 кДа и классифицируются на три основные группы [157]. Первая группа FCPs является основной для диатомовых водорослей, выполняет светособирающую функцию, содержит белки, заимствованные в результате эндосимбиоза у бурых макрофитов, которые кодируются генами *fcp1-3* и *fcp5*. Эти гены впервые были обнаружены у *Cyclotella cryptica* и *Phaeodactylum tricornerutum* [109, 129]. Вторая и третья группы включают FCPs, ответственные за защиту фотосистем при избыточном освещении, т.е. выполняют светозащитную функцию. Вторая группа FCPs диатомей содержит белок *lhca*, который был заимствован диатомеями в результате вторичного эндосимбиоза от красных водорослей и кодируется генами *fcp4*. Третья группа FCPs содержит белок семейства L1818, который заимствован у зелёных водорослей (*C. cryptica*) и кодируется генами *fcp6*, 7 и 12 [89, 157, 175, 290].

Диадиноксантин (Ddx) и диатоксантин (Dtx) – дополнительные каротиноиды, которые образуют диадиноксантиновый цикл и также участвуют в фотозащите. В природных условиях *C. closterium* подвергается резким изменениям светового облучения. Чрезмерное воздействие света может привести к разрушению PSII. Для фотозащиты *C. closterium* использует два ксантофиловых цикла: диадиноксантиновый (Ddx) и виолаксантиновый (Vx) циклы [157, 175, 271, 277]. Данные циклы связаны между собой и представлены на схеме биосинтеза Фк (рисунок 1.9).

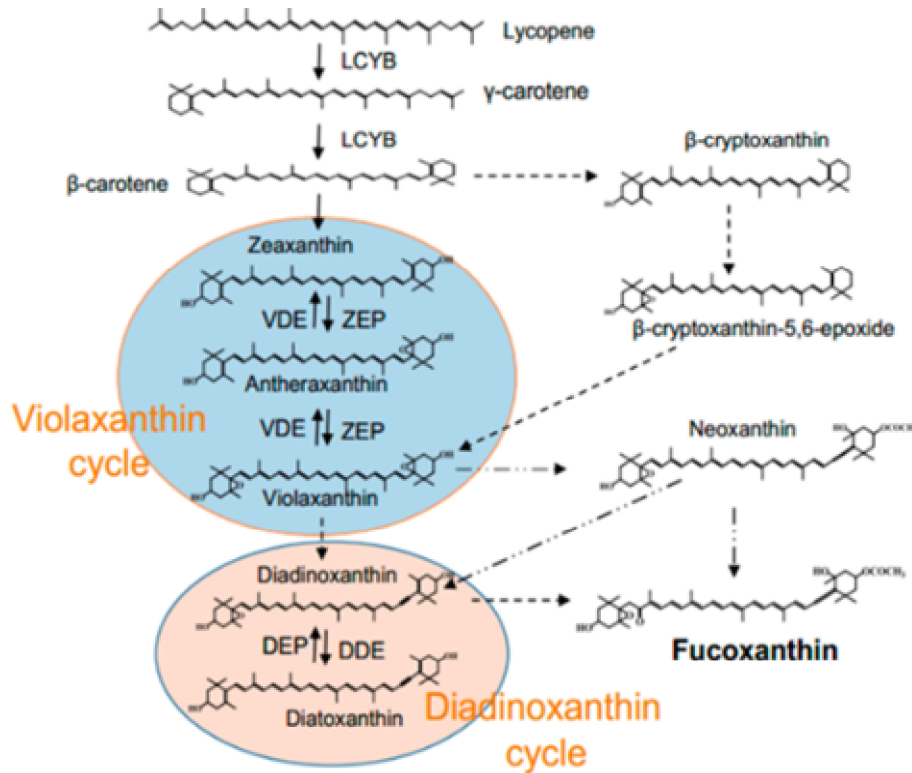


Рисунок 1.9 — Биосинтез фукоксантина в диатомовых водорослях [137]

Диадиноксантиновый цикл – важный фотозащитный механизм *C. closterium*. При высоком освещении диадиноксантин дезэпоксируется в диатоксантин, что приводит к диссипации избыточной световой энергии. Наличие DtxDT обязательно для нефотохимического тушения NPQ [175]. При низком освещении происходит обратная реакция эпоксидации диадиноксантина в диатоксантин. Показано, что большая часть диадиноксантина и диатоксантина связаны с Фк белковыми комплексами. Установлено, что небольшое количество диадиноксантина Ddx связано с FCPs, находящимися вблизи PSI [177, 175]. Однако часть пигментов диадиноксантинового цикла не связана с апопротеинами антенны ФС и находятся в липидном слое вокруг FCPs.

Диадиноксантин и диатоксантин влияют на подвижность липидных алкильных цепей, тем самым изменяя физические свойства мембран. Высокая интенсивность света вызывает обратимое снижение текучести тилакоидных

мембран. Дезоксидированный диатоксантин смог значительно снизить мембранно-повреждающее действие АФК в тилакоидных мембранах диатомовых водорослей [175, 177]. Свободный диатиноксантин предотвращает перекисное окисление липидов во время окислительного стресса и стабилизирует тилакоид [179, 247], а также может служить резервуаром-предшественником для синтеза Фк. Диатиноксантин является конечным продуктом синтеза виолаксантинового цикла. Виолаксантин и диатиноксантиновый циклы взаимосвязаны и не могут функционировать отдельно [157, 175, 271, 277].

Двухступенчатый виолаксантин цикл заключается в прямой реакции, состоящей из двух этапов дезоксидации (рисунок 1.9). При этом виолаксантин (Vx) преобразуется в свободный зеаксантин (Zx). Промежуточный продукт этой реакции атероксантин (Ax), который содержит одну эпоксидную-группу [117, 151]. Превращение Vx в Ax и Zx происходит, когда водоросли облучаются высокой интенсивностью света. Низкие интенсивности света или темнота запускают обратные реакции виолаксантинового цикла, Zx превращается обратно в Vx. Последовательность реакций дезоксидации виолаксантинового цикла катализируется ферментом виолаксантин де-эпоксидазой (VDE), эпоксидирование Zx в Vx осуществляется с помощью фермента зеаксантина эпоксидазы [171].

Основная роль виолаксантинового цикла (VxC) – защищать фотосинтетический аппарат (РА) от излишка энергии возбуждения при высокой освещенности. В защите РА в основном участвуют зеаксантин и атероксантин, которые получают энергию от возбужденных молекул хлорофилла. Это приводит к тушению флуоресценции хлорофилла и к потере энергии возбуждения хлорофилла в виде тепла за счет нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ). Пигменты VxC способны не только к тушению возбужденного триплетного состояния хлорофилла, но и активных форм кислорода. Взаимодействие виолаксантина и зеаксантина с хлорофиллом показано на рисунке 1.9. Виолаксантин, зеаксантин и хлорофилл *a* энергетически связаны и VxC не только защищает от излишка энергии возбуждения, но и регулирует

распределение энергии между Vx и Zx и хлорофиллом *a* [123, 151, 171].

Измерения флуоресценции хлорофилла показали, что процесс дезоксидирования зеаксантина Zx в виолаксантин приводит к рассеиванию избыточной энергии на PS II в виде тепла, тем самым данный процесс предотвращает перевозбуждение реакционного центра PS II. Важная функция ксантофиллов виолаксантинового цикла – защита мембранных липидов от фотодиструкции. Ориентация оси зеаксантина в липидном биослое, ось расположена почти перпендикулярно к поверхности мембраны, способствует уменьшению текучести липидов, кристаллизации мембран и уменьшению мембранной проницаемости для малых молекул [171].

Таким образом, пигменты диадиноксантофилового цикла и дезоксидация виолаксантина Vx в зеаксантин Zx способствуют диссипации избыточной энергии возбуждения фотосистемы II (PS II), тем самым предотвращая перевозбуждение реакционного центра PS II [123, 151, 171]. Также пигменты виолаксантинового и диадиноксантинового циклов влияют на физико-химические свойства мембран и при повышении температуры увеличивают жесткость мембран и препятствуют перекисному окислению липидов. Установлено, что при резком изменении температуры диатоксантин регулирует проницаемость тилакоидной мембраны и ингибирует активные формы кислорода, защищая тилакоидную мембрану от разрушения [83]. Следовательно, наличие диадиноксантинового и виолаксантинового циклов и конечных продуктов синтеза данных циклов - фукоксантина и диадиноксантина, дает возможность *C. closterium* выживать на глубинах от 10 до 20 м при резких изменениях освещенности и температуры [170].

**Липиды и запасные вещества *C. closterium*.** Липиды в клетке участвуют в различных процессах адаптации к изменяющимся условиям среды обитания [282]. Интерес к липидам обусловлен их высоким потенциалом как сырья для медицины и пищевой промышленности. Липиды являются одной из основных составляющих клетки и в среднем могут достигать 25-28 % сухой биомассы.

Липиды диатомовых водорослей богаты ценными ПНЖК, включая

незаменимые для человека  $\alpha$ -линоленовую (18:3), арахидоновую (20:4), эйкозапентаеновую (20:5) кислоты [263]. Схема биосинтеза ПНЖК в диатомовых водорослях представлена на рисунке 1.10 [282]. Содержание насыщенных, мононенасыщенных и ПНЖК в *C. closterium* составляет соответственно 25-28 %; 30-32 % и 40-45 % от общего содержания жирных кислот (ЖК). Среди насыщенных ЖК преобладает пальмитиновая кислота (C16:0), её содержание достигает 15-20 % от общего количества ЖК. Основной мононенасыщенной ЖК является пальмитоолеиновая (16:1n-7), на долю которой приходится 25-30 % от общего содержания ЖК [186, 207, 263].

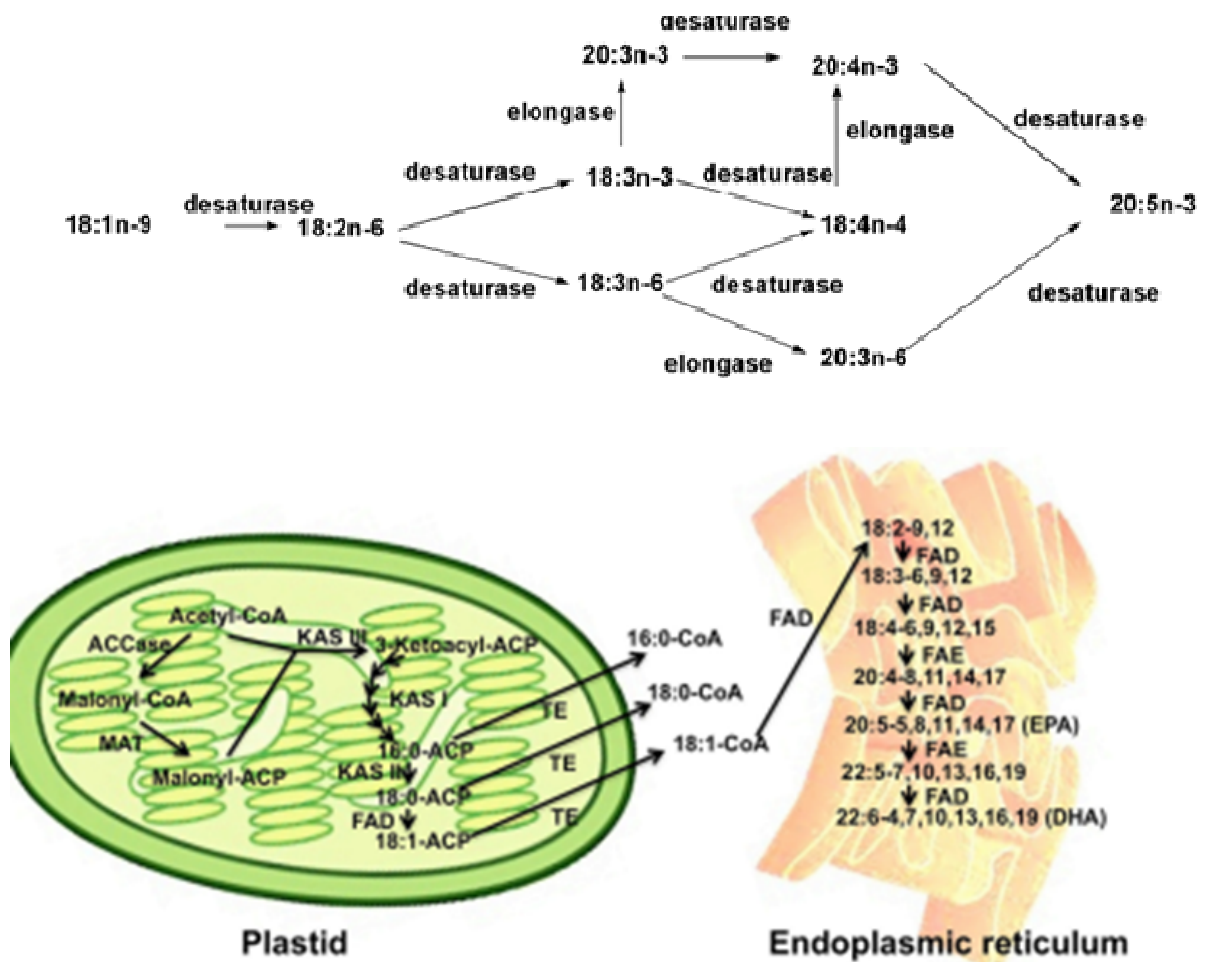


Рисунок 1.10 — Схема биосинтеза ПНЖК в диатомовых водорослях [282]

Доминирующими кислотами среди ПНЖК *C. closterium* являются эйкозапентаеновая и арахидоновая [263]. Концентрации этих кислот достигают до 25 % и 8 % общего содержания ПНЖК. В таблице 1.1 приведено содержание ПНЖК в *C. closterium*. Из таблицы видно, что водоросль является перспективным источником ЭПК и арахидоновой кислоты. Доминирование эйкозопентаеновой кислоты среди ПНЖК можно объяснить тем, что ЭПК является конечным продуктом биосинтеза всех жирных кислот.

Таблица 1.1 — Жирнокислотный состав диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* [263].

Липиды и жирные кислоты		Содержание, % от суммы ЖК
Насыщенные жирные кислоты	14:0	9,5 ± 0,06
	15:0	1 ± 0,03
	16:0	29,9 ± 0,33
	17:0	0,87 ± 0,08
	18:0	5,32 ± 0,15
Мононенасыщенные жирные кислоты	16:1(n-7)	12,58 ± 0,48
	16:1(n-5)	2,1 ± 0,12
Полиненасыщенные жирные кислоты	16:3(n-4)	8,39 ± 0,38
	18:2(n-6)	3,27 ± 0,17
	18:3(n-6)	1,1 ± 0,14
	20:4(n-6)	8,08 ± 0,38
	20:5(n-3)	24 ± 0,33

Арахидоновая и эйкозопентаеновые кислоты в организме человека являются предшественниками простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов [238]. Данные вещества играют важную роль в воспалительных и иммунологических процессах, находят все более широкое применение при лечении и профилактике целого ряда сердечно-сосудистых заболеваний [93, 94].

К липидной фракции также относят стеролы [250]. У *C. closterium*

обнаружены холестерол (cholesta-5-en-3 $\beta$ -ol) и дегидрохолестерол (cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol), преобладают 24-метиленхолестерин или другие диметилстеролы, также обнаружен  $\beta$ -ситостерол.

**Макро- и микроэлементы диатомовой водоросли *C. closterium*.** Диатомовые бентосные водоросли способны аккумулировать макро- и микроэлементы и выживать при их высоких концентрациях в среде [121, 218]. Так, переизбыток железа может привести к процессам генерирования гидроксильных радикалов, которые могут повреждать липиды, белки и ДНК [234]. Из-за потенциальной токсичности железа диатомовые водоросли приобрели механизмы защиты, аккумулируя железо в клетках и при этом трансформируя неорганическое железо в органическую форму [197].

Известно, что диатомовые микроводоросли способны поглощать и аккумулировать йод из среды обитания, частично преобразуя его в органическую форму [100, 150]. По содержанию йода диатомовые водоросли значительно превосходят наземные растения и макроводоросли, являются природным источником йода растительного происхождения [69]. *C. closterium* поглощает две формы неорганического йода: в форме йодата (IO<sub>3</sub><sup>-</sup>) и йодида (I<sup>-</sup>), но в большей степени – йодид [80, 100]. В *C. closterium* содержатся также важные микро- и макроэлементы, помогающие организму человека усвоить йод [63]. Большая часть йода в диатомовых представлена в органической форме – в составе белков и ферментов, таких, как йод-тирозин и йод-тироксин, – основных элементов щитовидной железы [95, 150]. *C. closterium* способна накапливать йод и железо, как в органической, так и в неорганической форме в достаточно больших концентрациях [100].

Состав макро- и микроэлементов микроводорослей сильно зависит от питательной среды, а также может изменяться в зависимости от условий культивирования и от фазы роста. Общий состав элементов *C. closterium* в начале стационарной фазы роста, культивируемой на питательной среде Конвея, представлен в таблице 1.2 [251].

Таблица 1.2 — Состав макро и микроэлементов диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*, выращенной на питательной среде Конвея [251].

Макроэлементы	Концентрация, г·кг <sup>-1</sup> <sub>сух</sub>
Кальций	8,18±0,04
Фосфор	3,19±0,01
Калий	13,42±0,10
Натрий	220,64±8,30
Магний	27,72±1,28
Микроэлементы	Концентрация, мг·кг <sup>-1</sup>
Железо	155,66±12,68
Цинк	16,65±3,57
Медь	7,98±0,04
Марганец	53±0,60
Бор	458,18±11,23
Алюминий	175,01±0,05
Барий	1,33±0,18
Никель	0,76±0,14
Мышьяк	2,59±0,18
Стронций	137,44±0,28

Биомассу *C. closterium* можно использовать в качестве пищевого продукта для профилактики и лечения заболеваний, связанных с недостатком йода и железа в организме человека.

**Аминокислоты и экзополисахариды диатомовой водоросли *C. closterium*.** Известно, что *C. closterium* используют в основном в аквакультуре в качестве кормовой добавки гидробионтам, так как данная водоросль содержит не только 25 %

липидов, но и 38-40 % белка. Пищевая ценность белков микроводорослей считается высокой, если в их состав входит 10 аминокислот: треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, лизин, гистидин, аргинин и триптофан, которые необходимы для нормального роста и развития моллюсков [87]. В диатомовой водоросли *Nitzschia closterium* присутствуют все данные аминокислоты. При этом лейцин, аргинин, лизин достигают 7-8 % общего содержания аминокислот. Она содержит высокие концентрации аспартата и глутамата (11,9 и 12,9 % сухой массы) и достаточно низкие концентрации цистина, метионина, триптофана, гистидина (0,6; 2,2; 4,1; 2,6 %). Количество других аминокислот изменялось от 3,9 до 10,1 % в зависимости от фазы роста.

*C. closterium* может образовывать слизистые агрегатные структуры при воздействии стрессовых факторов: при высокой солености [212], низких концентрациях азота или фосфора в питательной среде за счет выделения внеклеточных полисахаридных веществ (ЭПС) [258], которые представляют собой фотосинтетические фиксированные углеводы [59, 82]. Схема синтеза углеводов в диатомовых водорослях приведена на рисунке 1.11.

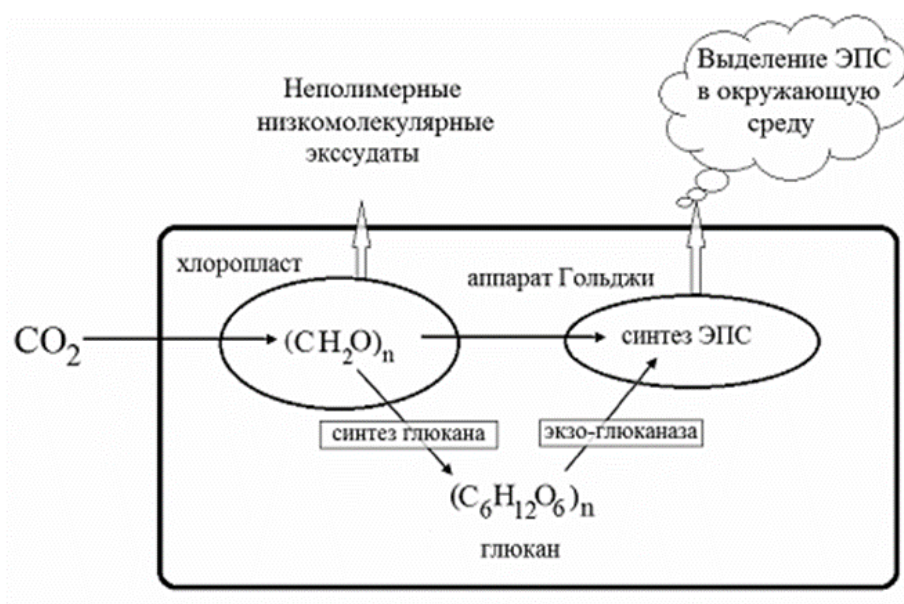


Рисунок 1.11 — Схема синтеза углеводов в диатомовых водорослях [59]

ЭПС образуются в результате фотосинтетической фиксации неорганического углерода и выступают как стимуляторы защитных реакций организма. Кроме углеводов, ЭПС содержат белки и сульфатогруппы. В состав углеводов ЭПС в основном входят лабильные сахара с низкой молекулярной массой и полимерная глюкоза. Экзополисахариды можно разделить на два класса: ЭПС, связанные с клеточной стенкой, и ЭПС, которые отделились от поверхности клетки и попали в питательную среду [59, 82, 269].

Экзополисахариды, связанные с клеточной стенкой, содержат 60 % углеводов, 7,7 % белка, 21 % уроновых кислот и 10,9 % сульфатогрупп [59, 82]. ЭПС, которые отделились от поверхности клетки, и попали в среду, имеют следующий состав: 86 % углеводов, 9 % белка, 4,8 % уроновых кислот, не содержат сульфогруппы. ЭПС обеспечивают связывание ионов тяжелых металлов, иммобилизацию токсических веществ и препятствуют высыханию клеток, благодаря наличию обводненных полимерных цепей, тем самым защищая от неблагоприятных условий внешней среды.

Общее содержание углеводов в *C. closterium* может достигать 9,8 % сухой массы. Полисахариды - основные углеводы всех диатомовых водорослей. Их часто делятся на три группы: 1) полисахариды, входящие в состав клеточной стенки, 2) резервные внутриклеточные полисахариды -  $\beta$ -1,3-глюкан и 3) внеклеточные полисахариды (ЭПС) [133].

Клеточная стенка состоит в основном из кислых полисахаридов, часто в форме сульфатированных глюкоманнанов [128, 133]. Бета-1,3-глюкан является основным внутриклеточным полисахаридом, который поставляет углеродные скелеты для синтеза аминокислот и белка. Это растворимое в воде соединение, иногда ветвящееся через C-2 и C-6 (рисунок 1.12). Данный углевод может накапливаться в клетках *C. closterium* в качестве запасного источника энергии и локализован в вакуолях. Бета-1,3-глюкан синтезируется в процессе фотосинтеза, в частности, во время ограничения питательных веществ в среде. Расход данного основного внутриклеточного углевода происходит в темноте.

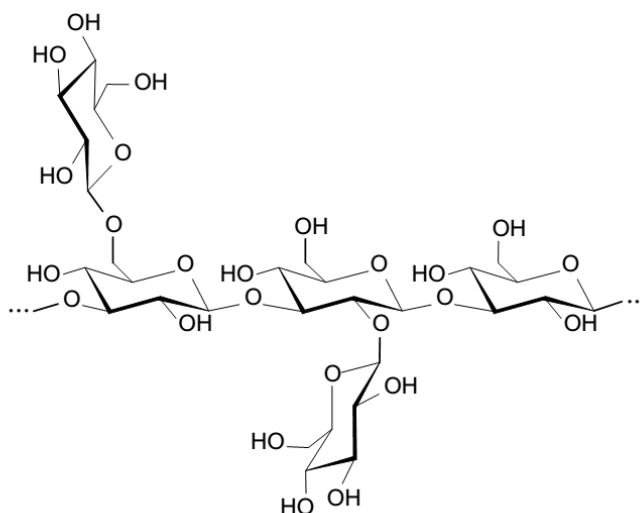


Рисунок 1.12 — Химическая структура  $\beta$ -1,3-глюкана [128]

**Изменения в пигментном и липидном составе *C. closterium* при различных условиях культивирования.** Диатомовая водоросль имеет пластичный метаболизм и, управляя условиями культивирования, можно получить биомассу с высоким содержанием липидов, ПНЖК и ФК [159]. На данный момент одной из проблем является определение и регулирование условий культивирования *C. closterium*, необходимых для эффективного управляемого биосинтеза ПНЖК и каротиноидов, в частности фукоксантина.

Количественный и качественный состав каротиноидов и липидов диатомовых водорослей зависит от фазы роста культуры и факторов внешней среды: газового и температурного режимов, содержания биогенных элементов в питательной среде и освещенности [62, 76, 97, 122]. Известно, что содержание липидов и ФК в водорослях увеличиваются при переходе культуры в стационарную фазу роста и достигают своих максимальных значений в конце стационарной фазы [260, 261].

Процесс увеличения концентрации ФК в диатомеях обуславливается двумя причинами: снижением концентрации биогенных элементов в среде и уменьшением освещенности на единицу поверхности культуры в процессе

увеличения концентрации клеток, что приводит к увеличению концентрации светособирающих пигментов [172, 193]. На процесс увеличения содержания липидов при переходе в стационарную фазу роста водорослей влияет, в основном, лимитирование основных биогенных элементов. Известно, что при недостатке фосфора в среде в водорослях увеличивается содержания триацилглицеридов (ТАГ). Данный факт обусловлен защитной реакцией организма, так как фосфор входит в состав всех фосфолипидов, а также в состав нуклеиновых кислот и играет ключевую роль в фотосинтезе и дыхании. Именно ТАГ могут использоваться водорослями не только как источник энергии, но и как субстрат для дальнейшего синтеза фосфолипидов и нуклеиновых кислот.

На синтез Фк в клетках диатомовых водорослей большое влияние оказывает азот в питательной среде. Азот входит в состав всех ферментов, участвующих в биосинтезе Фк и определяет весь процесс биосинтеза каротиноидов. Высокое содержание азота в среде повышает скорость роста водорослей и способствует накоплению Фк и каротиноидов [181]. При недостатке азота в среде для роста и развития микроводорослей содержание Фк и концентрация фотосинтетических пигментов в клетках уменьшается, что происходит за счет подавления белкового синтеза и перераспределения азота между клеточными компонентами. При этом изменяется соотношение белков, входящих в состав компонентов фотосинтетического аппарата [111, 167]. Азот, освобождающийся при деградации пигмент-белковых комплексов, используется для клеточного деления.

Многие авторы отмечают, что при клеточном дефиците азота снижается интенсивность и эффективность световых реакций фотосинтеза [183, 187, 254]. Однако инактивация и деградация фотосинтетического аппарата при дефиците минерального азота являются обратимыми. Такая инактивация рассматривается в качестве адаптивной реакции.

Одним из основных факторов, влияющих на пигменты водорослей, является освещённость. Изменение количественного состава пигментов связано с поддержанием потока энергии в клетку на определенном уровне. С одной стороны,

свет определяет рост водорослей и интенсивность фотосинтеза в клетках, а с другой, свет высокой интенсивности может вызывать фотоокислительный стресс, окислять ПНЖК, приводить к деструкции пигментов и гибели клеток [122, 208, 252]. При высокой интенсивности света отмечено низкое содержание Фк и ПНЖК в клетках. При этом работа ксантофилловых циклов направлена на дезактивацию возбуждённых состояний молекул хлорофилла и на предотвращение образования синглетного кислорода [106, 107].

При низкой интенсивности света отмечено повышение концентрации Фк в клетках водорослей за счет необходимости эффективного сбора фотонов для процесса переноса электронов в фотосинтетической цепи и ассимиляции  $\text{CO}_2$ . При этом работа ксантофилловых циклов переключается на синтез Фк. Низкие уровни освещённости способствуют накоплению ПНЖК и ЭПК в диатомеях [127, 137]. Поэтому известен способ увеличения Фк в биомассе *C. closterium*, в котором культуру выращивали в накопительном режиме на питательной среде F/2 в трубчатых фотобиореакторах при низкой освещённости ( $27 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Максимальное значение концентрации Фк в биомассе при данных условиях зарегистрировано в стационарной фазе роста и составило  $5,34 \pm 0,06 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}_{\text{сух}}$  [221].

Установлено, что Фк поглощает большую часть света в синей области спектра, который преобладает в более глубоких слоях воды. Известен способ увеличения Фк, при котором *C. closterium* выращивают в накопительном режиме на питательной среде F в трубчатых фотобиореакторах с использованием синих светодиодов [274]. Культуру освещали светом интенсивностью  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  в режиме 18/6 часов свет/темнота. Максимальное содержание Фк при данных условиях зафиксировано в стационарной фазе роста и составило  $26 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ . При этом максимальный выход биомассы составил  $350 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ .

Ультрафиолетовая радиация и резкие изменения солёности стимулируют внутриклеточный синтез кислорода в диатомовых, вызывая синтез Фк в клетках. Температура также является ключевым фактором при накоплении Фк, липидов и ПНЖК. Показано, что снижение температуры способствует накоплению ПНЖК в

микроводорослях [154, 236, 241]. Это связано с необходимостью поддерживать текучесть мембран при низких температурах [139]. Поскольку текучесть уменьшается при более низких температурах, а доля ненасыщенных ЖК, которые обеспечивает адаптацию к изменяющейся среде, повышается, то мембраны продолжают нормально функционировать. Общая тенденция к увеличению ненасыщенности ЖК с понижением температуры и насыщенности ЖК с повышением температуры наблюдается у многих микроводорослей и цианобактерий [206, 264]. Накоплению Фк в диатомовых способствуют оптимальные температуры для роста и развития микроводорослей.

Таким образом, в литературе описаны основные способы увеличения Фк и ПНЖК в накопительном режиме культивирования микроводорослей. В данных условиях при достижении стационарной фазы роста производят полный сбор биомассы, что не дает возможность обеспечить непрерывный процесс получения урожая с высоким выходом Фк и ПНЖК и биотехнологически нецелесообразно.

Известно, что микроводоросли накапливают многие ценные вещества именно в стрессовых условиях, например, при лимитировании роста биогенными элементами. Для этой цели разработаны различные способы двухстадийного накопительного культивирования микроводорослей, когда на первом этапе происходит накопление биомассы, а на втором – накопление ценных веществ, например, каротиноидов [206]. Существенным недостатком двухстадийного накопительного культивирования является гибель значительной части клеток микроводорослей на втором этапе при создании стрессовых условий, что снижает эффективность процесса получения целевых продуктов.

В настоящее время опубликованы в основном данные по накопительному режиму культивирования *C. closterium* на обеднённых питательных средах, которые не дают возможность получить плотную культуру и понять физиологические механизмы биосинтеза Фк и ПНЖК в условиях изменения температуры, облученности, спектрального состава света при накопительном режиме культивирования [202, 263]. Так, ряд исследователей культивировали

данную водоросль на питательных средах F/2 и F, приготовленных на основе морской воды, в накопительном режиме при температуре от 15 до 25-27 °С [164, 250, 263, 273, 274]. При культивировании *C. closterium* на питательной среде F/2 максимальный выход биомассы достигал от  $(1,46 \pm 0,02) \cdot 10^6$  до  $(2,94 \pm 0,02) \cdot 10^6$  клеток на 1 мл, что в пересчете на сухую массу составляет 0,2 и 0,3 г сухой массы.

При культивировании на среде F/2 и F, приготовленной на основе морской воды при температуре 22 °С, получили максимальный выход сухой биомассы 291 мг·л<sup>-1</sup> и 350 мг·л<sup>-1</sup>. При выращивании водоросли в накопительном режиме при температуре от 15 до 25-27 °С, получили максимальную численность при культивировании на среде F/2  $(4 \pm 0,02) \cdot 10^4$  клеток на 1 мл и на среде F –  $(5,69 \pm 0,02) \cdot 10^4$  клеток на 1 мл [62]. Выход биомассы на обеднённых средах F и F/2 составил меньше 1 грамма на литр. Данный факт обусловлен нехваткой основных биогенных элементов, которые необходимы для нормального роста и развития микроводоросли. Это обстоятельство препятствует разработке новых технологий, направленных на получение ПНЖК и Фк в промышленных масштабах.

Поэтому актуальной задачей остаётся получение интенсивной культуры микроводоросли, проведение комплекса исследований её биохимических и продукционных характеристик в интенсивной накопительной и проточной культурах с различными скоростями протока с целью подбора оптимальных условий для получения максимального выхода биомассы, а также Фк и ПНЖК, используя проточную культуру, в частности двухступенчатый хемостат.

Также необходимо понять, как влияют различные факторы среды на предельные скорости накопления Фк и ПНЖК. Во всех рассмотренных способах культивирования *C. closterium* с целью накопления Фк и ПНЖК культуру выращивают в трубчатых фотобиореакторах. Данный культиватор характеризуется большим рабочим слоем, т.е. на единицу объёма культуры приходится достаточно низкая освещенность, что значительно снижает продуктивность культуры и увеличивает время достижения стационарной фазы роста. Данные системы культивирования являются системами закрытого типа и требуют дополнительной

подачи углерода. Любой трубчатый фотобиореактор требует значительных затрат энергии для перемешивания культуры, которые из-за проявления эффекта масштабирования возрастают непропорционально объёму суспензии.

*C. closterium* при слабом барботаже оседает на дно культиватора, поэтому при её выращивании в биореакторах вертикального типа необходимо затратить большое количество энергии на перемешивание культуры. Поэтому актуальной задачей также является подбор оптимального культиватора для *C. closterium*, который не требует больших затрат энергии на перемешивание водоросли и не требует дополнительного дорогостоящего оборудования. Для промышленных масштабов наиболее перспективной альтернативой двухстадийному методу накопительной культуры является проточная культура микроводорослей, в частности двухступенчатый хемостат с различной удельной скоростью протока для каждой ступени. Организация такого процесса культивирования позволяет управлять степенью стрессирования клеток, что дает возможность повысить продуктивность культуры на первом этапе и снизить гибель клеток на втором. Кроме того, в отличие от накопительного культивирования, важным отличием проточной культуры является непрерывность процесса получения урожая.

Таким образом, в литературе отсутствуют данные по культивированию *C. closterium* в проточной культуре, а также в двухступенчатом хемостате с различной удельной скоростью протока. Отсутствуют исследования по выявлению влияния различных факторов среды на физиологические механизмы, определяющие предельные скорости накопления ПНЖК и Фк в проточной культуре и, в частности, в двухступенчатом хемостате. Проведение исследований в этом направлении необходимы для оптимизации условий выращивания диатомовой водоросли *C. closterium* с целью повышения её продуктивности и увеличения биомассы культуры, а также скорости накопления полиненасыщенных жирных кислот и фукоксантина.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Объект исследования

Объект исследования – морская диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et J.C. Lewin 1964 из коллекции культур микроводорослей Отдела экологической физиологии водорослей ИнБИОМ РАН.

### 2.2 Методы и условия выращивания *C. closterium*

Альгологически чистую культуру *C. closterium* выращивали на стерильной питательной среде F/2 [135] при температуре 19-20 °С. Основой для питательной среды служила предварительно фильтрованная и стерилизованная вода из открытой части моря [20]. Среду F/2 готовили с добавлением растворов основных минеральных солей, макро- и микроэлементов, а также витаминов: биотина (В<sub>7</sub>), тиамина (В<sub>1</sub>) и кобаламина (В<sub>12</sub>) (таблица 2.1).

Культуру поддерживали в экспоненциальной фазе роста, периодически разбавляя свежеприготовленной питательной средой F/2. Культуру круглосуточно освещали люминесцентными лампами дневного света СС РЛ 1 LF 36W/54-765 2450 lm. Освещённость составляла 0,3-0,5 клк. Культуру адаптировали для интенсивного культивирования путем постепенного пропорционального увеличения концентраций биогенных элементов в среде F на люминостате при постоянной температуре 15–18 °С и круглосуточном освещении 13,5 клк [14]. Культуру, адаптированную к концентрированным питательным средам, использовали в качестве инокулята для экспериментальных работ. Во всех экспериментах с интенсивной культурой использовали разработанную нами питательную среду RS [42].

Таблица 2.1 — Состав питательной среды F/2 [135] для экстенсивного культивирования диатомовой водоросли *C. closterium*.

Компонент	Навеска, г·л <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O	0,03
NaNO <sub>3</sub>	0,075
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,005
Na <sub>2</sub> EDTA	0,00437
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,00315
NaMoO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,63·10 <sup>-5</sup>
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	1·10 <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	2,2·10 <sup>-5</sup>
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	1·10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	1,8·10 <sup>-5</sup>

Все лабораторные эксперименты проводили в биореакторах плоскопараллельного типа с рабочей толщиной слоя суспензии 5 см и объёмом 2 л в условиях круглосуточного освещения (рисунок 2.1). Система освещения представляла собой световую решетку, состоящую из 10 люминесцентных ламп дневного света СС PIL 1 LF 36W/54-765 2450 lm. Интенсивность света в разных точках на рабочей поверхности биореактора варьировала от 11,5 до 14 клк и в среднем составляла 13,5 клк.

Равномерное перемешивание суспензии в биореакторе осуществляли посредством барботирования воздуха с помощью компрессорной установки SERA air 550 R plus (0,5 л воздуха в мин. на 1 л культуры). Эксперименты проводили при оптимальных для *C. closterium* значениях pH = 8–9 [224]. Культуру водоросли выращивали, используя методы накопительного и квазинепрерывного культивирования [53]. Освещённость на поверхности культуры регистрировали при помощи Люксметра Ю-116, pH среды – цифрового автоматического pH-

контроллера Aqua Medic pH 2001. Для компенсации испарения ежедневно рабочий объем культуры доводили до метки дистиллированной водой, суспензию тщательно перемешивали и отбирали несколько проб объёмом 10 мл.



Рисунок 2.1 — Лабораторная установка для интенсивного культивирования диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*

**Измерение плотности культуры.** Для определения плотности водоросли в экстенсивной культуре использовали метод подсчёта клеток, а также косвенный метод определения биомассы по оптической плотности. Для измерения плотности *C. closterium* в интенсивной культуре использовали методы прямого взвешивания биомассы, а также мокрого сжигания. Метод прямого взвешивания биомассы водоросли использовали только в стационарной фазе роста. Данный метод не применим для экспоненциальной фазы роста, так как соли кремниевой кислоты в питательной среде образуют оптически активный гидрозоль, который при центрифугировании оседает на дно пробирки вместе с биомассой.

**Подсчёт числа клеток в камере Горяева.** Аккуратно притирали покровное стекло к камере, слегка надавливая на него до появления цветных колец Ньютона. Заполняли камеру суспензией микроводорослей, разведённой изотоническим раствором NaCl и выдерживали 1 мин для прекращения движения клеток.

Число клеток в  $1 \text{ см}^3$  суспензии рассчитывали по формуле:

$$X = m \cdot 10^4,$$

где  $X$  – число клеток в  $1 \text{ см}^3$ ,  $m$  – общая сумма клеток в 25 больших квадратах.

**Измерение оптической плотности культуры.** В качестве экспресс-метода оценки плотности экстенсивной культуры использовали связь между оптической плотностью культуры при 750 нм и концентрацией клеток в суспензии. Оптическую плотность измеряли в фотоколориметре КФК-3 с пределом допускаемого значения основной абсолютной погрешности фотометра при измерении коэффициента пропускания не более 0,5 %. Для уменьшения ошибок, связанных с рассеянием света, кювету устанавливали в максимальной близости к фотоприемнику. По результатам параллельных измерений определён коэффициент перехода от оптической плотности к концентрации клеток в суспензии, равный 3,4 (рисунок 2.2).

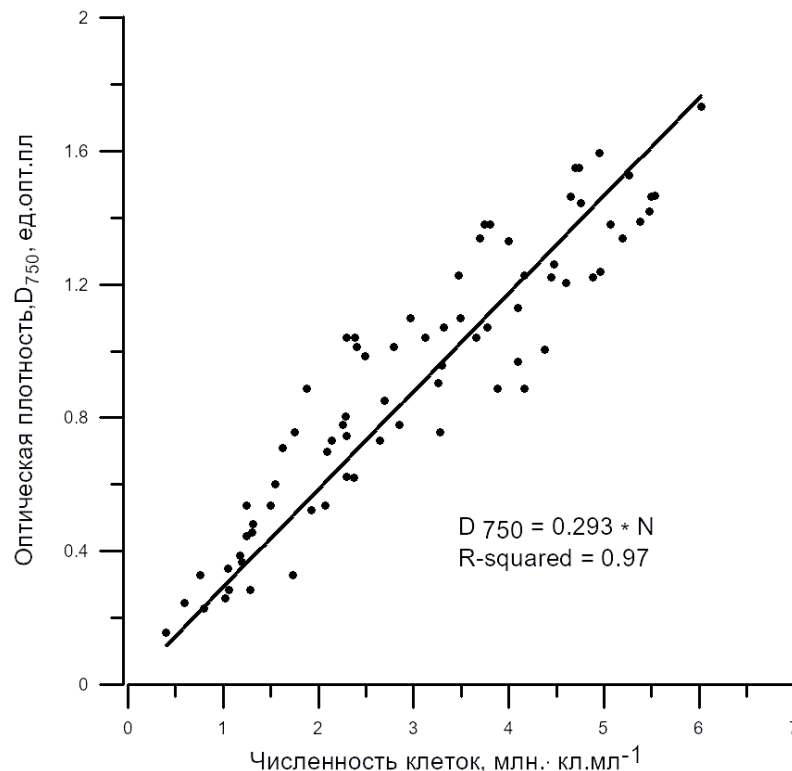


Рисунок 2.2 — Зависимость концентрации клеток *Cylandrotheca closterium* в суспензии от оптической плотности на длине волны 750 нм

**Метод прямого взвешивания биомассы.** В интенсивной культуре плотность определяли взвешиванием сырой массы водорослей после осаждения клеток центрифугированием. Для определения плотности культуры десять сухих полипропиленовых пробирок предварительно взвешивали с точностью до 0,1 мг. Затем из биореактора отбирали суспензию водорослей объемом 10 мл в каждую пробирку и центрифугировали 2 мин на центрифуге ОПН-3 при 3000 об·мин<sup>-1</sup> (1600 g). После осаждения клеток удаляли надосадочную жидкость, а также с помощью фильтровальной бумаги оставшиеся капли влаги на стенках пробирок.

Пробирки с биомассой взвешивали на аналитических весах САУУ-120 с погрешностью 0,0001 г. Учитывая объем аликвоты и долю воды в сырой массе, по разнице веса пробирок с биомассой и без биомассы рассчитывали плотность культуры:

$$B = (m_{\text{пробы}} - m_{\text{пробирки}}) \cdot (1 - k) \cdot 1000 / v ,$$

где  $B$  – плотность культуры в суспензии, г·л<sup>-1</sup>;  $m_{\text{пробы}}$  – масса пробирки с сырой биомассой, г;  $m_{\text{пробирки}}$  – масса пустой пробирки, г;  $k$  – доля воды в сырой массе водорослей,  $k=0,9$ ;  $v$  – объем аликвоты суспензии, отбираемой из биореактора, мл. Средняя квадратичная ошибка метода прямого взвешивания биомассы составляет 1,29 для сырой биомассы и 0,13 – для сухой. Коэффициент вариации – 3,99 %.

Долю воды в биомассе определяли путем высушивания проб при температуре 105 °С в течение 24 часов. Для исключения влияния солей культуральной среды пробы предварительно промывали изотоническим раствором углекислого аммония (20 г·л<sup>-1</sup>). Для определения доли воды в пробе использовали формулу:

$$k = 1 - m_{\text{сухая}} / m_{\text{сырая}},$$

где  $m_{\text{сухая}}$  – сухая масса пробы, г;  $m_{\text{сырая}}$  – сырая масса пробы, г. Среднее значение коэффициента перехода между сухой и сырой биомассой – 0,11, среднее квадратичное отклонение – 0,013, коэффициент вариации – 11,96 %.

Среднее значение рассчитывали, используя десять параллельных измерений [26].

**Мокрое сжигание биомассы методом йодатной окисляемости.** Для получения плотной культуры (более  $0,5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ) использовали концентрированную среду RS [42]. Соли кремниевой кислоты в присутствии фосфатов, солей кальция и магния образуют оптически активный коллоидный раствор гидрозоля, который тяжелее воды и оседает на дно, что делает невозможным использование оптических и гравиметрических методов для оценки плотности культуры. Также необходимо подчеркнуть, что в плотных культурах на концентрированных питательных средах наблюдается агглютинация клеток, поэтому вести подсчёт клеток в камере Горяева не возможно.

Для оценки плотности культуры в среде RS использовали метод йодатной окисляемости [6]. Для этого навеску 5-30 мг сырой массы водоросли промывали 5 мл дистиллированной воды, затем добавляли 0,05 г йодата калия и 1 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . После перемешивания смесь выдерживали при температуре  $195 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 10 - 15 мин до полного растворения навески. Смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли 10 мл дистиллированной воды. Из полученной смеси йод экстрагировали 5 мл хлороформа.

Концентрацию йода определяли спектрофотометрически на длине волны 510 нм (кювета 1 см) (рисунки 2.3 и 2.4). Если оптическая плотность превышала 0,8 ед. опт. пл., то раствор разбавляли хлороформом, либо разбавляли культуру стерильной морской водой. Для построения калибровочной кривой зависимости оптической плотности от концентрации йода в хлороформе использовали кристаллы йода, полученные возгонкой. По массе выделявшегося йода определяли массу микроводорослей (рисунок 2.5).

После мокрого сжигания биомасса водоросли полностью растворялась. Раствор серной кислоты становился прозрачным со светло-жёлтым оттенком. При последующем добавлении воды для полной экстракции йода достаточно 5 мл хлороформа. При повторной экстракции хлороформ практически не окрашивался.

Экспериментально установлены границы рабочего диапазона для сжигания сырой массы: от 5 до 30 мг.

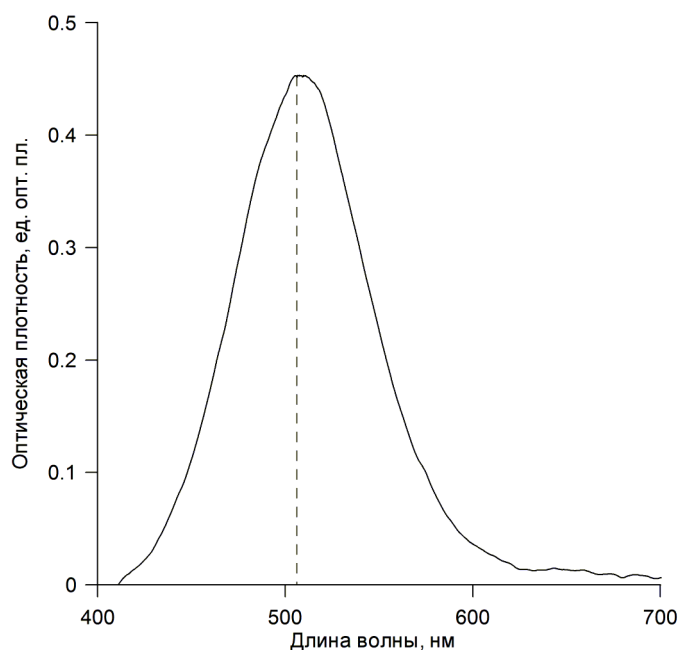


Рисунок 2.3 — Спектр поглощения раствора йода в хлороформе

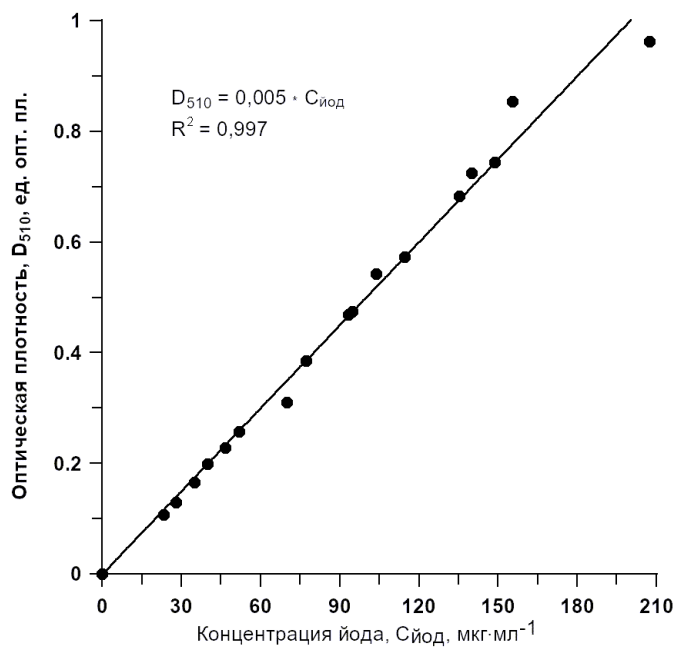


Рисунок 2.4 — Калибровочная кривая зависимости оптической плотности на длине волны 510 нм от концентрации йода в хлороформе

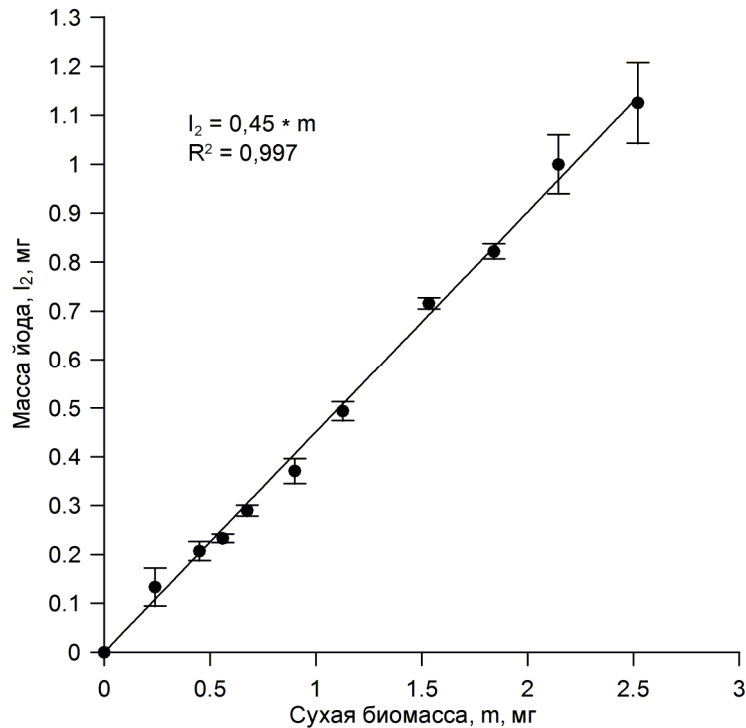


Рисунок 2.5 — Зависимость количества выделившегося йода от сухой массы навески *Cylindrotheca closterium*

При сжигании навесок менее 5 мг опт. плотность для кюветы в 1 см составляла 0,07 единиц или меньше, а при сжигании навески более 30 мг наблюдали выделение йода в виде паров. Время полного окисления навески без потерь йода не превышало 25-30 мин. Если по истечении 25 мин проба оставалась интенсивно окрашенной, или оптическая плотность раствора йода в хлороформе превышала 1,2 ед., то это свидетельствовало о потерях йода во время сжигания пробы. В таком случае необходимо уменьшить навеску водоросли либо увеличить объём серной кислоты до 2 мл и массу йодноватокислого калия до 0,1 г.

Плотность культуры определяли в начале стационарной фазы роста параллельно двумя методами: методом йодатной окисляемости и прямого взвешивания сырой массы водоросли. При мокром сжигании проб зависимость массы выделяющегося йода прямо пропорциональна массе водорослей (рисунок

2.5). При оценке плотности культуры методом йодатного окисления также экспериментально установлена линейная зависимость оптической плотности раствора йода в хлороформе после мокрого сжигания биомассы от плотности культуры (рисунок 2.6).

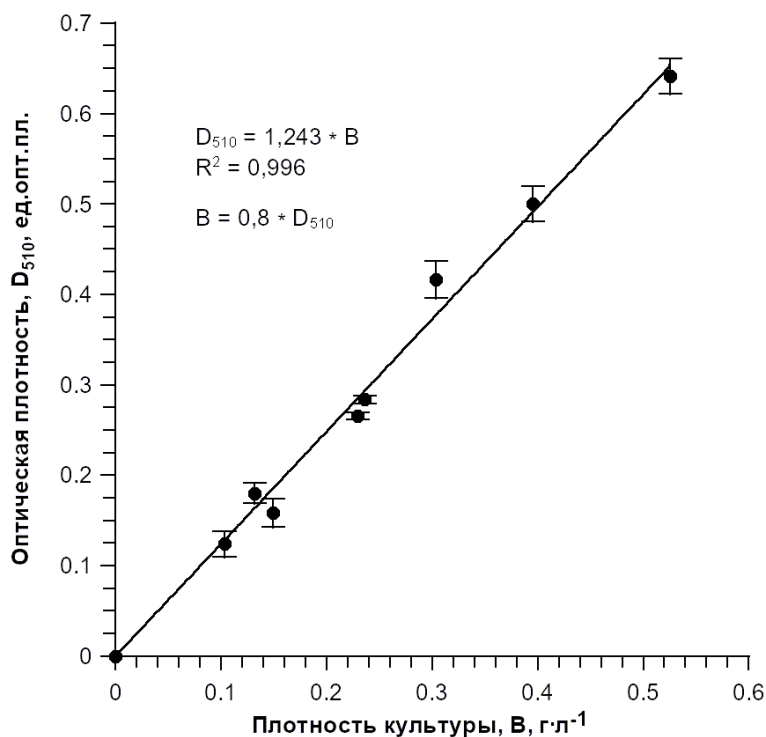


Рисунок 2.6 — Зависимость оптической плотности раствора йода в хлороформе на длине волны 510 нм от плотности культуры *Cylindrotheca closterium* при мокром сжигании биомассы

Зольный остаток во всех стадиях накопительного роста культуры *C. closterium* составлял  $32,5 \pm 0,5\%$  сухой массы. Для нахождения связи оптической плотности при длине волны 750 нм и плотности культуры использовали условные средние измерения, поскольку среднее значение характеризуется меньшей дисперсией. В качестве тестовой выборки использовали 36 параллельных измерений плотности культуры в биореакторе прямым методом взвешивания биомассы и методом йодатной окисляемости (рисунок 2.7).

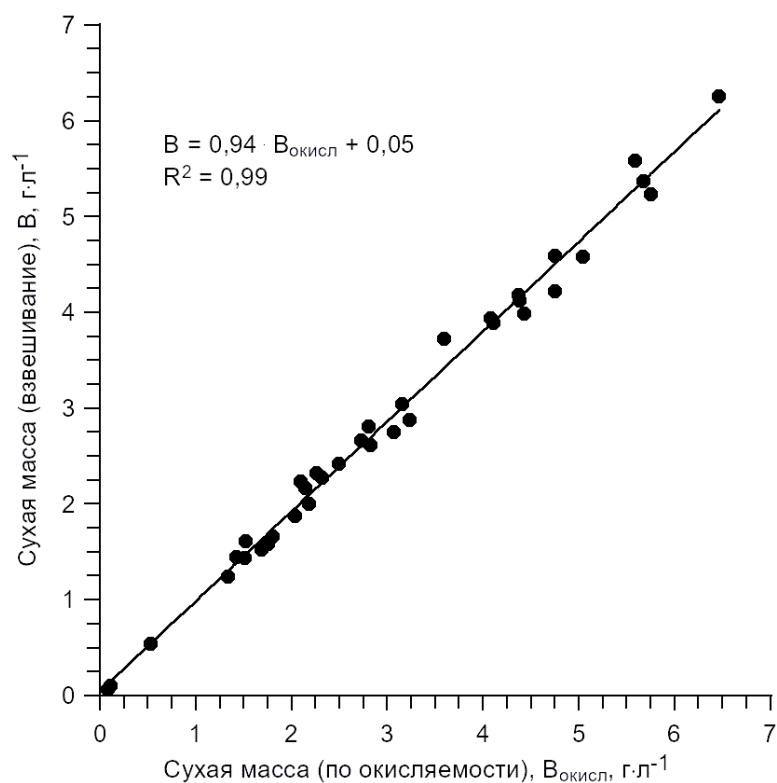


Рисунок 2.7 — Выборка измерений плотности культуры *Cylandrotheca closterium* прямым взвешиванием биомассы и методом йодатной окисляемости органического вещества

## 2.3 Количественное определение биохимического состава *C. closterium*

### 2.3.1 Белок

Массовую долю белка в биомассе водорослей определяли по методу Лоури в модификации [8] с использованием человеческого альбумина в качестве стандарта для построения калибровочного графика. Для определения доли белка отбирали аликвоту объемом 1-2 мл, при этом навеска сырой биомассы не превышала 0,1 г. При необходимости суспензию разбавляли морской водой. До определения белка сырую массу водорослей промывали 1-2 раза 5 мл дистиллированной воды. Щелочной гидролиз биомассы проводили в 1 N щелочи

в течение 10 мин. Для построения калибровочной кривой в качестве стандарта использовали маточные растворы человеческого сывороточного альбумина фирмы Merck после полного растворения биомассы в щёлочи (рисунок 2.8).

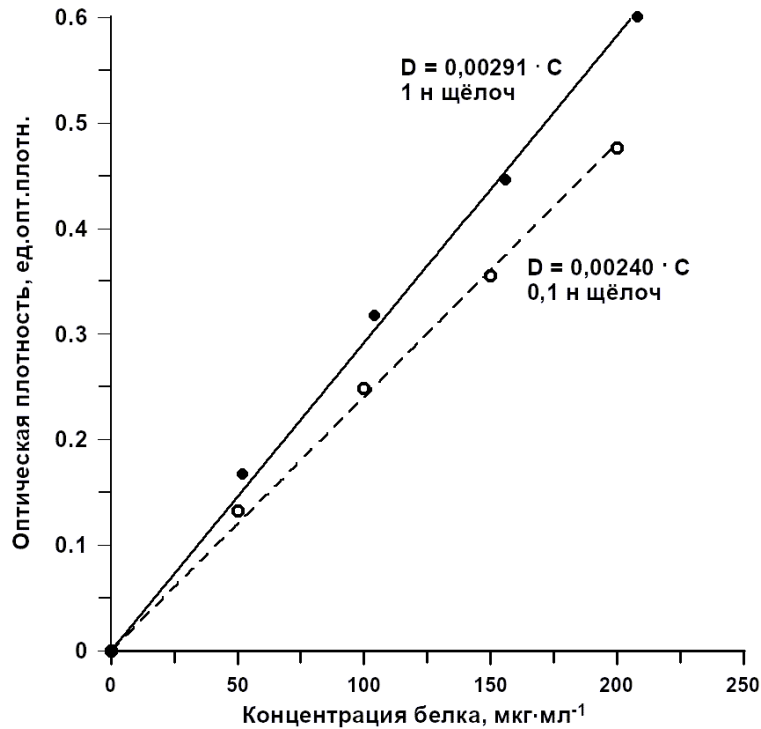


Рисунок 2.8 — Калибровочные графики для определения белка в пробе при использовании 1 Н и 0,1 Н раствора щёлочи

Анализируя калибровочную кривую, коэффициент ( $K$ ), равный тангенсу угла наклона кривой к оси абсцисс, для 1 Н и 0,1 Н раствора щёлочи равен 0,029 и 0,024. Произведение  $\Delta D \times 1/K$  на основании калибровочной кривой позволяет определить концентрацию белка в рабочем растворе, мкг·мл<sup>-1</sup>; при этом надо отметить, что для 1 Н раствора щёлочи отношение  $1/K_{1Н} = 344$ , а для 0,1 Н раствора щёлочи отношение  $1/K_{0,1Н} = 417$ .

После окончания щелочного гидролиза пробы центрифугировали 1–2 мин при 3000 об·мин<sup>-1</sup>. После центрифугирования из гидролизата брали аликвоту объёмом 0,2 мл и вносили в пробирку для проведения реакции на белок. Затем

добавляли 0,8 мл дистиллированной воды и, таким образом, суммарный объём аликвоты становился равным 1 мл. Далее приливали 3 мл раствора реактива, полученного смешиванием 2 % карбоната натрия в 0,1 н гидроксиде натрия (50 мл) и 0,5 % медного купороса в 1 % тартрате натрия или калия (1 мл). Раствор перемешивали и после 10 мин экспозиции при комнатной температуре в него добавляли 0,4 мл реактива Фолина-Чокальтеу, разбавленного дистиллированной водой в соотношении 1 : 1, перемешивали. Через 30 мин измеряли оптическую плотность на длине волны 750 нм.

Массовую долю белка в биомассе *C. closterium* рассчитывали по формуле [8]:

$$C = \frac{\Delta D}{K} \cdot \frac{V_{\text{гидролизат}}}{10 \cdot m (1 - k) \cdot V_{\text{аликвота}}}, \%$$

где  $C$  – концентрация белка, % ;  $D$  – оптическая плотность на длине волны 750 нм, ед. опт. плотн.;  $V_{\text{аликвота}}$  – объём аликвоты гидролизата, мл;  $V_{\text{гидролизат}}$  – объём гидролизата, мл;  $m$  – навеска сухой массы водорослей, мг;  $k$  – доля воды в сухой массе водоросли;  $K$  – коэффициент, мл·мкг<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>.

Для статистической достоверности результатов определение белка в пробе проводили 5 параллельных измерений. Несмещённая средняя квадратичная ошибка при этом составляет 1,54; коэффициент вариации – 4,47 %.

### 2.3.2 Общие липиды

Содержание общих липидов в водоросли определяли колориметрическим сульфофосфо-ванилиновым методом [39] в нашей модификации. Для этого из биореактора отбирали аликвоту объёмом 1-2 мл; навеска сырой биомассы не превышала 0,2-0,3 г. Липиды из навески сырой биомассы экстрагировали смесью Фолча. Экстракцию проводили многократно до полного обесцвечивания биомассы. В связи с тем, что сырая масса водоросли содержит 90 % воды, первую экстракцию проводили смесью Фолча в соотношении 1 хлороформ : 1 этанол. Последующие 2-3 экстракции липидов проводили смесью Фолча в соотношении 2 хлороформ : 1 этанол. Экстракты объединяли и промывали несколько раз

дистиллированной водой для удаления примесей. Затем аликвоту липидного экстракта сжигали в серной кислоте. Время сжигания пробы составляло 20 мин. После добавления фосфо-ванилинового реактива и развития окраски определяли оптическую плотность проб на спектрофотометре при длине волны 530 нм.

Концентрацию липидов определяли по формуле:

$$C = \frac{D_{530} \cdot K \cdot 100\%}{m}$$

где  $C$  – концентрация липидов в биомассе, %;  $D_{530}$  – оптическая плотность на длине волны 530 нм;  $m$  – навеска сухой массы водорослей, мкг;  $K$  – коэффициент, мл·мкг<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>. В качестве стандарта для построения калибровочного графика использовали липиды, выделенные из *C. closterium* смесью Фолча (рисунок 2.9).

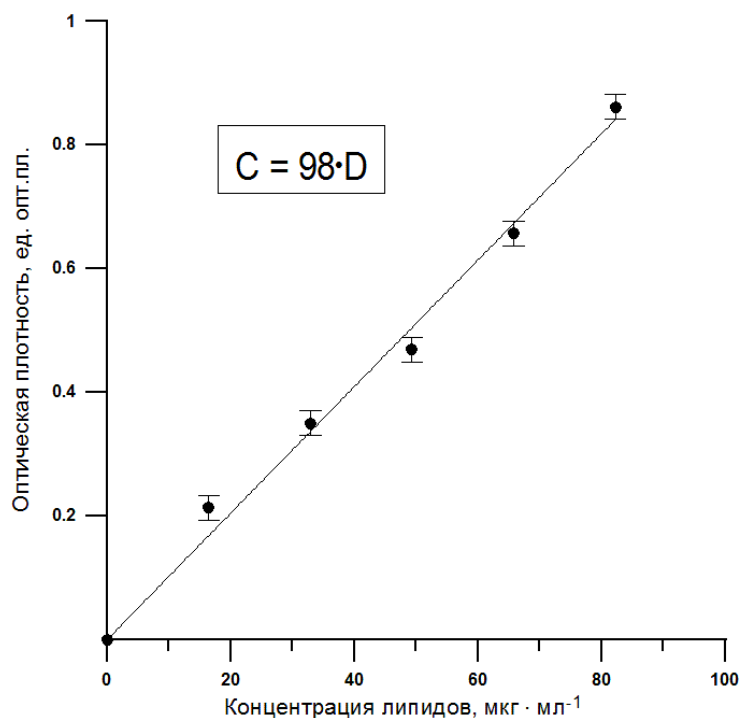


Рисунок 2.9 — Калибровочная кривая зависимости оптической плотности на длине волны 530 нм от концентрации липидов в *Cy lindrotheca closterium*

### 2.3.3 Углеводы

Углеводы в биомассе *C. closterium* определяем по методу Дюбуа [104] в нашей модификации. Для определения содержания углеводов из биореактора

отбирали аликвоту объемом 1 мл, при необходимости разбавляли в 2–3 раза морской водой. Далее центрифугировали в течение 1 – 2 мин при 3000 об·мин<sup>-1</sup> и надосадочную жидкость удаляли; при этом навеска не должна превышать 0,1 г сырой массы. Затем навеску один-два раза промывали дистиллированной водой. После тщательной промывки к навеске биомассы добавляли 2,5 мл фенольного реагента и оставляли на 10 мин. Далее добавляли 2,5 мл сернокислотного реагента, перемешивали и кипятили на водяной бане в течение 5 мин. После развития окраски определяли оптическую плотность проб на спектрофотометре при длине волны 490 нм (рисунок 2.10).

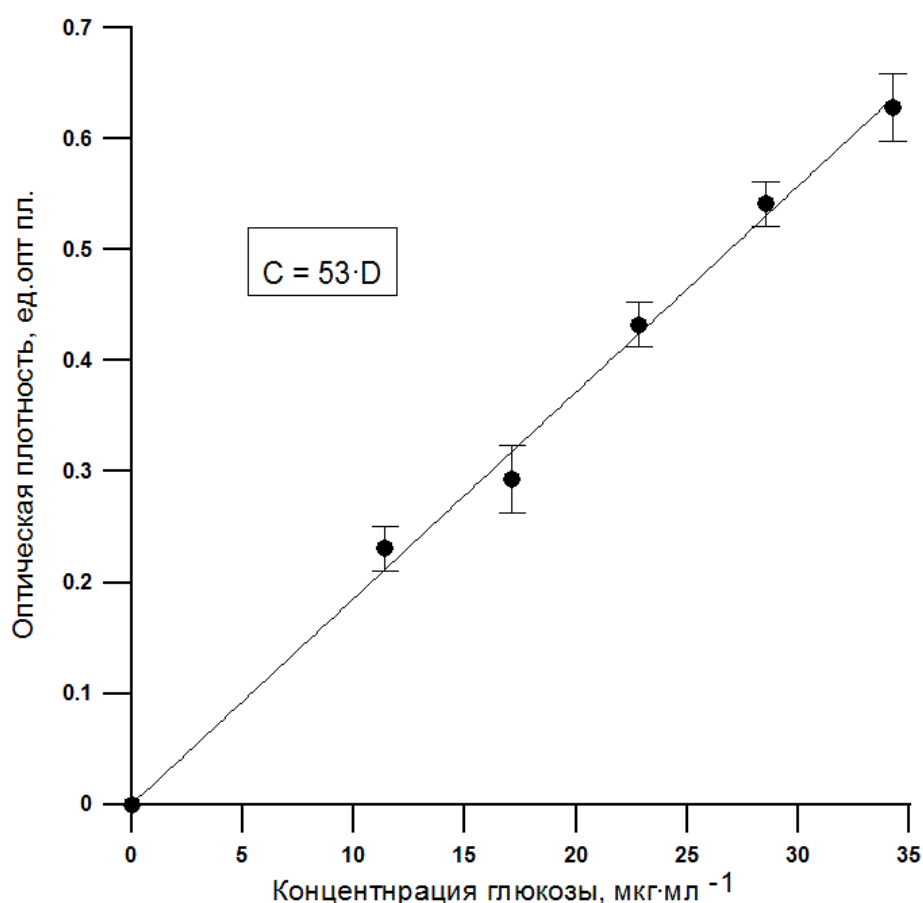


Рисунок 2.10 — Калибровочный график для определения углеводов в навеске *Cy lindrotheca closterium* по методу Дюбуа [104]

Концентрацию углеводов определяли по формуле [39]:

$$C = \frac{D_{490} \cdot k \cdot 100\%}{m}$$

где  $C$  – концентрация углеводов в биомассе *C. closterium*, %;  $D_{490}$  – оптическая плотность проб на длине волны 490 нм;  $m$  – навеска сухой массы водорослей, мкг;  $K$  – коэффициент, мл·мкг<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>. В качестве стандарта для построения калибровочного графика использовали глюкозу.

#### 2.3.4 Зольный остаток

Метод основан на определении массы золы в водоросли после сжигания органических веществ в навеске. Аликвоту, взятую из биореактора, центрифугировали в течение 2 мин при 3000 об·мин<sup>-1</sup>. Надосадочную жидкость удаляли, полученную навеску промывали 2-3 раза дистиллированной водой для удаления солей. Навеску высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре (103 ± 2) °С и помещали в предварительно взвешенный тигель. Навеска составляла от 0,5 до 1,0 г сухой массы. Тигель помещали в муфельную печь и обугливали навеску 2-3 ч при температуре 150-200 °С. Затем содержимое тигля озоляли в муфельной печи в течение от 8 до 24 ч при температуре 500-550 °С. Озоление проводили до получения золы светлого серо-коричневого цвета без темных вкраплений. По окончании озоления тигли вынимали из остывшей до температуры 50-60 °С муфельной печи, помещали в эксикатор, охлаждали до комнатной температуры и взвешивали. Озоление проб проводят до достижения постоянной массы, пока разность двух взвешиваний не превысит 0,001 г.

За окончательный результат измерения принимали среднеарифметическое значение двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости:  $|X_{11} - X_{12}| \leq r$ , где  $X_{11}$  и  $X_{12}$  – результаты двух измерений, полученные в условиях повторяемости, %;  $r$  – предел повторяемости (сходимости) при  $P = 0,95$  составляет 0,2 %. Абсолютное

расхождение между результатами двух измерений не превышает значения предела воспроизводимости  $R = 0,4 \%$  при  $P = 0,95$ .

## 2.4 Определение биогенных элементов

Для определения концентрации азота и фосфора в *C. closterium* использовали методику Королева – Вальдеррама [25]. Метод основан на минерализации фосфосодержащих и азотсодержащих органических соединений под действием окислительного реактива. Навеску сырой массы водоросли промывали 2-3 раза от питательной среды, затем к навеске добавляли дистиллированную воду до образования однородной суспензии, после чего добавляли 4 мл окислительного реактива (буферный раствор персульфата с добавлением борной кислоты и раствора натриевой щелочи) и сжигали пробу в течение 40 мин при температуре 115-120 °С в автоклаве.

Сжигание пробы происходит в щелочной среде (рН=8-9), но в процессе сжигания рН пробы становится равной 5-6. Затем для определения валового фосфора добавляем раствор аскорбиновой кислоты и смешанного реактива по методу Морфи и Райли [40]. Для определения нитратов рН пробы доводят до 8-9 добавлением трилона Б. Затем пробу пропускают через восстановительную колонку с омедненным кадмием. Метод определения нитратов с помощью восстановительной колонки описан в [25].

## 2.5 Определение тяжелых металлов

Для определения концентрации микроэлементов (кобальта, цинка, меди и марганца) в *C. closterium* использовали метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии с пламенной атомизацией [25]. Для этого сначала сжигали биомассу микроводорослей в муфельной печи при температуре  $525 \pm 25$  °С и растворяли зольный остаток в концентрированной азотной кислоте [1, 24].

Измерение концентрации микроэлементов в сухой массе водорослей проводили в 6–7 повторностях.

## 2.6 Определение содержания фукоксантина в биомассе микроводоросли

Фукоксантин в биомассе *C. closterium* определяли методом тонкослойной хроматографии. Суспензию культуры микроводорослей объёмом 10 мл центрифугировали 2 мин при 3000 об·мин<sup>-1</sup> на центрифуге ОПН-3; надосадочную жидкость удаляли. Из полученной массы водорослей Фк экстрагировали 96 % этиловым спиртом. Экстракцию проводили 2-3 раза до полного обесцвечивания биомассы в пробирке. Спиртовые экстракты объединяли. Для количественного определения Фк в суммарном спиртовом экстракте отбирали аликвоту 0,1 мл и наносили её на хроматографические стеклянные пластинки с закрепленным слоем силикагеля толщиной 0,5 мм. Процесс разделения каротиноидов методом тонкослойной хроматографии происходил при использовании системы ацетон – гексан в соотношении 3 : 7. Фракцию силикагеля, содержащую Фк, несколько раз экстрагировали спиртом до полного обесцвечивания силикагеля с последующим центрифугированием. Концентрацию Фк во фракции силикагеля, элюированную спиртом, определяли на спектрофотометре при длине волны 442 нм.

Концентрацию Фк в аликвоте биомассы, отобранной из фотобиореактора, рассчитывали по формуле:

$$\Phi_{\text{к}} = \frac{10 \cdot D_{442} \cdot V_{\text{эл}}}{E_1 \cdot B} V_{\text{ал}} \cdot V_{\text{сп.выт}},$$

где  $\Phi_{\text{к}}$  – концентрация Фк в навеске, мг·г<sup>-1</sup>;  $V_{\text{эл}}$  – объём объединенного элюента с пластины, мл;  $D_{442}$  – оптическая плотность на длине волны 442 нм;  $V_{\text{ал}}$  – объём аликвоты, нанесенной на пластину, мл;  $V_{\text{сп.выт}}$  – объём общей спиртовой вытяжки, мл;  $B$  – масса навески водоросли, г;  $E_1$  (1280 л·моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>) – коэффициент экстинкции фукоксантина в 96 % этаноле [140].

### 2.6.1 Получение фукоксантина в кристаллической форме

Для идентификации Фк его предварительно получили в кристаллической форме из спиртовых растворов и затем охарактеризовали методами масс-спектрологии и ЯМР-спектрологии. Для этого 50 г сырой биомассы *C. closterium* с концентрацией Фк  $16 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$  заливали смесью Фолча в соотношении спирт : хлороформ 1 : 1 и проводили первую экстракцию всех липидных составляющих, в том числе и Фк. Затем проводили три повторные экстракции из этой же биомассы смесью Фолча в соотношении спирт : хлороформ 1 : 2 до полного обесцвечивания биомассы. Экстракты объединяли. Полученный общий экстракт фильтровали и разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1 : 2. После разделения на две фракции, водную фракцию удаляли, хлороформенную фракцию упаривали на роторном испарителе при температуре ниже 30 °С. Концентрат липидов хроматографировали на колонке, диаметр колонки 1,5 см, а высота – 22 см с силикагелем марки Lachema 100/250 для освобождения Фк от хлорофиллов, других каротиноидов и бесцветных примесей. В качестве элюанта использовали гексан – ацетон в соотношении 3 : 7. Полученную оранжево-красную фракцию Фк в дальнейшем перекристаллизовывали из диэтилового эфира – гексана или из хлористого метилена – гексана. Выделившиеся кристаллы Фк промывали гексаном и высушивали в потоке аргона. Таким образом, получили 52 мг кристаллического Фк из биомассы *C. closterium* с общим содержанием Фк 80 мг. Потери составили 35 %.

Последующее разделение изомеров Фк и их идентификацию проводил Dr. Takashi Maoka в Research Institute for Production Development (Kyoto, Япония). Изомеры Фк разделяли на жидкостном хроматографе высокого давления Shimadzu LC-6 AD, снабженного колонкой длиной 250 мм. Внутренний диаметр колонки 4,6 мм, неподвижная фаза - силикагель, растворитель ацетон - гексан (3 : 7), скорость подачи элюанта  $1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ , регистрация при 450 нм. Спектры протонного магнитного резонанса (HNMR) (500 МГц) снимали на Varian UNITY INOVA 500 в дейтерохлороформе, в качестве внутреннего стандарта

использовали тетраметилсилан (TMS). Масс-спектры (FAB MS) получены на спектрометре JEOL JMS NX 110 Å на матрице из мета-нитробензилового спирта. На рисунке 2.11 представлены данные препаративного разделения изомеров кристаллического Фк. Соотношение транс- и цис-изомеров Фк, полученное после перекристаллизации из диэтилового эфира, составляло 95 : 4. После перекристаллизации Фк из хлористого метилена соотношение изомеров составляет 99 : 0,5. Спектр протонного магнитного резонанса кристаллического Фк соответствует all trans Фк, описанного ранее [108]. Основные пики масс спектра:  $m/z$  681.4078  $[M+Na]^+$   $m/z$  659.4272  $[M+H]^+$   $m/z$  641.4172  $[M-18]^+$  идентичны для Фк. Спектры в ультрафиолетовой и видимой областях (UV-VIS) в метаноле соответствуют all trans Фк и совпадают с данными [191].

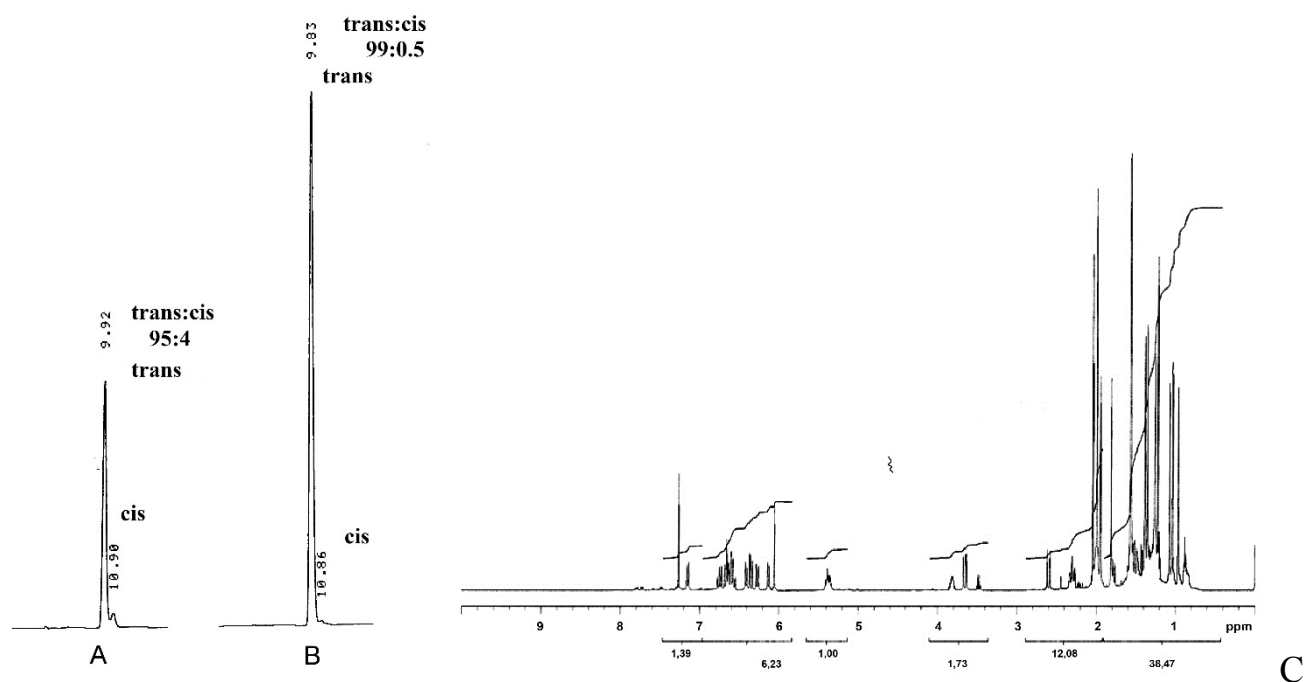


Рисунок 2.11 — Параметры препаративного разделения изомеров кристаллического фукоксантина из *Cylindrotheca closterium*. А — после перекристаллизации из диэтилового эфира; В — после перекристаллизации фукоксантина из хлористого метилена. С — спектр протонного магнитного резонанса (HNMR) кристаллического фукоксантина

## 2.7 Определение жирных кислот

Для определения жирных кислот необходимо выделить липидную фракцию из сырой биомассы. Клетки осаждали центрифугированием 3 мин при 1600 g. Непосредственно после осаждения из сырой массы экстрагировали липиды смесью Фолча. Экстракцию проводили 4 раза из 20 г сырой массы до её полного обесцвечивания. Поскольку доля воды в сырой массе составляла 90 %, первую экстракцию проводили 100 мл смесью Фолча в соотношении спирт : хлороформ 1 : 1. Последующие 2 экстракции проводили 50 мл смеси Фолча в соотношении спирт : хлороформ 1 : 2. Все экстракты объединяли и 3-4 раза промывали дистиллированной водой для удаления нелипидных примесей.

Для определения ЖК методом газохроматографического анализа предварительно проводили реакцию омыления. Для этого хлороформную фракцию, содержащую 15-20 мг суммарных липидов, упаривали на роторном испарителе, к остатку добавляли 5 мл раствора щёлочи с метанолом (10 мл 3 Н NaOH и 90 мл 90 % метанола), полученную смесь кипятили с обратным холодильником до полного омыления в течение 2 часов. После остывания к раствору добавляли несколько капель 1 % спиртового раствора фенолфталеина и трижды проводили экстракцию гексаном (по 5 мл). Водно-спиртовую фазу подкисляли HCl, добавляя 0,3 мл 6 Н HCl, затем проводили повторную экстракцию по 5 мл (3-4 раза), отбирая гексановую фракцию, которую упаривали на роторном испарителе при температуре 30-35 °С. К остатку добавляли 5 мл 3 % раствора хлористого водорода в метаноле. Смесь кипятили 2 часа с обратным холодильником и после охлаждения трижды экстрагировали гексаном (по 5 мл). Гексановую фракцию фильтровали, используя беззольный фильтр. До определения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) гексановую фракцию хранили не более суток при температуре -20 °С.

МЭЖК определяли на газохроматографическом комплексе «Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором в ЦКП ИнБЮМ РАН

«Спектрометрия и хроматография». Разделение проводили на капиллярной колонке ВРХ5 фирмы “SGE Analytical Science” длиной 60 м, с внутренним диаметром 0,25 мм и с толщиной неподвижной фазы 0,25 мкм.

Газохроматографическое разделение МЭЖК проводили в температурном интервале от 40 до 280 °С в режиме программирования температуры: 1) 1 мин при 40 °С; 2) подъём до 220 °С со скоростью 10 °С/мин (6 мин); 3) подъём до 280 °С со скоростью 10 °С/мин (10 мин); 4) 20 мин при 280 °С, общее время анализа 45 мин. Газ-носитель – гелий, скорость потока – 1,5 мл/мин, ввод пробы – 1 мкл пробы без деления потока, температура испарителя – 250 °С. Диапазон сканирования масс составил 50–450  $m/z$ . Качественный анализ МЭЖК проведен путем анализа хроматограмм с использованием стандартного образца смеси МЭЖК (SUPELKO 37 component FAME mix. CRM47885). Расчёт содержания МЭЖК проводился по методу процентной нормализации по площадям пиков.

Содержание суммарных липидов в хлороформной фракции определяли двумя методами: колориметрическим методом с фосфованилиновым реактивом и весовым методом [17]. Весовой метод использовали параллельно с колориметрическим методом только на стационарной фазе роста, когда содержание общих липидов составляла 18 % сухой биомассы (190 мг на 1 г).

## 2.8 Статистическая обработка результатов

Для обработки данных использовали программу SciLab. Все измерения проводили в двух биологических и четырех аналитических повторностях. Статистическая достоверность основных параметров культивирования (сухая масса, содержание каротиноидов, фукоксатина, липидов и белков, число клеток), а также элементного состава оценивали при помощи стандартных  $t$ -критерия ( $P = 0,95$ ). На рисунках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные отклонения. Для расчёта доверительных интервалов использовали  $t$ -критерий Стьюдента для 95 % вероятности.

### ГЛАВА 3 ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM*

Исследования сезонной динамики количественных и продукционных характеристик диатомовых водорослей в природных местообитаниях показало, что важным компонентом является точная идентификация видового состава. Однако для целей культивирования определение вида также необходимо с учётом современных методов исследования. Ниже остановимся на изучении основных морфологических параметров рассматриваемого вида.

#### 3.1 Морфо-экологическая характеристика

Для начала рассмотрим таксономическую классификацию вида *Cylindrotheca closterium* и его обширную синонимику [47, 243]. Это одноклеточная пеннатная диатомовая водоросль относится к царству Chromista, отделу Bacillariophyta, классу Bacillariophyceae, порядку Bacillariales Hendeу 1937, семейству Bacillariaceae Ehrenberg 1831, роду *Cylindrotheca* Rabenhorst 1859 emend. Reimann et Lewin 1964.

*Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et J.C. Lewin 1964 (рисунок 3.1). (Basionym: *Ceratoneis closterium* Ehrenb. 1839; Synonyms: *Nitzschia closterium* (Ehrenb.) W. Smith 1853; *N. reversa* W. Smith 1853; *N. closterium* var. *reversa* (W. Smith) Hauck; *Nitzschiella closterium* Rabenhorst 1864; *Nitzschia rostratum* Grunow 1880; *N. longissima* var. *closterium* (Ehrenb.) Van Heurck 1885; *N. curvirostris* var. *closterium* (Ehrenb.) De Toni 1892; *Nitzschiella longissima* var. *closterium* (Ehrenb.) Peragallo et Peragallo 1897; *Homoeocladia closterium* (Ehrenb.) Kuntze 1898; *Nitzschiella tenuirostris* Mereschk. 1901; *Nitzschia longissima* Gran 1930; *N. closterium* var. *recta* Gran 1931).

Клетки *C. closterium* одиночные с характерно игловидными и тонкими концами, в живом виде вытянутые в одном или противоположном направлении,

имеющие тенденцию вытягиваться из центральной части клетки (рисунки 3.1-3.3). Поверхность панциря покрыта тонким пектиновым слоем. В благоприятных условиях питательной среды клетки имеют желто-коричневую окраску разных оттенков. Однако при неблагоприятных условиях клетки могут приобретать бурый или темно-коричневый цвет за счёт синтеза фукоксантина в клетках.

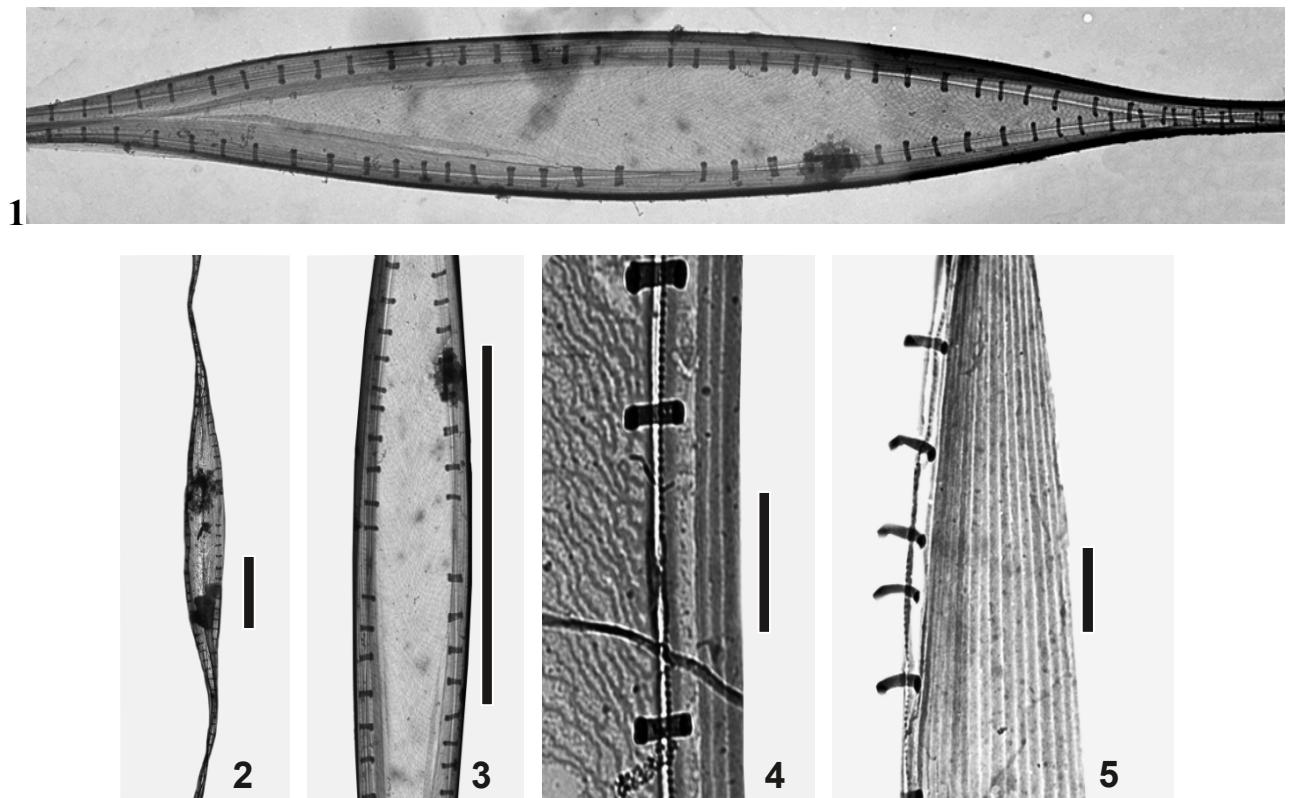


Рисунок 3.1 — Фрагменты панцирей *Cylandrotheca closterium* (1–5) в электронном трансмиссионном микроскопе (фото И.В. Стоник) [по: 243]

Шовный канал скрученный по оси клетки. Вставочные ободки узкие и многочисленные. Размеры створок составляют 30–60 мкм длина, 4–8 мкм ширина, объём приблизительно 550,3 мкм<sup>3</sup>.

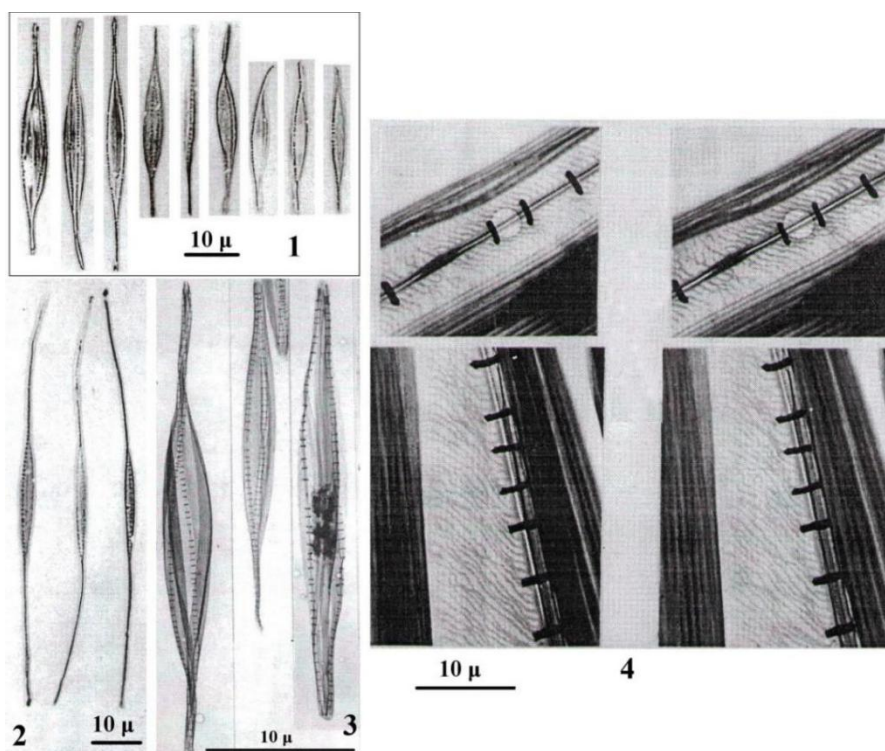


Рисунок 3.2 — *Cylandrotheca closterium* в световом микроскопе (СМ) в разных ракурсах без хлоропластов (1, 2) и фрагменты панциря (3 – внешний вид и 4 – внутренний вид) в электронном сканирующем микроскопе (СЭМ) [по: 235]

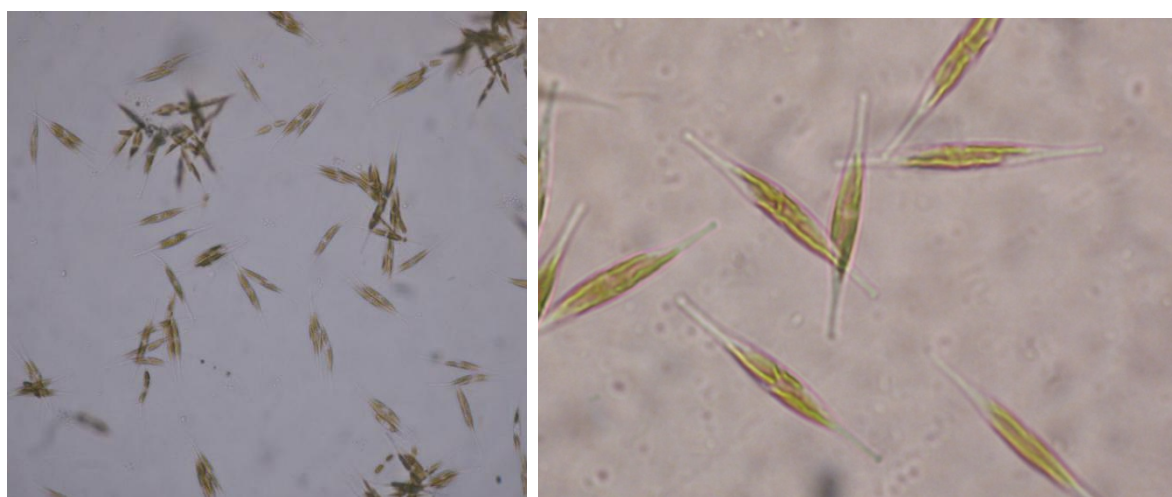


Рисунок 3.3 — Клетки *Cylandrotheca closterium* при культивировании в питательной среде F при разных увеличениях ( $\times 20$ ,  $\times 40$ ) светового микроскопа (фото автора)

Вид встречается во всех географических зонах Мирового океана и является космополитом [48, 136]. Впервые указан У. Смисом в мае 1851 г. у берегов Британии [253], в Амурском лимане [18], водоёмах Турции, во льдах моря Лаптевых, Северном, Баренцевом, Белом, Беринговом, Карибском, Средиземном, Адриатическом, Аральском, Каспийском, Норвежском, Карском, Чукотском, Балтийском, Чёрном [44, 45], Азовском [4, 35, 38, 46], Восточно-Китайском морях, у берегов Гренландии, Сев. Калифорнии, Шпицбергена, Бразилии, Мексики, Финмаркена и Швеции, Испании, Хорватии, Румынии, Германии, Дании, Кувейта, Зап. Индии, Японии, Австралии, Новой Зеландии, Сингапура, Сахалина и Приморья, на Гавайских и Канарских островах [243], а также в микрофитобентосе Антарктики [48]. Вид указан в фитопланктоне различных регионов Чёрного моря [28, 30, 36, 37] и в разных его экотопах [43, 44, 45, 47, 81].

**Индикаторная роль.** Вид является возбудителем «цветения» воды в море, иногда встречается в районе «красных приливов» [44], а также является алкалифилом,  $\beta$ -мезосапробионтом – индикатором умеренно загрязнённых органических вод [12].

**Культивирование *C. closterium* в экстенсивном режиме.** Наблюдения за размерами клеток проводили в маточной накопительной культуре при разных режимах её содержания в среде F при освещённости 13,7 клк и температуре среды 20–21 °С. На разных стадиях роста показано, что длина клеток составляла 30-35 мкм и ширина 3-5,5 мкм, при этом в экспоненциальной фазе роста длина достигала 30,5 мкм и в стационарной фазе – 35,5 мкм (таблица 3.1).

В экспоненциальной фазе преобладают более вытянутые мелкие клетки, активно делящиеся и характеризующиеся постоянством удельной скорости роста. Размеры клеток (длина и ширина) на разных стадиях роста имеют близкие средние значения, но увеличиваются в стационарной фазе. При этом преобладают клетки бóльших размеров, наблюдается много «жирных» клеток в основном за счёт процентного увеличения липидов.

Таблица 3.1 — Размеры клеток *Cylindrotheca costerium* в маточной культуре при температуре 19–20 °С и освещённости 13 клк в разных фазах роста на питательной среде F.

Длина тела клетки без концов «усиков», мкм	Общая длина клетки, мкм	Ширина клетки, мкм
Маточная культура, 20.02.2017 г.		
16,55	29,93	3,59
18,05	32,63	4,26
17,81	34,04	5,21
17,38	32,01	5,25
21,86	31,15	4,5
17,31	33,94	4,64
18,16*	32,28 *	4,58 *
Маточная культура, 21.02.2017 г.		
15,8	33,41	3,55
14,78	30,09	3,77
17,39	33,81	5,50
15,82	24,25	3,88
17,68	33,6	5,44
16,29	31,10	4,88
16,3	33,0 *	4,5 *
Экспоненциальная фаза роста в культуре, 22.02.2017 г.		
16,77	30,3	—
16,44	30,54	—
16,04	31,55	—
18,33	31,17	—
16,23	30,86	—
16,8 *	30,88*	—
Стационарная фаза роста в культуре 27.02.2017 г.		
18,35	35,47	—
17,55	32,33	—
17,67	34,45	—
13,93	35,55	—
21,37	33,23	—
17,69	34,1	—
20,025 *	34,3 *	—

Примечание. \* – среднее

В целом, при культивировании вид является толерантным к разным условиям среды [14, 48]. Многолетние исследования размерного диапазона черноморской популяции вида в природных условиях показали, что его размеры изменялись в пределах 30–260 мкм длины, 2,0–6 мкм ширины, 12–16 фибул в 10 мкм [243].

### 3.2 Интенсивная культура

Для оценки биотехнологического потенциала *C. closterium* необходимо разработать методы и изучить характеристики интенсивной культуры этой водоросли. Для её культивирования традиционно используют среды F или F/2 [62, 86, 135]. Данные среды являются обедненными по биогенным элементам и максимальная плотность культуры *C. closterium* на данных средах может достигать 291 мг·л<sup>-1</sup> и 350 мг·л<sup>-1</sup> [273, 274]. Поэтому, в связи с отсутствием высокопродуктивных сред *C. closterium* культивируют ограниченно, как в лабораторных исследованиях [77], так и в полупромышленных масштабах [62, 273, 274].

Цель данной работы – получить интенсивную культуру *C. closterium* и изучить её продукционные характеристики. Определение зависимости продуктивности водоросли в накопительной культуре от концентрации биогенных элементов в среде необходимо для создания интенсивной культуры. С этой целью мы пропорционально увеличивали концентрации нитрата натрия, дигидрофосфата натрия и метасиликата натрия, а также концентрации всех микроэлементов в среде относительно стандартной среды F.

*C. closterium* выращивали в накопительном режиме на люминоstate в колбах объемом 1 л при температуре 20-22 °С и освещённости 13 клк. На первом этапе исследования культуру адаптировали к стандартной среде F. На втором этапе выращивали водоросль в 7 колбах с различной концентрацией биогенных элементов в среде, пропорционально увеличивая концентрации микроэлементов и

биогенных элементов среды F в 2; 3; 4; 5; 10; 20; 30 раз. При этом ввели следующие обозначения: 2F – двукратное увеличение, 3F – трехкратное увеличение и т.д. Среды готовили на стерильной морской воде без витаминов [26]. В процессе выращивания культуру непрерывно барботировали воздухом. Контролем служила накопительная культура, выращенная на среде F.

Изменение плотности накопительной культуры от времени и концентрации питательных веществ представлено на рисунке 3.4. Кривые характеризуются отсутствием лаг- и экспоненциальной фаз роста. Поэтому рост культуры лимитирован либо концентрацией биогенных веществ в среде, либо световым обеспечением клеток. Угол наклона накопительной кривой повышается при увеличении концентрации биогенных элементов, т.е. продуктивность культуры в начальный момент времени зависит от концентрации биогенных элементов.

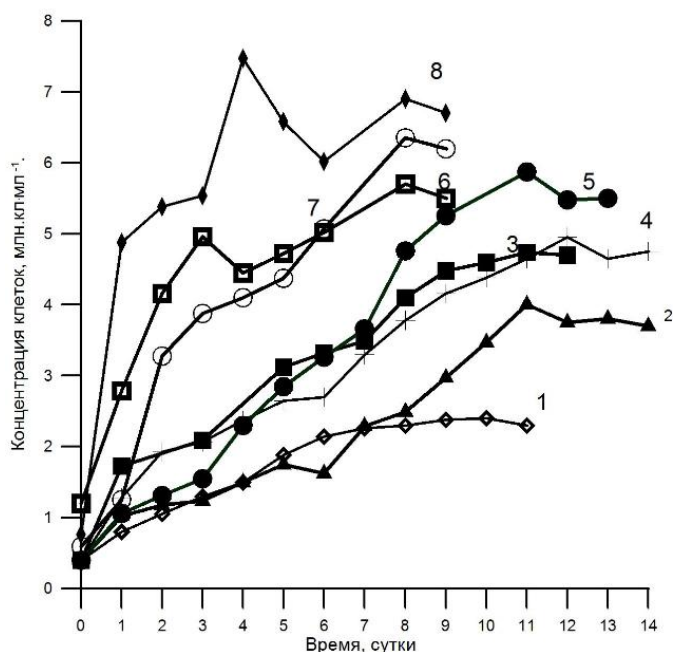


Рисунок 3.4 — Изменение плотности накопительной культуры *Cyllindrotheca closterium* от времени и концентрации питательных веществ. 1 – концентрация биогенных веществ в среде F; 2 – 2F; 3 – 3F; 4 – 4F; 5 – 5F; 6 – 10F; 7 – 20F; 8 – 30F

Для всех вариантов опыта продуктивность в начале эксперимента была максимальной. Культура находилась в стадии замедления роста. Максимальные плотности культуры в стационарной фазе роста зависели от концентрации биогенных элементов в среде. Поэтому использование среды F для интенсивного культивирования *C. closterium* с целью накопления биомассы нецелесообразно. В среде необходимо увеличивать концентрацию биогенных элементов для увеличения скорости роста и накопления биомассы, что соответствует представлениям о субстрат зависимом росте микроорганизмов в культуре [54]. Зависимость скорости роста *C. closterium* от концентрации биогенных элементов в среде можно описать уравнением Михаэлиса – Ментен (рисунок 3.5):

$$P = \frac{P_m \times S}{K_m + S}$$

где  $P$  – продуктивность культуры,  $\text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ;  $P_m$  – максимальная продуктивность культуры,  $\text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ;  $S$  – начальная концентрация биогенных элементов,  $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ;  $K_m$  – константа полунасыщения.

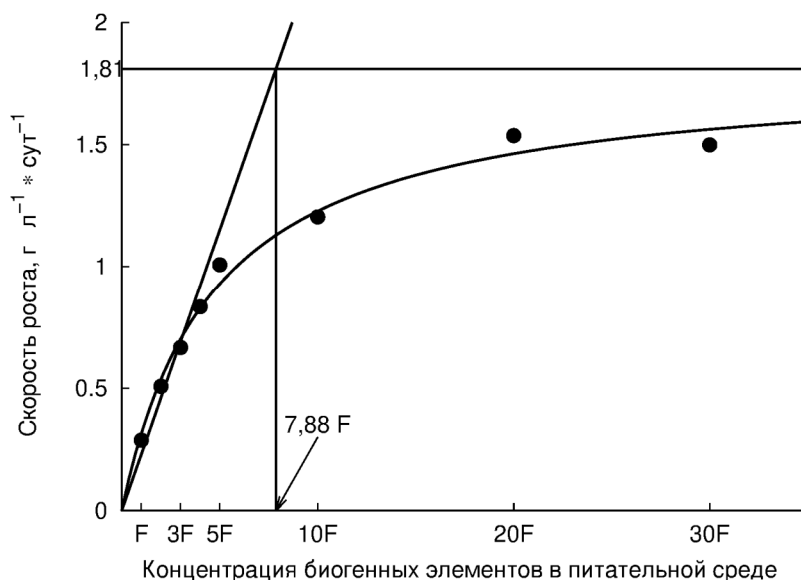


Рисунок 3.5 — Зависимость скорости роста *Cyldrotheca closterium* от концентрации азота, фосфора и кремния в среде относительно стандартной питательной среды F

Значения максимальной продуктивности *C. closterium* ( $P_m$ ) и константы полунасыщения ( $K_m$ ) рассчитаны методом наименьших квадратов. Продуктивность ( $P$ ) культуры прямо пропорциональна концентрации биогенных элементов ( $S$ ) в среде ( $P$ ) в диапазоне  $F - 5F$ . При достижении насыщающих концентраций по основным биогенным элементам (1,182 г·л<sup>-1</sup> нитратов натрия, 78,8 мг·л<sup>-1</sup> дигидрофосфата натрия и 472,8 мг·л<sup>-1</sup> метасиликата натрия) происходит смена лимитирующего фактора, поэтому скорость роста становится практически независимой от содержания биогенных элементов в среде.

Таким образом, интенсивная культура *C. closterium* имеет максимальную продуктивность 1,54 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. Установлена гиперболическая зависимость продуктивности культуры от концентрации биогенных элементов в среде. Продуктивность культуры прямо пропорционально зависит от концентрации биогенных элементов в среде при увеличении концентрации биогенных элементов в пять раз, в сравнении со стандартной питательной средой. Однако пропорциональное увеличение содержания биогенных элементов в среде  $F$  для выращивания микроводоросли в интенсивной культуре не всегда необходимо. При разработке биотехнологий на основе *C. closterium* необходимо разработать среды с высокими и оптимальными для данной культуры концентрациями биогенных элементов. Поэтому очередной нашей задачей является создание питательной среды для микроводоросли с оптимальными концентрациями всех биогенных элементов. Для решения этой задачи необходимо рассчитать «истинные» потребности в основных биогенных элементах.

### **3.3 Новая питательная среда для интенсивного культивирования**

Для разработки новой среды сначала рассчитаны потребности *C. closterium* в азоте, фосфоре и кремнии. При проведении экспериментов за основу взята питательная среда 30F [14, 15]. Следует отметить, среда  $F$  изначально разработана для микроводорослей в целом, при этом не учитывались потребности в биогенных

элементах отдельных видов диатомей. Например, среди всех диатомовых *C. closterium* содержат наибольшее количество кремния, а *Phaeodactylum tricornutum* – наименьшее [88], поэтому для *C. closterium* содержание кремния в среде F можно считать недостаточным, а для *P. tricornutum* – избыточным.

Сведения о потребностях *C. closterium* в азоте, фосфоре и др. в литературе практически отсутствуют. Также не описаны среды для интенсивной культуры вида. В наших экспериментах в качестве инокулята использовали активно делящуюся культуру. При определении потребностей водоросли в биогенных элементах инокулят, перед внесением в свежеприготовленную среду, центрифугировали с целью исключения попадания дополнительных биогенных элементов в культуру. Начальная плотность культуры в эксперименте составляла 0,1 – 0,2 г сухой массы на 1 л. Культуру выращивали в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах плоскопараллельного типа (см. гл. 2).

Для выявления потребностей *C. closterium* в азоте, фосфоре и кремнии проведён химический анализ биомассы (таблица 3.2).

Таблица 3.2 — Химический состав диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*.

Макроэлементы	Содержание в биомассе, мг·г <sup>-1</sup>	Микроэлементы	Содержание в биомассе, мкг·г <sup>-1</sup>
Кремний	38,20 ± 0,01	Кобальт	11,0 ± 1,0
Азот	64,0 ± 1,0	Марганец	75,0 ± 3,0
Фосфор	17 ± 1,0	Цинк	75,0 ± 6,0
Железо	45,0 ± 0,2	Медь	30,0 ± 2,0

На основе химического анализа биомассы *C. closterium* была рассчитана «истинная» потребность в азоте, в фосфоре и в кремнии.

Затем последовательно, лимитируя рост накопительной культуры азотом, фосфором и кремнием в среде, определяли количество субстрата, необходимого

для синтеза 1 г сухой биомассы микроводоросли. Установлено, что для кремния и фосфора «истинная» и наблюдаемая потребности совпадают. Так, при начальной концентрации  $0,386 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1} \text{ Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ , что в пересчете на кремний составляет  $0,0382 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ , плотность культуры в стационарной фазе роста достигала  $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ . Сходная тенденция наблюдается и при внесении  $0,041 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (в пересчете на фосфор –  $0,0166 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ ).

Для азота «истинная» и наблюдаемая потребность не совпадают, поскольку для синтеза единицы массы микроводоросли характерно избыточное потребление азота. При начальной концентрации нитрата натрия  $0,388 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  максимальная плотность культуры достигает  $0,88 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  (потери азота 12 %). Таким образом, средняя наблюдаемая потребность в азоте *C. closterium* составляет 7,2 %, а «истинная» – 6,4 %. Потери азота в накопительной культуре *C. closterium* в разных экспериментах не остаются постоянными, составляя, в среднем 10 %, как и у других видов микроводорослей [21]. В культуральной среде азот может находиться в органической форме, вследствие биосинтеза экзометаболитов [257], или в неорганической форме в результате деятельности сопутствующей микрофлоры. По нашим данным в культуральной среде в стационарной фазе роста *C. closterium* органический азот составляет 64 % общего азота, что характерно и при культивировании других видов микроводорослей.

В отличие от кремния и фосфора, азот в культуре *C. closterium*, по-видимому, является невозвратным субстратом, либо время его повторного вовлечения в биосинтетические пути велико. Это утверждение основано на том, что при лимитировании роста *C. closterium* азотом продолжительность стационарной фазы роста мала, наблюдается агглютинация клеток.

Учитывая соотношение долей химических элементов в биомассе, была составлена питательная среда RS [15, 42], которую использовали для дальнейших экспериментов (таблица 3.3). Состав среды RS приведён в расчете на максимальную плотность 1 г сухой биомассы *C. closterium*. В наших экспериментах при пропорциональном увеличении концентраций биогенных

элементов в среде плотность культуры достигала  $7 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ . Пример накопительной кривой роста на концентрированной среде 5 RS представлен на рисунке 3.6.

Таблица 3.3 — Состав питательной среды RS для культивирования диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*.

Компонент	Количество, $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$
$\text{NaNO}_3$	0,3880
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,0641
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$	0,3860
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	0,8720
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,1000
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,0002
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,00044
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,0002
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,00036
$\text{NaMoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,00012

Анализ накопительной кривой роста показал, что максимальная продуктивность культуры достигала в первые трое суток и составляла  $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ . Затем продуктивность снижалась до  $0,45 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$  вследствие светового лимитирования роста. Плотность культуры достигала  $5 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ .

В отличие от азота, фосфора и др. макроэлементов, *C. closterium* способна накапливать значительные количества железа, поэтому для получения биомассы с минимальной долей железа водоросль выращивали на среде, в которой отсутствовал источник Fe.

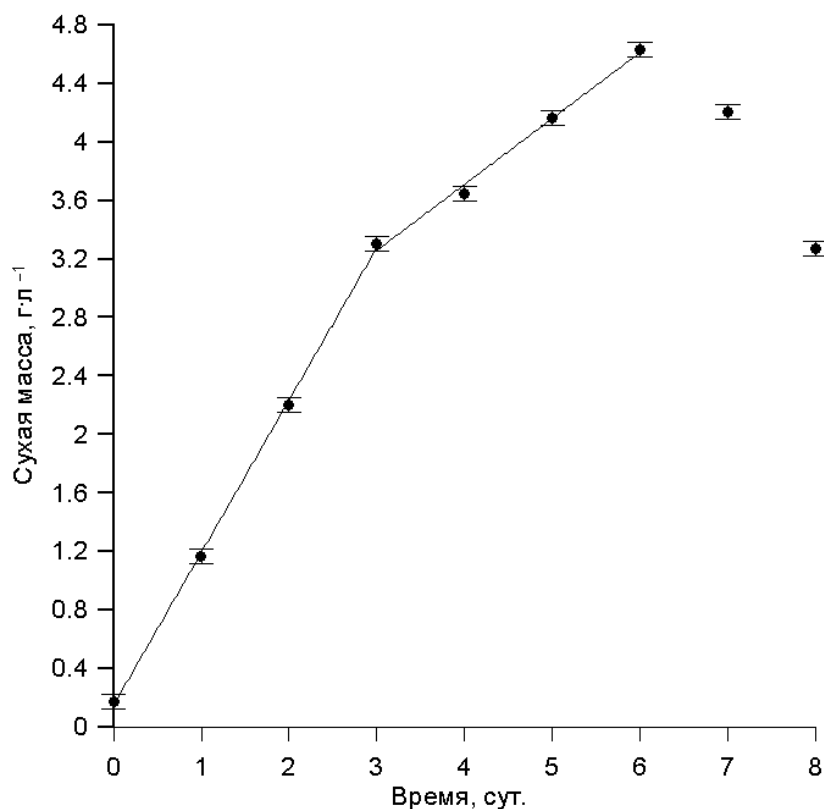


Рисунок 3.6 — Динамика плотности культуры *Cyindrotheca closterium* при пятикратном увеличении концентрации биогенных элементов в питательной среде RS

В таких условиях биосинтез проходил только за счет внутриклеточных запасов, после истощения которых рост плотности культуры прекратился. При уменьшении внутриклеточного содержания железа до  $0,7 \text{ г}\cdot\text{кг}^{-1}$  культура приобретала нехарактерный оранжевый цвет и погибала (рисунок 3.7). Ясно, что это значение мы не можем считать величиной потребности. Оно является лишь примерной оценкой, поскольку железо занимает промежуточное значение между макро- и микроэлементами и рассчитать величину потребности можно только методом проточных, плотных культур [2], причем с учетом взаимодействия с другими биогенными элементами [78].

Установлено, что высокие концентрации железа (более  $126 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) в среде не оказывают ингибирующего действия на рост *C. closterium*. Кроме того,

высокие концентрации железа в среде приводят к накоплению его в биомассе (до  $6 \text{ г} \cdot \text{кг}^{-1}$ ). Чтобы избежать лимитирования роста во всех последующих экспериментах, мы использовали среды с концентрацией железа минимум  $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ .

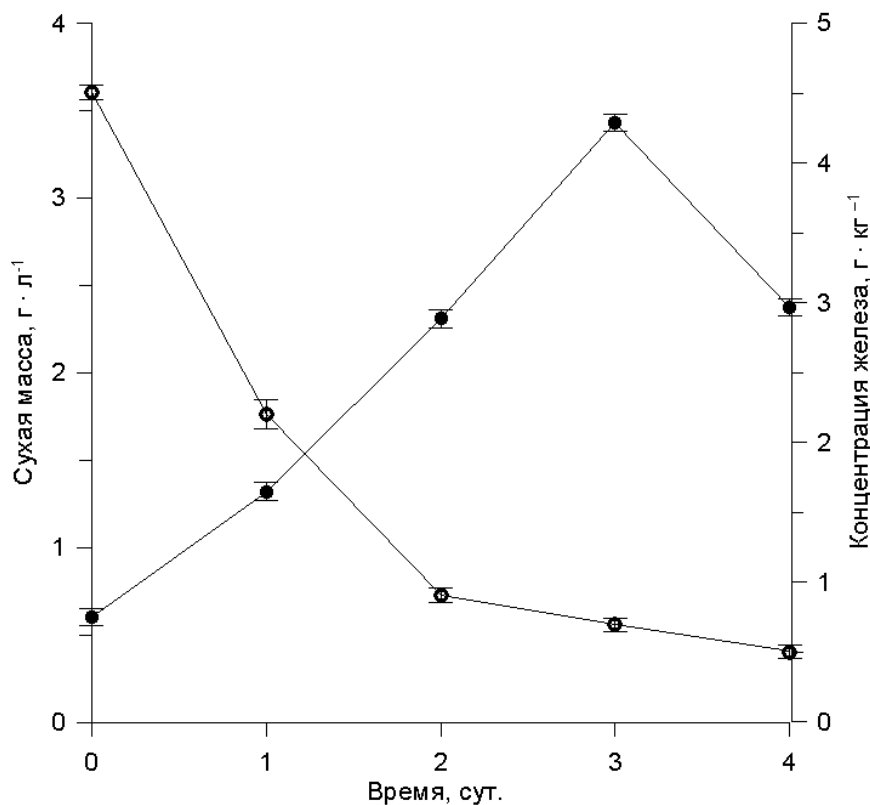


Рисунок 3.7 — Динамика плотности культуры (чёрные маркеры) и внутриклеточной концентрации железа (белые маркеры) при культивировании *Cylandrotheca closterium* без источника железа в питательной среде. Максимальная продуктивность  $1,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$

Плотные культуры при определённых условиях могут не достигать своей максимальной продуктивности [7]. Кроме концентраций и соотношений биогенных элементов в среде, существенным является степень эффективности усвоения биогенных элементов. Различные формы одних и тех же биогенных элементов могут иметь различную степень усвоения. Одним из важнейших биогенных элементов является азот. Азот входит в состав белков и ферментов,

влияет на биосинтез пигментов, липидов в клетках, а также определяет максимальные продукционные характеристики водорослей.

### 3.4 Продукционные характеристики в накопительном режиме

#### 3.4.1 Влияние различных источников азота

Известно, что клетки микроводорослей поглощают азот как в нитратной, нитритной, аммонийной, так и в органической форме [125]. Углерод и азот являются важнейшими компонентами в питательной среде, существенно влияющими на продукционные характеристики микроводорослей, особый интерес представляют органические источники азота, такие как аминокислоты, мочевины и её производные. Субстраты органического азота могут служить источником не только азота, но и углерода, обеспечивая в нем потребности диатомовых водорослей. Органические источники азота дают возможность водорослям потреблять уже готовые углеводородные скелеты для биосинтеза, что может увеличивать скорость роста микроводорослей [113, 231]. Цель данного раздела - сравнить продукционные характеристики диатомовой водоросли при использовании разных форм азота в питательной среде в интенсивной накопительной культуре

Культуру *C. closterium* адаптировали к условиям интенсивного культивирования, используя питательную среду RS (таблица 3.3) при круглосуточном освещении 13 клк и температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Культура была не лимитирована по свету. После адаптации культуру использовали в качестве инокулята для дальнейших исследований. Во всех экспериментах *C. closterium* выращивали в режиме накопительного культивирования на среде RS с различными источниками азота с расчетом биогенных элементов на максимальную плотность культуры  $3 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ . Концентрации всех биогенных элементов среды RS приведены с расчётом на 1 г сухой массы.

В первом эксперименте в качестве источника азота использовали нитрат и нитрит натрия, мочевины, а также азот в аммонийной форме. Количество нитратов, нитритов, аммония и мочевины в питательной среде рассчитывали, исходя из содержания азота в среде, при этом соотношение азота к фосфору составляло 15. Экспериментально исследовали влияние азота в аммонийной форме на *C. closterium*, добавляя сульфат аммония, нитрат аммония или карбонат аммония в среду во время активного роста культуры.

Во втором эксперименте в качестве источника азота использовали аминокислоты: аргинин, аспарагин и цистеин. Количество аспарагина и цистеина в среде рассчитывали, исходя из содержания азота в среде. При добавлении цистеина в среду соотношение азота к фосфору составляло 6. Аргинин и аспарагин добавляли в среду в пересчёте на соотношение азота к фосфору 15 : 1.

Плотность культуры определяли двумя методами: 1) методом йодатной окисляемости биомассы [6]; 2) прямым взвешиванием сырой биомассы в полипропиленовых пробирках на аналитических весах CAUY-120 с погрешностью 1 мг после осаждения клеток центрифугированием. При определении доверительного интервала использовали среднее квадратическое отклонение значений аликвот биомассы культуры объемом 10 мл. Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали коэффициент связи между сухой и сырой массой ( $k = 0,1$ ).

Продуктивность плотных культур микроводорослей при использовании разных источников азота различна, несмотря на наличие у диатомей в плазмалемме переносчиков практически всех форм азота [65, 85] и способность клеток поглощать азот из околочлеточной среды.

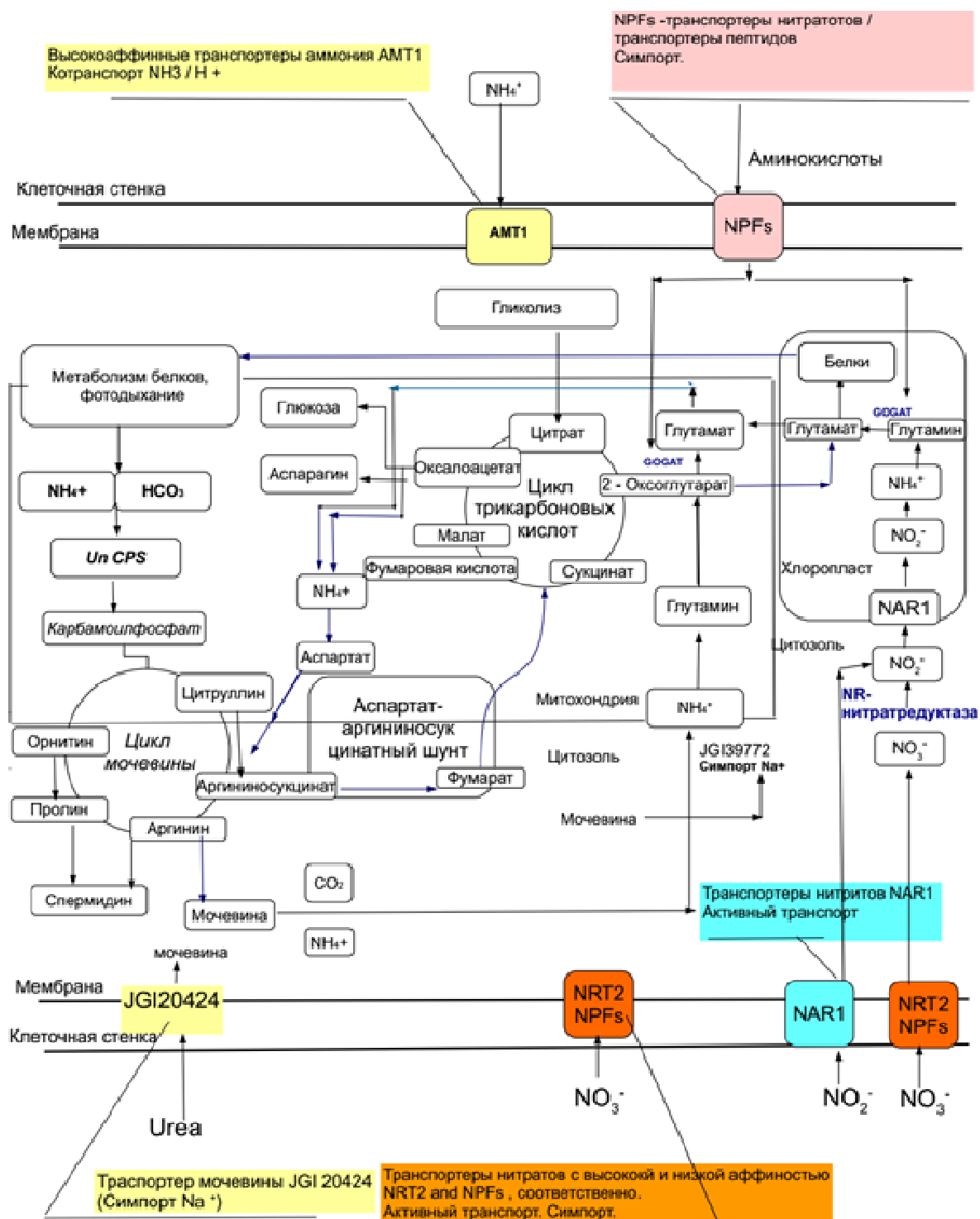


Рисунок 3.8 — Поглощение и пути метаболизма и различных форм азота в клетках диатомовых водорослей (оригинальная схема с использованием литературных источников [64, 65, 67, 75, 79, 84, 85, 92, 125, 126, 205, 220, 231, 232, 255])

Это можно объяснить особенностью переносчиков азота у диатомей, различием времени оборота ферментов, различием концентрацией ферментов-переносчиков в биомассе, а также различными скоростями процессов и длительностью метаболических путей азота в клетке. С использованием литературных данных нами разработана схема метаболических путей азота в клетках диатомовых водорослей (рисунок 3.8).

Из рисунка 3.8 видно, что у диатомей восстановление азота происходит в несколько этапов:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow$  аминокислоты  $\rightarrow$  белки [65, 85]. Диатомовые способны ассимилировать как окисленный, так и восстановленный азот [67]. Различные формы азота проникают в клетку диатомей благодаря специфическим ферментам-переносчикам [220]. Диатомеи способны ассимилировать нитраты, нитриты, аммоний, мочевины и аминокислоты [126].

**Нитратная форма азота.** Исследование динамики плотности накопительной культуры *C. closterium* при использовании в качестве источника азота нитрата натрия показало, что плотность культуры достигла расчётного максимального значения и составила  $3,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  (рисунок 3.9).

Максимальная продуктивность отмечена на четвёртые сутки культивирования ( $1,45 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ). У кривой роста присутствует длительная стационарная фаза роста. Это можно объяснить тем, что нитрат натрия поглощается клеткой водоросли за счет двух специальных транспортных белков NRT2 и NPFs (рисунок 3.8), выполняющих активный перенос нитрат-ионов и протонов ( $\text{H}^+$ ) и регулирующих градиент pH [240, 255]. В случае, когда данные белки-транспортеры ингибированы аммонийным азотом или находятся в неактивном состоянии, длительная стационарная фаза не наблюдается.

Нитратный азот транспортируется через мембрану, затем за счет работы цитозольной NADH-зависимой нитратредуктазы (NR) восстанавливается до нитрит-иона:  $2\text{H}^+ + \text{NO}_3^- + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$  (рисунок 3.8). Нитрит-ион далее переносится в хлоропласт и восстанавливается до аммония с помощью ферредоксин зависимой нитритредуктазы (Fd-NIR) [75]. Белки NRT2,

обладающие высоким уровнем сродства к нитратной форме азота, имеют 12 трансмембранных сегментов и функционируют как ко-транспортеры нитрат-ионов и протонов, проявляющие свою активность при достаточно низких концентрациях нитратного азота. У диатомовой водоросли *P. tricornutum* идентифицировано шесть белков-транспортеров NRT2, тогда как у центрической диатомеи *T. pseudonana* идентифицировано три белка семейства NRT2 [240, 255].

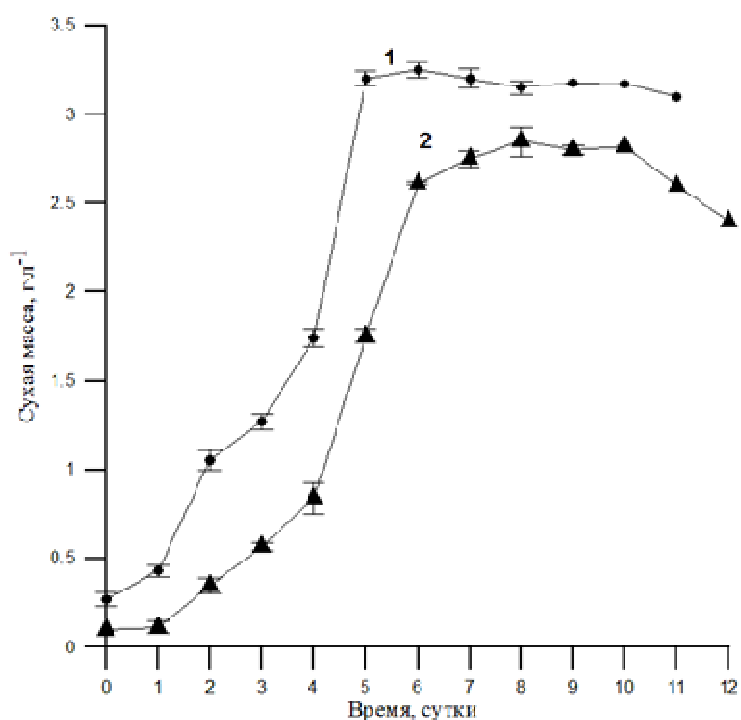


Рисунок 3.9 — Динамика плотности накопительной культуры диатомовой водоросли *Cyldrotheca closterium* при выращивании на среде RS при использовании нитрата натрия (1) и нитрита натрия (2) в качестве источников азота

Белки NPF — семейство низкоаффинных переносчиков нитрат-ионов, которые по сравнению с их животными и бактериальными аналогами, транспортируют широкий спектр субстратов в растениях:  $\text{NO}_3^-$ , ди- и трипептиды, аминокислоты, дикарбоксилаты, глюкозинолаты, ауксин и абсцизиновую кислоту

[240]. Активность транспортеров NRT2 и NPFs ингибируется ионами  $\text{NH}_4^+$ . При концентрации выше аммония  $1 \mu\text{M}$  поглощение нитрат-ионов прекращается [255].

**Нитритная форма азота.** Анализ результатов по динамике плотности накопительной культуры *C. closterium* при использовании в качестве источника азота нитрита натрия показал, что максимальная плотность культуры достигла расчётных величин (расчет биогенных элементов в среде делали на три грамма сухой массы) и составила  $2,8 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  (рисунок 3.9). Максимальная продуктивность отмечена на 4-ые сутки культивирования ( $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ ), то есть скорость роста водорослей при использовании нитритов в среде ниже по сравнению с использованием нитратов. Следовательно, восстановление нитратного азота до нитритного не является узким местом метаболизма клеток в целом.

Известно, что присутствие нитрит-ионов в питательной среде губительно для многих фототрофов [205]. Однако даже высокие концентрации нитрита натрия в среде (более  $2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ ) не угнетают рост клеток *C. closterium*. Это объясняется наличием специфического фермента – нитритредуктазы. Ферредоксин зависимая нитритредуктаза (Fd-NIR) представляет собой белок, содержащий гем серы и кластер железа ( $4\text{Fe-4S}$ ), катализирующий шестиэлектронное восстановление  $\text{NO}_2$  до  $\text{NH}_4^+$  [205]. У диатомовых водорослей физиологический донор электронов – ферредоксин восстанавливается за счет светозависимого переноса электронов в хлоропластах [266]. Снижение фотосинтетического электронного потока к ферредоксину в клетках из-за лимитирования железа в среде может ограничить ассимиляцию  $\text{NO}_3^-$  [205]. Fd-NIR восстанавливает нитрит до аммиака, который затем может служить субстратом для глутамин - глутамат-синтазного цикла (GS-GOGAT) или для цикла мочевины [255]:  $8\text{H}^+ + \text{NO}_2^- + 6\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ . Таким образом, за счет работы ферментов NR и Fd-NIR происходит восстановление неорганических форм азота до  $\text{NH}_4^+$ .

Можно предположить, что продуктивность культуры диатомовых при добавлении нитритного азота в среду будет выше, чем при добавлении нитратного, т. к. для восстановления азота до аммиака требуется меньше стадий и

энергии. Однако по нашим данным, максимальная скорость роста культуры в заданных условиях ниже. Важно отметить, что аммонийная форма азота ингибирует ферментную активность Fd-NIR, а также подавляет синтез данного фермента на уровне экспрессии генов [75]. Для кривых роста, полученных при использовании в питательной среде нитритов и нитратов в качестве единственных источников азота, характерна длительная стационарная фаза роста (рисунок 3.9).

**Аммонийная форма азота.** Для многих растительных организмов азот в аммонийной форме является предпочтительным. Для диатомовых наблюдается обратная картина, поскольку даже малые концентрации аммония в среде ингибируют рост культуры и приводят к гибели клеток [220].

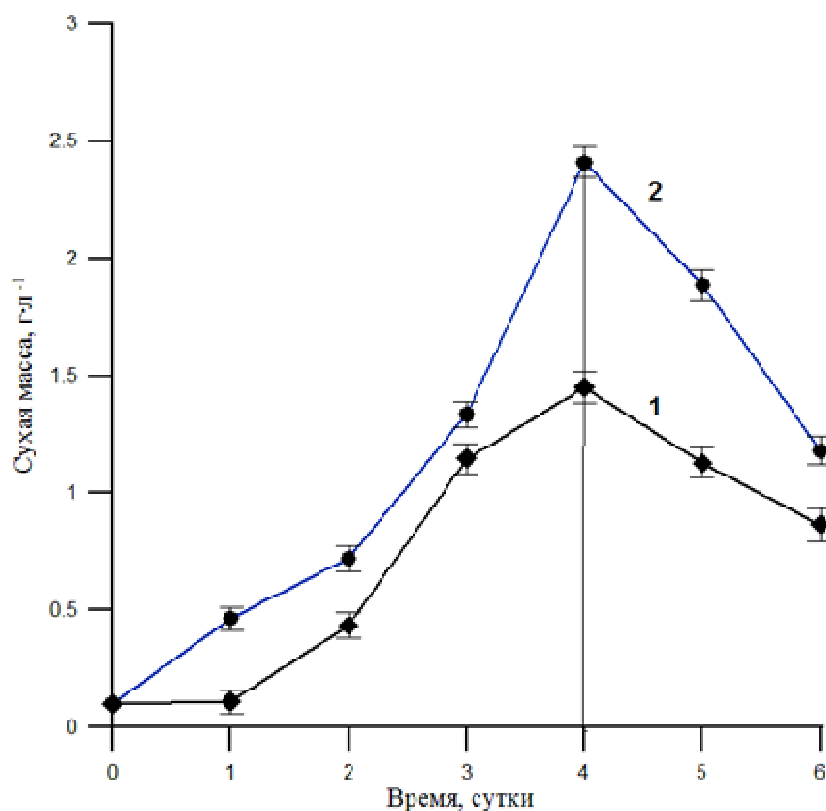


Рисунок 3.10 — Динамика плотности культуры *Cylandrotheca closterium* при использовании различных источников азота: 1 — нитрат натрия (вертикальная линия — время добавления нитрата аммония); 2 — мочеvine (вертикальная линия — время добавления сульфата аммония)

Показано, что добавление аммония в концентрации более  $20 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  в питательную среду во время активного роста *C. closterium* приводит к ингибированию всех процессов метаболизма и гибели культуры (рисунок 3.10). Аналогичные результаты получены в работе [220]. Отметим, что аммоний вызывает гибель клеток *C. closterium* даже при наличии в среде других форм азота.

Азот в аммонийной форме является важным ионом, поскольку включён во многие внутриклеточные процессы (рисунок 3.8). Аммоний, включаясь в глутаминсинтетазные циклы (GS)/(GOGAT), ассимилируется в аминокислоты [84]. В результате включения аммония в цикл мочевины, эндогенно синтезируется мочевины [64, 65]. Также аммоний играет важную роль во многих биохимических реакциях, протекающих в хлоропластах и митохондриях. Аммонийная форма азота является общим промежуточным продуктом для неорганического восстановления азота, а глутамин и глутамат являются первичными продуктами ассимиляции азота. Эти распространённые промежуточные соединения имеют важное значение для регулирования поглощения и ассимиляции азота посредством обратной связи от пулов продуктов и соотношения глутамина : глутамата [240].

Аммоний в клетку диатомовых проникает благодаря транспортерам подсемейства AMT1, которые являются каналоподобными белками. Они действуют как унипортеры  $\text{NH}_4^+$  или как ко-транспортеры  $\text{NH}_3/\text{H}^+$  [284, 240]. Транспортеры подсемейства AMT1 обладают высокой аффинностью (степенью сродства к аммонийной форме азота), но при достижении оптимальных концентраций аммония в цитозоле прекращают перенос и поглощение  $\text{NH}_4^+$  [240]. Данные транспортеры содержат 11 предполагаемых доменов ТМ и имеют общую эволюционную историю с семейством переносчиков  $\text{NH}_4^+$  зеленых водорослей – Rh- $\text{NH}_4^+$ -транспортеров. У *C. closterium* обнаружено восемь белков транспортеров AMT1 [240].

Токсичность аммония для *C. closterium* можно объяснить тем, что аммонийная форма азота подавляет активность NR, ингибирует работу

транспортёров нитрат- и нитрит-ионов в клетку. Если концентрация аммония превышает  $20 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ , то у диатомовых наблюдается низкая активность NR или её отсутствие из-за подавления синтеза NR на уровне экспрессии гена [79]. При малых концентрациях аммония в среде (менее  $20 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) диатомовые растут и вегетируют, но при такой обеспеченности клеток азотом получить плотную интенсивную культуру практически невозможно. Также важно отметить, что аммоний негативно влияет на каталитический центр кислород-выделяющего комплекса (КВК) фотосистемы 2 (ФС2) [220].

**Мочевина.** Анализ кривой роста, полученной при культивировании *C. closterium* с использованием мочевины в качестве единственного источника азота, показывает, что максимальная плотность культуры достигла своих расчетных величин и составила  $3,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  (рисунок 3.11). При этом максимальная продуктивность достигнута на третьи сутки культивирования ( $1,5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ).

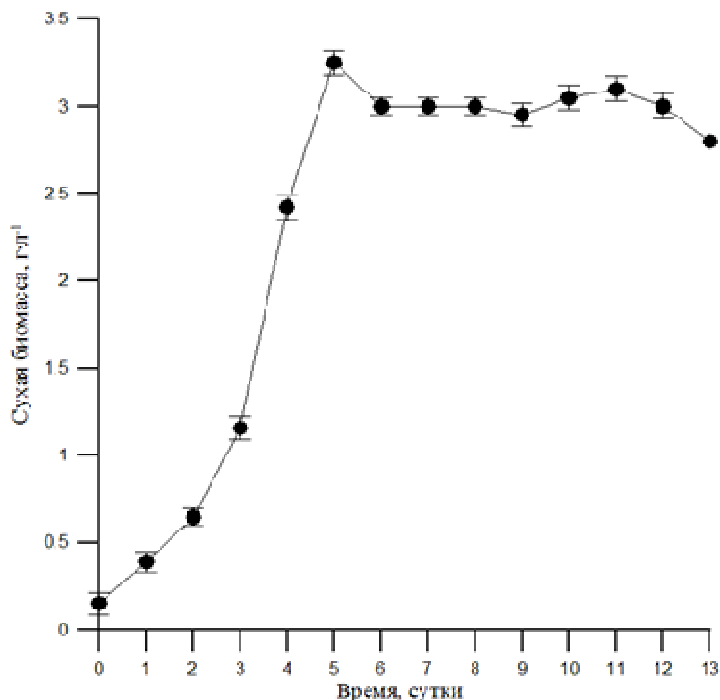


Рисунок 3.11 — Динамика плотности накопительной культуры *Cyldrotheca closterium* на среде RS при использовании мочевины в качестве источника азота

В отличие от других источников азота, в молекуле мочевины доля азота максимальна (46,6 %). Одна молекула мочевины включает в себя два атома азота. Кроме того, мочевина выступает в роли не только источника азота, но и углерода, и включается во все основные циклы метаболизма диатомовых водорослей [279]. Поэтому при использовании мочевины, как единственного источника азота, максимальная продуктивность культуры достигала  $1,5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ , при этом расход мочевины при получении 1 г сухой массы в два раза меньше, по сравнению с нитратом натрия.

*C. closterium* способна поглощать и накапливать мочевину и при этом расти и вегетировать с высокими удельными скоростями, так как её клетки имеют два высокоаффинных транспортера молекул мочевины: симпортер JGI\_Pt\_20424, расположенный во внешней мембране и симпортер JGI\_39772, расположенный в мембране митохондрий [65]. Транспортёр мочевины с высоким сродством JGI\_Pt\_20424, локализованный в клеточной мембране, содержит пятнадцать трансмембранных доменов и филогенетически гомологичен транспортеру мочевины растений DUR3. Транспортер мочевины JGI\_39772, локализованный в митохондриях, переносит молекулы мочевины в митохондрии, где мочевина может служить субстратом для уреазы.

Данный транспортер обеспечивает работу цикла мочевины. Образовавшаяся мочевина регулирует другие механизмы клеточного метаболизма, например катаболизм аминокислот, и служит осмолитом для клетки. Цикл мочевины соединен с циклами GS/GOGAT и трикарбоновых кислот за счет аспартат-аргинино-сукцинатного шунта [232]. Таким образом, ассимиляция мочевины не является лимитирующим звеном метаболизма *C. closterium*.

**Аминокислоты как источник азота.** Известно, что диатомовые водоросли способны поглощать и накапливать аминокислоты [92], но потребление отдельных аминокислот видоспецифично. У водорослей в стационарной фазе роста преобладают глицин и гистидин, в то время как аланин и пролин

превалируют при воздействии неблагоприятных факторов среды, когда в клетке начинают происходить окислительные процессы.

Клетки *C. closterium* не могут использовать аланин в качестве единственного источника азота. При её выращивании на среде, где источником азота был аланин, клетки культуры на второй-третий день погибали. Аланин синтезируется у *C. closterium* в достаточном количестве для нормального метаболизма, но из околочлеточной среды не поглощается [85]. В отличие от аланина, цистеин и аспарагин используются как субстрат для роста (рисунок 3.12).

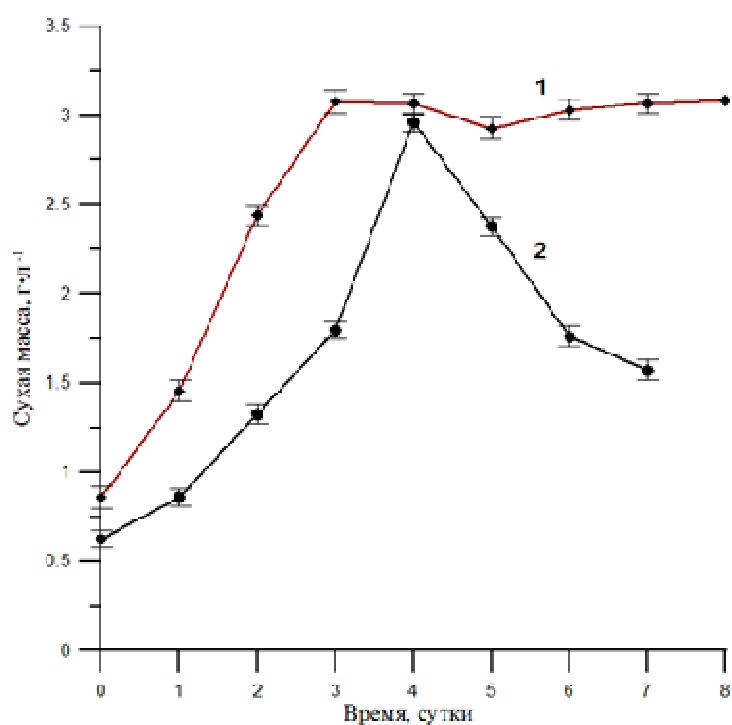


Рисунок 3.12 — Динамика плотности накопительной культуры диатомовой водоросли *Cyldrotheca closterium* на среде RS (N : P = 6) при использовании аминокислот в качестве источников азота: 1 – цистеин, 2 – аспарагин

Аспарагин в диатомовых водорослях синтезируется из аспартата двумя способами, используя либо глутамин, либо аммоний в качестве донора аминогруппы [85]. На рисунке 3.12 приведены данные по выращиванию *C.*

*closterium* на среде RS (N : P = 6) при использовании цистеина и аспарагина в качестве источников азота. Биогенные элементы в питательных средах рассчитаны на максимальную плотность культуры 3 г·л<sup>-1</sup>. Максимальная плотность культуры при использовании цистеина и аспарагина достигла расчетных величин и составила 3,1 г·л<sup>-1</sup>, максимальная продуктивность при использовании цистеина и аспарагина – 0,9 и 1,3 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>.

При использовании цистеина в качестве единственного источника азота в среде RS при соотношении азот : фосфор, равном шести, наблюдали продолжительную стационарную фазу. При использовании аспарагина стационарная фаза отсутствует. По-видимому, цистеин - углеводородный блок, может непосредственно включаться в метаболизм, а также накапливаться в клетке как дополнительный источник азота [85]. Продуктивность диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* при культивировании на различных источниках азота представлена в таблице 3.4.

Таблица 3.4 — Продуктивность диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* при культивировании на различных источниках азота.

Источники азота	Максимальная продуктивность, г·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>
Мочевина	1,5 ± 0,06
Нитраты	1,5 ± 0,05
Нитриты	1,0 ± 0,06
Цистеин	1,0 ± 0,07
Аспарагин	1,4 ± 0,07
Аланин	культура погибала

Продуктивность *C. closterium* достигла своих максимальных значений (1,5 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>) при использовании мочевины, нитрата натрия и аспарагина.

### 3.4.2 Углеродное питание. Эффективность фиксации углерода.

Оптимизируя процессы культивирования микроводорослей, необходимым условием является рациональное использование углерода [7]. Углерод, наряду с азотом, является основным компонентом в жизнедеятельности микроводорослей. Обеспеченность углеродом определяет химический состав клеток и скорость биосинтеза продуктов жизнедеятельности. Поэтому эффективность утилизации углерода является важной характеристикой объекта культивирования [216]. Диатомовые водоросли по сравнению с другими микроводорослями способны достаточно эффективно использовать углерод из водной среды, поскольку имеют множество углеродных транспортёров [199]. Однако эффективность фиксации углерода для многих видов диатомей в культуре по-прежнему неизвестна.

В интенсивной культуре, как дефицит, так и переизбыток углерода негативно влияют на рост и развитие микроводорослей. При дефиците  $\text{CO}_2$  прекращается фотосинтез, а при неограниченном обогащении  $\text{CO}_2$  происходит закисление среды, что негативно влияет на структурно-функциональное состояние клеточных мембран и активность ключевых ферментов водорослей [199]. Здесь необходимо учитывать устойчивость микроводорослей к низкому рН в воде. Таким образом, подбор оптимальной концентрации и способа подачи углерода в культуральную среду при отсутствии минерального и светового лимитирования является определяющим фактором для интенсивного культивирования микроводорослей. Цель данного раздела - оценить эффективность фиксации углерода в биомассе *C. closterium* в условиях накопительного культивирования.

Культуру выращивали в среде RS при постоянной температуре  $20 \pm 1$  °C в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объёмом 2 л, слоем 5 см, при круглосуточном освещении. Средняя облучённость рабочей поверхности фотобиореактора составляла  $150$  мкмоль квантов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (1,35 л на 1 л культуры). В качестве инокулята

использовали активно делящуюся культуру. Начальная плотность культуры в эксперименте составляла 0,1 – 0,2 г сухого вещества на 1 л. СНН анализ образцов биомассы выполняли на анализаторе Flash EA 1112 (Thermo Finnigan, Италия) в ЦКП Российского технологического университета (г. Москва). В качестве стандартов использовали сульфаниламид и ацетанилид.

На рисунке 3.13 представлена динамика плотности культуры *C. closterium*. Максимальная плотность культуры  $B_{max} = 3 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  отмечена на 6-й день эксперимента, а максимальный прирост –  $P_{max} = 1,254 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$  – на 5-й день. Оценим эффективность фиксации углерода в биомассе *C. closterium* в условиях накопительного культивирования.

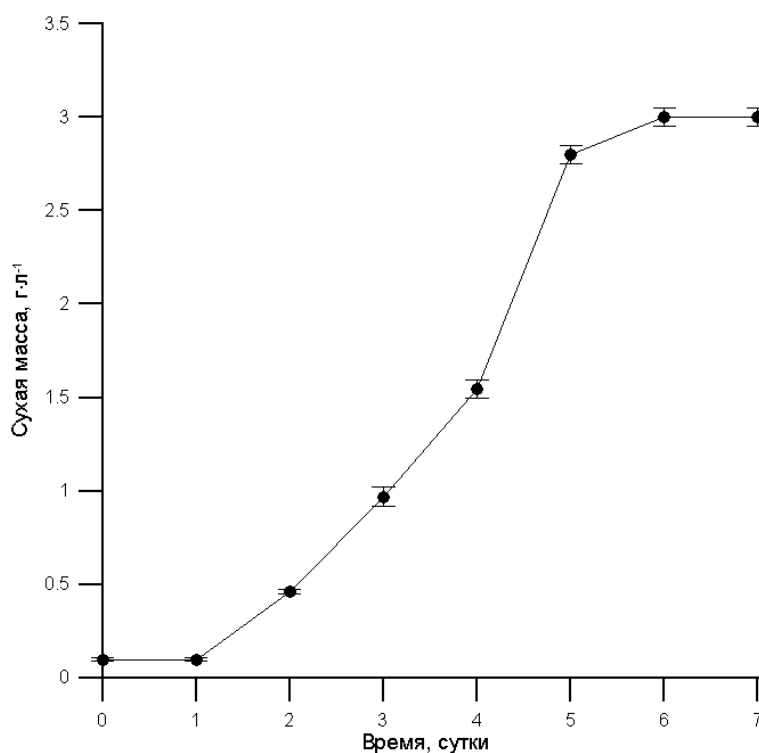


Рисунок 3.13 — Динамика плотности накопительной культуры диатомовой водоросли *Cyldrotheca closterium* на питательной среде RS [242]

Если рассматривается фиксация углерода только в биомассе (без учёта экзометаболитов), то скорость фиксации углерода ( $F^b_C$ ) определяется выражением:

$$F^{\bar{C}} = c \cdot P, \quad (3.1)$$

где  $c$  – доля углерода в биомассе;  $P$  – продуктивность,  $\text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ .

Эффективность фиксации углерода в биомассе микроводорослей – это отношение массы углерода, фиксируемого в биомассе к массе углерода, подаваемого в суспензию микроводорослей:

$$E^{\bar{C}} = F^{\bar{C}} / F_0 \cdot 100 \%, \quad (3.2)$$

где  $F^{\bar{C}}$  – скорость фиксации углерода в биомассе микроводорослей;  $F_0$  – плотность потока углерода на входе в суспензию клеток.

В том случае, когда для обеспечения культуры неорганическим углеродом используется  $\text{CO}_2$ , тогда с учётом (3.1) скорость фиксации углерода в биомассу ( $F^{\bar{C}\text{O}_2}$ ) представляется в виде:

$$F^{\bar{C}\text{O}_2} = M(\text{CO}_2) / M(\text{C}) \cdot F^{\bar{C}} = 44/12 \cdot c \cdot P, \quad (3.3)$$

где  $M(\text{CO}_2)$  и  $M(\text{C})$  – молярная масса углекислоты и углерода, г.

Из (3.1) и (3.3) следует предельное соотношение, указывающее на минимальную плотность потока  $\text{CO}_2$  ( $\text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ) для обеспечения заданной скорости роста биомассы:

$$F^{\bar{C}} = c \cdot P = M(\text{C}) / M(\text{CO}_2) \cdot F^{\bar{C}\text{O}_2}, \text{ т.е. } P = 0.273 / c \cdot F^{\bar{C}\text{O}_2} \quad (3.4)$$

Для тех случаев, когда в суспензию подаётся газоздушная смесь с заданным процентом  $\text{CO}_2$ , тогда выражение (3.4) преобразуется в формулу:

$$P = \frac{0,273}{c} \frac{M(\text{CO}_2)}{V_{\text{CO}_2}(T)} \frac{v}{100} 1440 F_{\text{ГВ}}^{\text{min}} \quad (3.5)$$

где  $V_{\text{CO}_2}(T)$  – молярный объём газа при заданной температуре,  $\text{л} \cdot \text{моль}^{-1}$ ;  $v$  – доля  $\text{CO}_2$  в газоздушной смеси, % об.;  $F_{\text{ГВ}}^{\text{min}}$  – минимальная плотность потока газоздушной смеси, необходимая для обеспечения заданной скорости роста микроводорослей,  $\text{л} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

Используя выражение (3.3) и (3.5), эффективность фиксации углерода в биомассе можно представить в виде:

$$E_c^b = \frac{c \cdot P}{0,273 \frac{M(\text{CO}_2)}{0,082T} v 1440 F_{\text{ГВ}}} 100\% , \quad (3.6)$$

где  $F_0$  – плотность потока газовой смеси на входе в суспензию, л·л<sup>-1</sup>·мин<sup>-1</sup>.

По результатам CHN-анализа доля углерода в сухой массе *C. closterium* составляла 23 %. Концентрация углекислоты в атмосфере по данным Всемирной метеорологической организации в 2018 г достигла 0,0405 % об. [11, 256]. Расчёт показал, что при барботаже культуры воздухом, содержащем 0,0405 % углекислоты, со скоростью 1,25 л воздуха в минуту на литр культуры за 4 суток в культуру поступило 0,93 г·л<sup>-1</sup> углерода. Если считать, что весь поступивший углерод преобразуется в биомассу, тогда с учётом доли углерода в биомассе (0,23), предельное значение прироста составит 3,4 г·л<sup>-1</sup>. За 4 суток прирост составил 3 г·л<sup>-1</sup>, следовательно, эффективность утилизации CO<sub>2</sub> равнялась 90 %.

Таким образом, по результатам эксперимента в накопительной культуре у *C. closterium* скорость фиксации углерода с 4-го по 5-й день равна  $F_c^b = 0,23 \cdot 1,254 = 0,29$  г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>, а эффективность фиксации углерода в биомассе:

$$E_c^b = \frac{0,23 \cdot 1,254}{0,273 \frac{44}{0,082 \cdot (273+19)} \frac{0,0405}{100} 1440 \cdot 1.1} 100\% \approx 90\% \quad (3.7)$$

Полученный результат указывает на то, что по сравнению с другими видами водорослей вид *C. closterium* характеризуется достаточно высокой эффективностью фиксации CO<sub>2</sub>. Например, у зелёных микроводорослей *Chlorella protothecoides* и *Ch. vulgaris* эффективность фиксации CO<sub>2</sub> составляет 20 % и 55,3 %, у цианобактерии *Spirulina* sp. – 38 % [166, 189], а у красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* – 69 % [22].

В заключение отметим, что для обеспечения прироста 1 г сухой биомассы *C. closterium* в сутки при температуре 19 °С необходимо затратить минимум 0,46 л CO<sub>2</sub>, или 1132 л воздуха в сутки. Возможно, именно высокая эффективность фиксации углерода, а также низкая доля углерода в биомассе *C. closterium* позволяет объяснить высокие продукционные показатели этого вида.

### 3.4.3 Интенсивная культура на питательной среде с гидрокарбонатом

В большинстве работ при культивировании микроводорослей, в частности диатомовых, в качестве основного и единственного источника углерода используют углекислый газ. Однако организация подачи диоксида углерода при промышленном культивировании является весьма сложной задачей, так как требуются дорогостоящие приборы за контролем концентрации  $\text{CO}_2$  в питательной среде. Наиболее простой способ обеспечения культуры углеродом при промышленном культивировании - добавление в среду бикарбоната натрия.

Известно, что диатомовые водоросли обладают достаточно эффективным углерод концентрирующим механизмом [199] и могут синтезировать десять карбоангидраз, принадлежащих к  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\theta$ - типам, которые расположены по всему пути транспорта неорганического углерода из окружающей среды в хлоропласт. Таким образом, диатомовые способны эффективно поглощать углерод в виде  $\text{CO}_2$ , путём свободной диффузии, а также в форме гидрокарбоната  $\text{HCO}_3^-$  за счет энергии АТФ.

Хотя давно известно, что диатомовые поглощают гидрокарбонаты [216, 237], во всех средах для культивирования микроводорослей в промышленных масштабах по-прежнему используется атмосферный или баллонный  $\text{CO}_2$  [178, 200]. В литературе отсутствуют сведения об адаптивной способности диатомовых водорослей к среде с большими концентрациями гидрокарбонатов и высокими величинами рН, а также нет сведений об использовании сред с гидрокарбонатами для интенсивного культивирования плотных культур.

Цель данного исследования – оценить возможность использования гидрокарбоната натрия для обеспечения *C. closterium* углеродом в условиях интенсивного культивирования без подачи  $\text{CO}_2$  в суспензию. Рассмотрим два случая, когда в качестве единственного источника углерода для диатомовой водоросли будет служить углекислый газ и единственным источником углерода – гидрокарбонат натрия. Отметим, что в литературе не найден способ получения интенсивной культуры без подачи  $\text{CO}_2$  в питательную среду.

*C. closterium* адаптировали к условиям интенсивного культивирования на люминоstate в течение 2-х недель. Культуру выращивали в режиме накопительного культивирования в колбе объёмом 1 л на среде RS, приготовленной на стерильной морской воде, при температуре  $20 \pm 1$  °C и круглосуточном освещении со средней облученностью рабочей поверхности 12 клк. В процессе адаптации культуру барботировали воздухом посредством компрессорной установки (0,5 л воздуха на 1 л культуры в мин).

*Первый этап.* По достижению плотности культуры в  $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  сухой массы часть объёма культуры центрифугировали (3 мин при 1450 g). Удалив надосадочную жидкость, к сырой биомассе добавили свежую среду RS, в которой предварительно растворили  $1,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  гидрокарбоната натрия. Полученную суспензию объёмом 1 л и плотностью  $1,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  поместили в колбу, установленную на магнитную мешалку. Площадь поверхности суспензии (раздела фаз) составила  $50 \text{ см}^2$ . На протяжении эксперимента культуру выращивали в накопительном режиме при скорости перемешивания 250 оборотов в мин. Экспериментальная установка показана на рисунке 3.14. Ежедневно определяли плотность культуры методом йодатной окисляемости и величину pH с точностью 0,01 посредством pH-контроллера Aqua Medic, снабженного комбинированным электродом.

*Второй этап.* На 4-й день эксперимента в культуру добавили 1 г  $\text{NaHCO}_3$  и 2 мл 0,1 Н соляной кислоты, чтобы снизить pH до 8,6. Динамика плотности культуры с расчетом биогенных элементов в питательной среде на максимальную плотность  $3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  и динамика изменения pH среды представлена на рисунке 3.15. Максимальная плотность *C. closterium* при культивировании на бикарбонате натрия без подачи углекислого газа достигла своих расчётных величин.



Рисунок 3.14 — Экспериментальная установка по культивированию *Cyindrotheca closterium* с использованием бикарбоната как единственного источника углерода

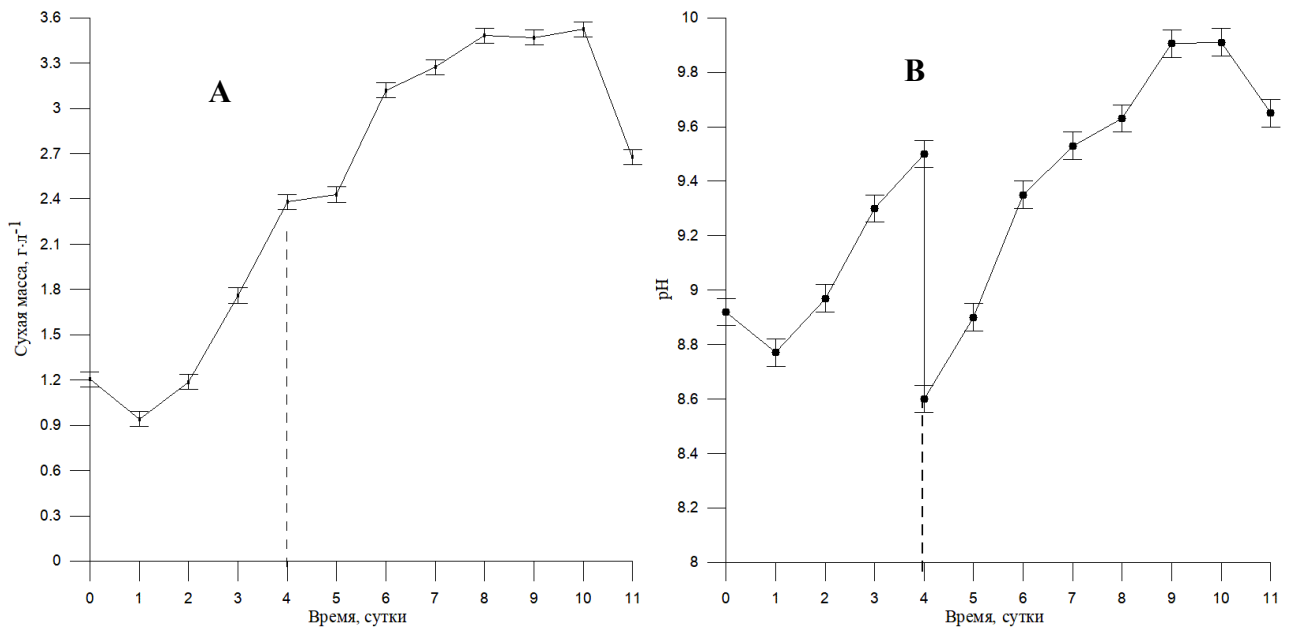


Рисунок 3.15 — Динамика плотности культуры *Cyindrotheca closterium* при использовании бикарбоната натрия в качестве единственного источника углерода (А) и динамика изменения pH (В). Пунктирная линия указывает момент добавления в культуру 1 г NaHCO<sub>3</sub> и снижения pH среды до 8,6

На первом этапе эксперимента культура в течение суток адаптировалась к питательной среде с гидрокарбонатом натрия, при этом часть клеток погибла, о чем свидетельствует снижение плотности культуры до  $0,9 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  и рН среды до 8,77. Со 2-го дня эксперимента отмечен интенсивный рост с максимальной продуктивностью  $0,6 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ . Активному росту сопутствовало значительное повышение рН среды, т. е. клетки активно ассимилировали углерод в форме  $\text{HCO}_3^-$ . При достижении рН среды 9,4 рост культуры замедлился.

На втором этапе эксперимента после добавления в активно растущую культуру  $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  гидрокарбоната натрия и 2 мл 0,1 Н НСl отмечено снижение рН до 8,6, а также снижение скорости роста практически до нуля. Судя по скорости повышения рН среды за время адаптации, культура активно поглощала гидрокарбонат-ионы (рисунок 3.15). После адаптации отмечен активный рост культуры с продуктивностью  $0,7 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ , который также сопровождался высокой скоростью защелачивания среды. При достижении рН среды 9,4 рост культуры снова замедлился и при рН = 9,9 полностью прекратился. Спустя сутки культура переходила в фазу отмирания.

Из динамики накопления биомассы видно, что в процессе культивирования *C. closterium* с использованием бикарбонатов при достижении рН значения 9,4 рост водоросли замедляется. Лимитирующим фактором в данном случае является только концентрация гидрокарбонатов в питательной среде, другие биогенные элементы присутствуют в избытке. Следовательно, можно предположить, что при достижении рН 9,4 равновесие смещается в сторону карбонатов, которые не способны усваиваться *C. closterium*. Лимитирующим фактором, замедляющим рост, становится углерод. При добавлении в питательную среду на пятые сутки 2 мл 0,1 Н соляной кислоты рН уменьшается с 9,5 до 8,6 и карбонатное равновесие смещается в сторону гидрокарбонатов, что снимает углеродное лимитирование. Углерод становится снова доступен для водоросли и рост культуры возобновляется. *C. closterium* достигает своей максимальной плотности  $3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ .

Таким образом, показана способность *C. closterium* усваивать бикарбонаты, за счёт чего наблюдается её активный рост без дополнительной подачи CO<sub>2</sub>. Использование бикарбонатов в средах для микроводорослей в значительной степени упрощает процесс культивирования в промышленных масштабах.

Использование бикарбоната в качестве единственного источника углерода для выращивания *C. closterium* способствует ещё большему защелачиванию среды во время её активного роста (рН достигает 10). Это может привести к гибели культуры, с другой стороны, добавление бикарбонатов в питательную среду приводит к увеличению буферности системы, что исключает резкие изменения рН и большие потери углерода. Следовательно, при использовании CO<sub>2</sub> как источника углерода следует в среду добавлять бикарбонаты, так как углекислый газ способен улетучиваться из среды и использование CO<sub>2</sub> в качестве единственного источника углерода обуславливает большие потери углерода. Отсюда следует, что наилучший способ выращивания *C. closterium* - совместное использование CO<sub>2</sub> и бикарбонатов.

Оценим предельный урожай, полученный на среде с гидрокарбонатом натрия. Когда биогенный элемент из растворённой неорганической соли полностью преобразуется в органическую массу, причём потери, связанные с синтезом экзометаболитов отсутствуют, максимально возможный урожай ( $B_{MAX}$ ) составит:

$$B_{MAX} = \frac{1}{Y_S} \times \frac{M(S)}{M(SX)} \times m(SX), \quad (3.8)$$

где  $Y_S$  – доля биогенного элемента в биомассе;  $M(S)$  и  $M(SX)$  – молярная масса биогенного элемента и соли, содержащей биогенный элемент, г·моль<sup>-1</sup>;  $m(SX)$  – масса соли, растворённой в питательной среде, г·л<sup>-1</sup>.

Углерод в биомассе многих видов микроводорослей составляет примерно 50 % [66]. Однако из-за большой доли зольного остатка в биомассе у бентосных диатомовых водорослей эта величина колеблется в значительных пределах [87, 97]. Будем считать, что углерод органической части биомассы *C. closterium*

составляет 50 %, тогда с учётом доли зольного остатка у микроводорослей выражение (3.8) принимает вид:

$$B_{MAX} = \frac{1}{1-z} \times \frac{1}{Y_C^{OPT}} \times \frac{M(C)}{M(NaHCO_3)} \times m(NaHCO_3), \quad (3.9)$$

где  $z$  – доля зольного остатка в биомассе;  $Y_C^{OPT}$  – доля углерода в органической части биомассы;  $M(C)$  и  $M(NaHCO_3)$  – молярная масса углерода и гидрокарбоната натрия, г·моль<sup>-1</sup>;  $m(NaHCO_3)$  – масса гидрокарбоната натрия, растворённого в питательной среде, г·л<sup>-1</sup>.

По нашим данным доля зольного остатка в биомассе *C. closterium* составляет 33 % [6], навеска NaHCO<sub>3</sub>, растворённая в среде, – 1,2 г·л<sup>-1</sup>. Следовательно, подставляя эти значения в (3.9), максимальный прирост биомассы составляет  $B_{MAX} = 0,5$  г·л<sup>-1</sup>. Если учесть углерод (суммарный углерод в форме HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> и CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), содержащийся в черноморской воде, концентрация которого достигает 0,007 г·л<sup>-1</sup> [50], то максимальное значение прироста составит  $B_{MAX} = 0,533$  г·л<sup>-1</sup>.

В эксперименте за 4 суток урожай составил 1,2 г·л<sup>-1</sup>, что более чем в два раза превышает предельную оценку. С другой стороны, в среду добавлено 1,2 г NaHCO<sub>3</sub>, но, если в эксперименте прирост составил 1,2 г·л<sup>-1</sup>, то с учётом углерода в воде должно быть затрачено минимум 2,76 г NaHCO<sub>3</sub>. Это следует из того, что в 1,2 г биомассы органическая часть составляет 0,8 г, доля углерода в органической части – 0,4 г, а доля углерода в NaHCO<sub>3</sub> – 14,3 %.

Кроме того, в среде при pH более 8,4 из-за гидролиза гидрокарбонат-ионов :



равновесие (3.10) смещено в сторону образования CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> [52, 57]. В среде при высоких значениях pH часть углерода находится в недоступной для фотосинтеза форме [19, 153]. Следовательно, заведомо не весь углерод из соли NaHCO<sub>3</sub>, растворённой в среде поглотился клетками для фотосинтеза, часть углерода в карбонатной форме осталось в питательной среде.

Оценим количество NaHCO<sub>3</sub>, которое необходимо затратить для прироста 1,2 г биомассы при pH среды более 8,4. Известно, что клетки фототрофов при

поглощении 1 моля гидрокарбонат-ионов для фотосинтеза, в среду выделяют 1 моль гидроксид-ионов  $\text{OH}^-$  [152, 153]. Это приводит к смещению равновесия (3.10) вправо и образованию 1 моля карбонат-ионов  $\text{CO}_3^{2-}$ . Таким образом, убыль  $\text{HCO}_3^-$  в среде связана не только с изъятием гидрокарбонат-ионов клетками для фотосинтеза, но и с образованием в среде карбонат-ионов. Поэтому, чтобы получить 1,2 г биомассы необходимо затратить минимум 5,6 г  $\text{NaHCO}_3$ , что более чем в 4 раз превышает навеску гидрокарбоната натрия, растворённого в среде.

Такое явное несоответствие можно объяснить растворением атмосферного  $\text{CO}_2$  в питательной среде. Несмотря на то, что удельная поверхность раздела фаз в эксперименте была небольшой, скорость растворения углекислоты в среде достаточна для интенсивного роста водоросли. Со 2-го по 4 день эксперимента прирост составил  $1,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  биомассы (см. рис. 3.15А). 1,2 г сухой биомассы *C. closterium* содержит 0,4 г органического углерода. В среду было внесено  $0,17 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  углерода. Следовательно, за 2-е суток в среде растворилось минимум  $0,23 \text{ г}$  углерода или  $0,42 \text{ г} \text{ CO}_2 \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ .

#### 3.4.4 Оптимизация температуры

Известно, что скорость роста водорослей зависит от температуры, так как она влияет на скорость фотосинтетического транспорта электронов и световых реакций фотосинтеза [286]. Поэтому важно знать оптимальную температуру для получения максимальной продуктивности культуры при её выращивании.

Водоросли различаются по пределам термотолерантности. Многие виды диатомовых способны выживать и вегетировать в ледниках при  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , например, антарктические или арктические диатомовые, но нет водорослей, которые были бы способны выживать при температурах  $35 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$  [76, 209]. Способность диатомей расти при низких температурах можно объяснить тем, что диатомовые не содержат крахмал, а вместо него синтезируют и накапливают хризоламинарин [148]. Основной углевод, который при низких температурах не превращается в кристаллы, что дает возможность расти и вегетировать диатомеям при низких

температурах. Также необходимо отметить, что диатомовые при низких температурах синтезируют липиды, за счет чего увеличивается текучесть мембран и мембрана продолжает выполнять свои биологические функции.

С целью определения оптимальной температуры для роста и развития *C. closterium* выбран температурный диапазон от 0 °С до 35 °С. Культуру помещали в термощкаф и выращивали при различных режимах. Температуру изменяли в диапазоне с интервалом 5 °С. *C. closterium* выращивали на среде RS, в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах при круглосуточном освещении 5 клк. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом посредством компрессорной установки. В качестве инокулята использовали активно делящуюся культуру. На рисунке 3.16 представлена зависимость максимальной продуктивности *C. closterium* от температуры.

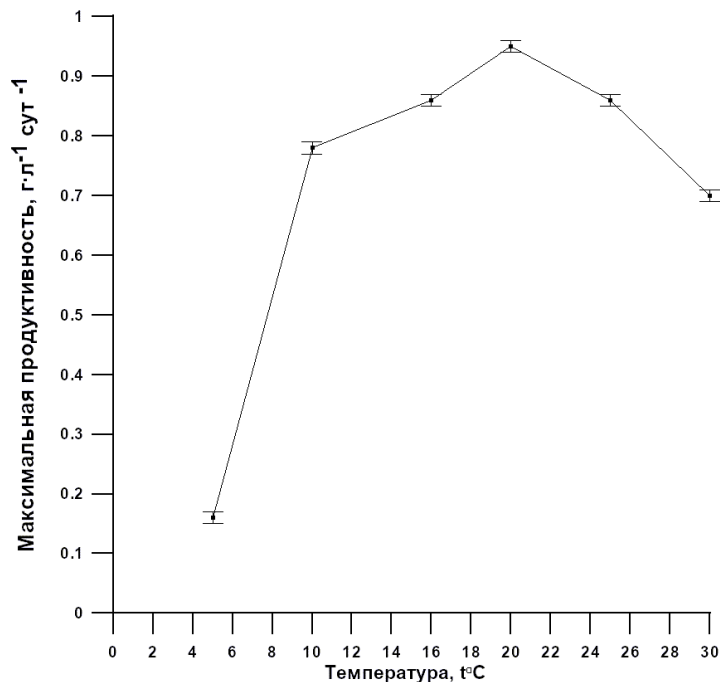


Рисунок 3.16 — Зависимость максимальной продуктивности накопительной культуры *Cylindrotheca closterium* от температуры

Установлено, что *C. closterium* способная выживать и вегетировать в диапазоне температур от 5 до 30 °С. При 5 и 30 °С зафиксированы минимальные значения продуктивности культуры: при температуре 5 °С продуктивность культуры достигала 0,15 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>, а при 30 °С – 0,65 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. Гибель культуры наступает при температуре ниже 5 °С и выше 35 °С. Оптимальная температура для роста и развития *C. closterium* – 19-20 °С (рисунок 3.16). При данной температуре зафиксированы максимальная скорость роста и продуктивность культуры. Как при низких температурах, так и при высоких у накопительных кривых практически отсутствовала стационарная фаза роста. Длительная стационарная фаза отмечена при оптимальной для роста температуре в диапазоне 18-20 °С.

#### 3.4.5 Оптимизация интенсивности освещения

Известно, что продукционные характеристики любых микроводорослей сильно зависят от поверхностной освещенности [233]. Высокая интенсивность освещения может разрушать фотосистемы микроводорослей и приводить к гибели культуры, низкая интенсивность освещения может замедлять процессы роста и развития водорослей [260]. Поэтому нами была поставлена цель определить оптимальную интенсивность освещения для роста и развития *C. closterium* при отсутствии лимитирования по биогенным элементам и углеродному питанию. Известно, что диатомовые, особенно бентосные, способны эффективно утилизировать и использовать световую энергию [233, 260], так как многие виды водорослей обитают на глубине более 20 м. Многие диатомовые водоросли способны расти и вегетировать при интенсивности света 2-3 клк.

Для определения оптимальной интенсивности света для роста и развития *C. closterium* использована установка, показанная на рисунке 3.17, и разные световые режимы: 6; 18; 25; 33 и 40 клк. Культуру выращивали на среде RS, все компоненты которой увеличены в 3 раза, при температуре суспензии 18 ± 1 °С, в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах с рабочим объёмом 2 л, при освещении белыми люминесцентными лампами.

На рисунке 3.18 представлена динамика плотности культуры *C. closterium* при различных режимах освещения. При интенсивности освещения 18 клк и 6 клк наблюдается продолжительная стационарная фаза роста, что свидетельствует об эффективной работе фотосистем. При освещённости 6 клк замедляются процессы роста и развития *C. closterium*, так как её максимальная продуктивность составляет  $0,7 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ . При интенсивности освещения 25 клк стационарная фаза составляет 1 сутки, фаза отмирания наступает на 7-е сутки.



Рисунок 3.17 — Лабораторная установка с односторонним и двухсторонним освещением для исследования влияния интенсивности света на продукционные характеристики культуры *Cylindrotheca closterium*

Данный факт свидетельствует о том, что интенсивность освещения уже начинает оказывать ингибирующее действие на активность фотосистемы и процессы фотосинтеза.

При интенсивности освещения 33 клк стационарная фаза не зарегистрирована, в фазу отмирания культура переходила на 6-е сутки. Следовательно, освещённость выше 33 клк будет приводить к процессам деструкции фотосистем и гибели культуры. При интенсивности освещения 40 клк культура погибала. Таким образом, самая высокая продуктивность *C. closterium*

наблюдается при 18 клк и составляет  $1,76 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ . Освещённость выше 18 клк проявляет угнетающее воздействие на рост и развитие микроводоросли и максимальная продуктивность существенно снижается. При 33 клк максимальная продуктивность культуры составляет  $1,1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ .

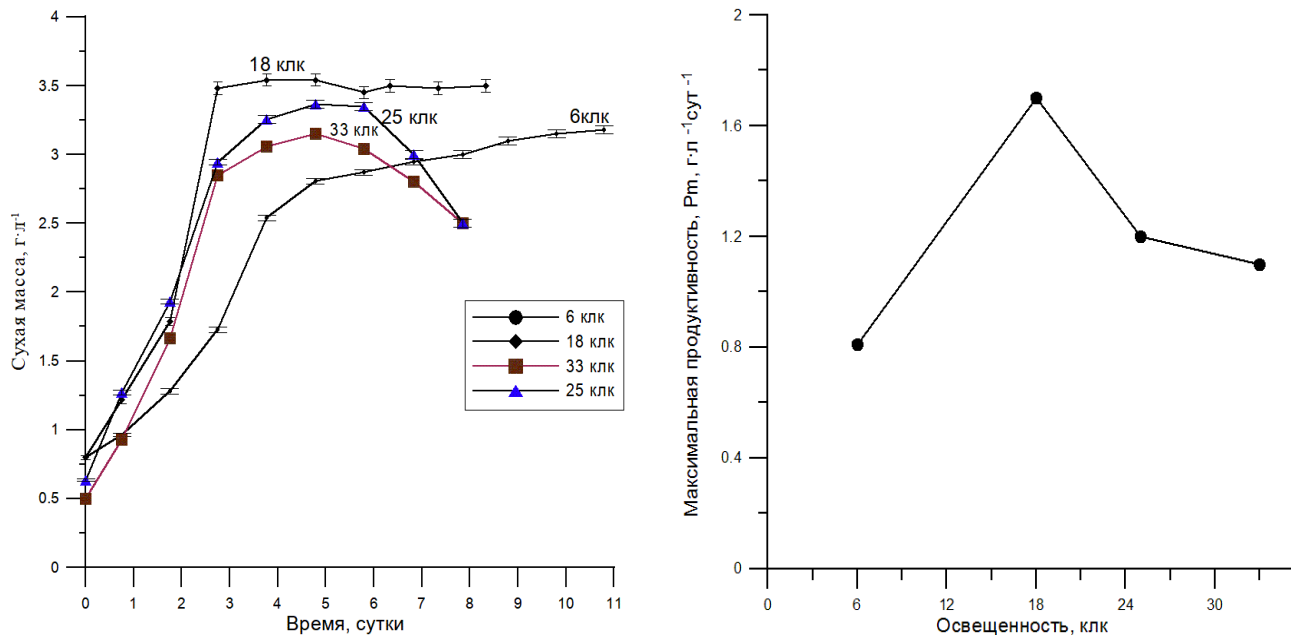


Рисунок 3.18 — Динамика плотности культуры при различной освещенности (слева). Зависимость максимальной продуктивности накопительной культуры *Cylindrotheca closterium* от облученности рабочей поверхности (справа)

### 3.5 Продукционные характеристики культуры в двухступенчатом проточном хемостате

Известно, что многие ценные вещества диатомовые накапливают в стрессовых условиях, например при лимитировании роста биогенными элементами. Для этой цели разработаны различные способы двухстадийного накопительного культивирования диатомовых, когда на первом этапе происходит накопление биомассы, а на втором – накопление, например, каротиноидов [105, 121]. Однако недостатком двухстадийного накопительного культивирования является гибель части клеток на втором этапе при создании стрессовых условий,

что снижает эффективность получения целевого продукта [71, 190, 211, 264]. Перспективной альтернативой двухстадийному методу накопительной культуры является проточная культура, в частности двухступенчатый хемостат с равной или различной удельной скоростью протока для каждой ступени.

Теория хемостата разработана для непрерывных культур гетеротрофных микроорганизмов во второй половине 20-го века и детально изложена в работах [29, 34, 142, 201, 203]. В ряде случаев она применима и для низших фототрофов. Но в связи с тем, что для роста фототрофов необходима световая энергия, которая наравне с биогенными элементами может лимитировать рост клеток, для фототрофов теория хемостата требует поправок и уточнений. Особенно для плотных культур, когда накопительная кривая характеризуется наличием не только экспоненциальной фазы роста, но и продолжительной фазой замедления роста (фаза отрицательного ускорения роста). Особо следует отметить необходимость существенных дополнений и изменений в теории хемостата при использовании естественного освещения, когда в течение суток наблюдается смена лимитирующего рост фактора. А также, когда организация непрерывного протока питательной среды затруднительна или нецелесообразна.

Для учёта периодичности изменения облучённости культуры часто используется культура с периодическим разбавлением (квазинепрерывная культура). Следует отметить, что метод квазинепрерывного культивирования является некоторым обобщением различных способов проточного культивирования микроорганизмов, однако работы, посвященные моделированию прессов в квазинепрерывной культуре, встречаются достаточно редко [53, 56]. Данные об интенсивной культуре бентосных микроводорослей немногочисленны [291]. Также практически отсутствует описание роста бентосных диатомей в проточной культуре. Среди бентосных диатомовых для интенсивного культивирования в промышленных масштабах наибольшее внимание привлекает *C. closterium* [7, 274]. Поэтому актуальной задачей является исследовать продукционные характеристики квазинепрерывной культуры *C. closterium* в

двухступенчатом хемостате.

Культуру *C. closterium* адаптировали к питательной среде RS [42] и условиям интенсивного культивирования в течение 2 недель. Адаптированную культуру осаждали центрифугированием, затем удаляли надосадочную жидкость, а сырую массу водорослей использовали в качестве инокулята для исследования продукционных характеристик культуры. В работе с хемостатом использовали питательную среду RS, приготовленную на стерильной морской воде, с увеличенной концентрацией каждого компонента в 3 раза. Продукционные характеристики *C. closterium* исследовали при оптимальных световых условиях, температуре и обеспеченности биогенными элементами. Хемостатная установка для культивирования *C. closterium* (рисунок 3.19) состояла из двух стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа объемом 3 л с рабочей толщиной 5 см. Объем суспензии в каждом реакторе составлял 2 л.

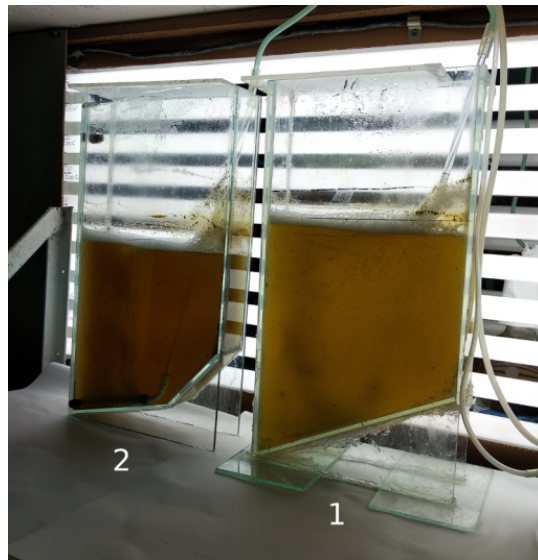


Рисунок 3.19 — Культура *Cylandrotheca closterium* в двухступенчатом хемостате.

1 – первая ступень, 2 – вторая ступень хемостата

Эксперимент проводили с равномерным круглосуточным односторонним освещением фотобиореакторов. В качестве источника освещения использовали

люминесцентные лампы CE-PIL-1-LF 46W/54-765, которые на рабочей поверхности каждого фотобиореактора давали в среднем 150 мкмоль квантов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> (33 Вт·м<sup>-2</sup>). Температуру суспензии водорослей поддерживали на постоянном уровне 20 ± 1 °С. Для обеспечения клеток углеродом культуру в обоих фотобиореакторах барботировали воздухом (1,2 л воздуха на 1 л культуры в мин). Для увеличения растворимости СО<sub>2</sub> в культуральной среде подачу воздуха в суспензию осуществляли через насадку-диспергатор.

На первом этапе эксперимента культуру выращивали в накопительном режиме, на втором – в квазинепрерывном. Пропорциональнопроточное квазинепрерывное культивирование *C. closterium* осуществляли в однопоточном режиме следующим образом: 1) ежедневно из второго фотобиореактора (2-я ступень хемостата) изымали часть рабочего объёма на урожай; 2) из первого фотобиореактора (1-я ступень хемостата) изымали такую же часть рабочего объёма и переносили во второй фотобиореактор, восстанавливая таким образом рабочий объём во втором фотобиореакторе; 3) рабочий объём в первом фотобиореакторе восстанавливали, добавляя свежую питательную среду. Процедуру разбавления культуры осуществляли ежедневно.

После накопительного культивирования на 6-ой день эксперимента культуру выращивали в квазинепрерывном режиме со скоростью потока питательной среды через рабочий объём суспензии 0,6 л·сут<sup>-1</sup> (скорость разбавления или удельная скорость потока  $\omega = 0,3 \text{ сут}^{-1}$ ). С 17 по 27 день удельная скорость потока составляла 0,1 сут<sup>-1</sup>, с 27 по 35-й день – 0,5 сут<sup>-1</sup>, с 35 по 40-й – 0,7 сут<sup>-1</sup> и с 40 по 44-й день – 0,9 сут<sup>-1</sup>. Для определения плотности культуры использовали два метода: 1) метод йодатной окисляемости [6] и 2) прямое взвешивание сырой массы в пробирках на аналитических весах с погрешностью 0,1 мг после осаждения клеток центрифугированием (1600 g в течение 2 мин). Для пересчёта полученных данных на сухую массу использовали коэффициент связи между сухой и сырой массой ( $k = 0,1$ ;  $n = 20$ ).

Динамика плотности культуры *C. closterium* в накопительном и проточном режиме культивирования представлена на рисунке 3.20. Поскольку в эксперименте использовали адаптированную культуру, лаг-фазу у накопительной кривой не наблюдали. Экспоненциальная фаза роста длилась 4 суток. В стационарной фазе в течение 3 дней плотность культуры оставалась практически неизменной. При переходе к квазинепрерывному режиму наблюдались быстрая адаптация к условия проточного культивирования. При изменении удельной скорости потока переходные процессы непродолжительны (не более 2-3 суток), значение плотности культуры достаточно быстро достигало нового стационарного динамического равновесия.

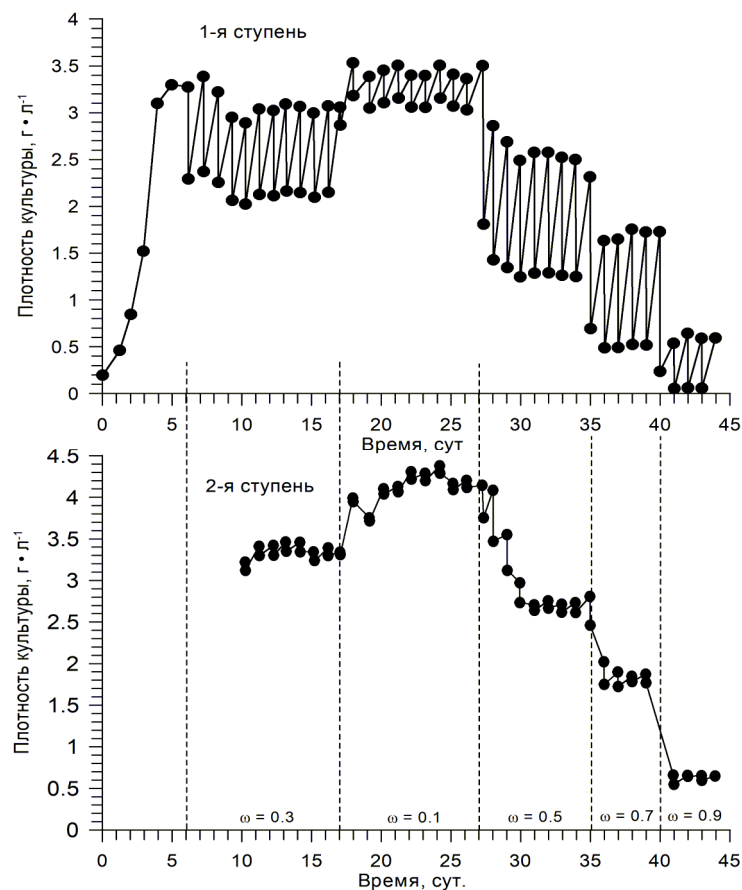


Рисунок 3.20 — Динамика плотности культуры *C. closterium* в накопительном режиме культивирования и в двухступенчатом хемостатае при различной скорости потока питательной среды (границы указаны пунктиром)

Следует заметить, что и в 1-й, и во 2-й ступени хемостата при удельной скорости протока  $0,1 \text{ сут}^{-1}$  наблюдалась незначительная агглютинация клеток, которая приводила к трудностям отбора проб для измерения плотности культуры и увеличению разброса данных. В обеих ступенях хемостата практически при любой скорости протока клетки равномерно распределялись по всему рабочему объёму. При удельной скорости, равной  $0,9 \text{ сут}^{-1}$ , скорость барботажа воздуха для перемешивания культуры было недостаточно. Даже после перемешивания культуры ручной мешалкой вся биомасса достаточно быстро оседала на дно или стенки фотобioreактора. Отмечен пристеночный рост культуры.

В начале накопительного культивирования при внесении инокулята в среду плотность культуры составила  $B_0 = 0,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ . У накопительной культуры лаг-фаза не наблюдалась, поскольку по условиям эксперимента использовали адаптированную ранее культуру. Экспоненциальная фаза накопительной кривой характеризовалась постоянной удельной скоростью роста ( $\mu_m$ ) и с высокой точностью ( $R^2=0,99$ ) описывалась уравнением (рисунок 3.21):

$$\ln B = \mu(t-t_0) + \ln B_0, \quad \mu = 0,72 \text{ сут}^{-1} \quad (3.11)$$

где  $\ln B_0 = -1,63$  – логарифм плотности культуры в начальный момент времени.

Время удвоения биомассы в экспоненциальной фазе роста ( $t_d$ ) составило:

$$t_d = \ln 2 \frac{t-t_0}{\ln B - \ln B_0} = \frac{\ln 2}{\mu} = 0,963 \text{ сут} \quad (3.12)$$

Обратное время удвоения (рисунок 3.21):

$$\log_2 B = \frac{1}{t_d} (t-t_0) + \log_2 B_0, \quad \frac{1}{t_d} = \frac{\mu}{\ln 2} = 1,038 \text{ сут}^{-1} \quad (3.13)$$

На четвёртый день эксперимента культура достигла стационарной фазы роста. В стационарной фазе роста плотность культуры оставалась неизменной  $B_m = 3,3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  до момента перехода к квазинепрерывному режиму культивирования (рисунок 3.20). За 4 дня накопительного культивирования урожай составил:  $B_m - B_0 = 3,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ . То есть, средняя продуктивность накопительной культуры  $P_{cp} = 0,775 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ .

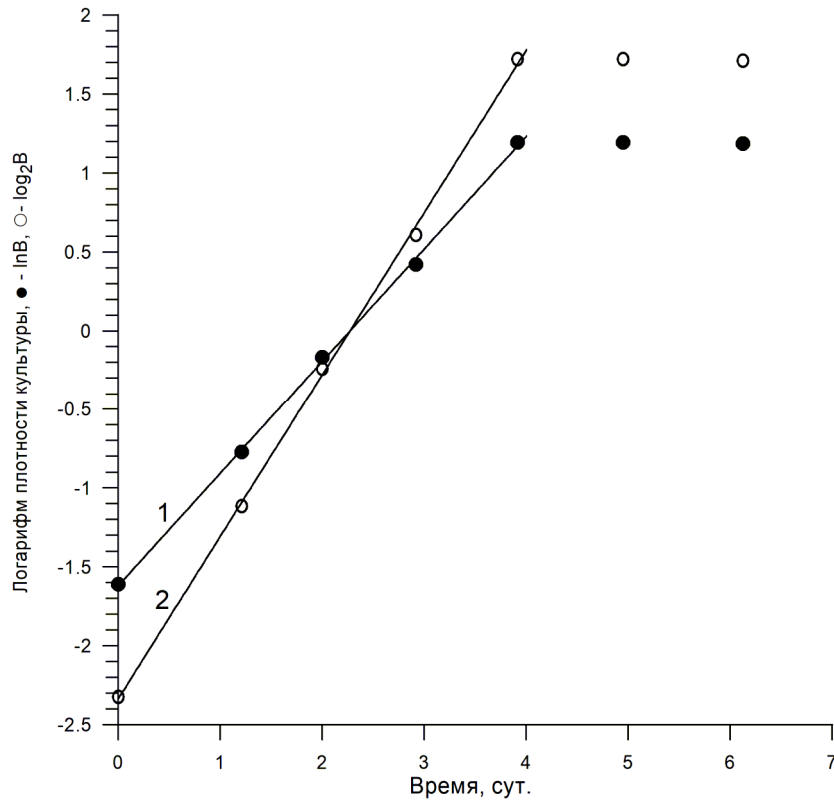


Рисунок 3.21 — Динамика плотности культуры *Cyindrotheca closterium* в накопительном режиме культивирования. 1 – аппроксимация экспериментальных точек уравнением (3.11),  $R^2 = 0,99$ . Удельная скорость роста  $\mu = 0,72 \text{ сут}^{-1}$ ; 2 – аппроксимация экспериментальных точек уравнением (3.13),  $R^2 = 0,99$ . Обратное время удвоения биомассы  $1/t_d = 1,038 \text{ сут}^{-1}$

Количественные потребности в биогенных элементах активно растущей культуры *C. closterium* экспериментально определены нами ранее [15]. На основе этих данных рассчитаны экономические коэффициенты ( $Y_{\text{эк}}$ ) для некоторых биогенных элементов (таблица 3.5):

$$Y_{\text{эк}} = \frac{1}{Y_{\text{п}}} \quad (3.14)$$

где  $Y_{\text{п}}$  – наблюдаемая потребность в биогенном элементе.

Для нахождения зависимости удельной скорости роста *C. closterium* от концентрации лимитирующего субстрата в питательной среде по данным из работы [14] рассчитывали константу насыщения ( $K_s$ ).

Таблица 3.5 — Наблюдаемые потребности некоторых биогенных элементов для *Cylindrotheca closterium* в накопительной культуре ( $Y_p$ ) и расчётные значения экономических коэффициентов ( $Y_{эк}$ ).

№	Биогенный элемент	$Y_p, \text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$	$Y_{эк}, \text{г} \cdot \text{г}^{-1}$
1	Азот	$64,00 \pm 1,00$	15,6
2	Кремний	$38,20 \pm 0,01$	26,2
3	Фосфор	$16,60 \pm 1,00$	60,3
4	Железо	$45,00 \pm 0,20$	22,2

Анализируя состав и соотношения биогенных элементов в среде F, а также соотношения потребностей для *C. closterium* (таблицы 3.5), можно утверждать, что при культивировании диатомеи на среде F, как это сделано в работе [14], лимитирующим рост фактором является концентрация кремния в питательной среде. Поэтому рассчитаем константу насыщения для кремния (рисунок 3.22). Расчёт выполнен по уравнению (5) из [14]:

$$P = P_m \frac{S}{K_S + S} = 1,81 \frac{S}{0,028 + S}; \quad \mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} = \mu_m \frac{S}{0,028 + S}, \quad (3.15)$$

где S – концентрация лимитирующего субстрата в питательной среде,  $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$ .

Рост накопительной культуры *C. closterium* с высокой точностью описывается экспоненциальным уравнением (рисунок 3.22), поэтому можно считать, что смены лимитирующих факторов не происходило, а рост клеток практически не ограничивался световыми условиями. Следовательно, для вывода уравнений динамики плотности квазинепрерывной культуры можно использовать подход, используемый для разработки теории хемостата для гетеротрофных микроорганизмов.

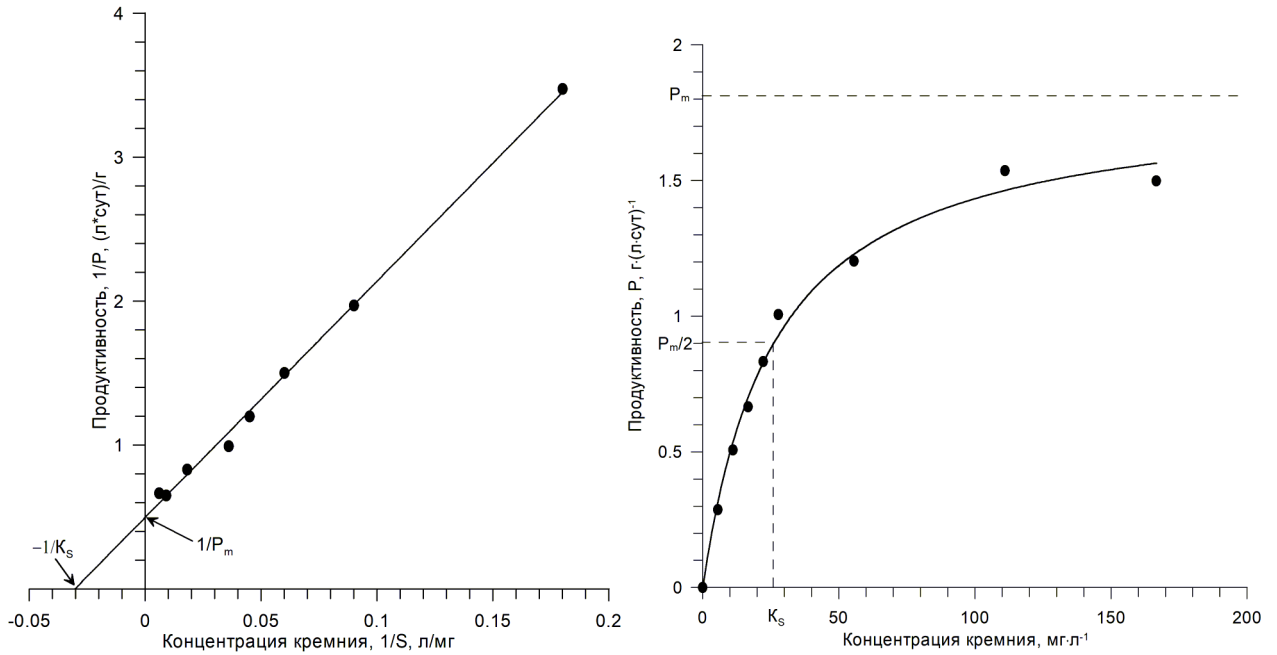


Рисунок 3.22 — Зависимость скорости роста культуры *Cylindrotheca closterium* от концентрации кремния в питательной среде,  $P_m = 1,81 \text{ г·л}^{-1}·\text{сут}^{-1}$ ;  $K_S = 28 \text{ мг·л}^{-1}$

Рассмотрим квазинепрерывную культуру в однопоточном многоступенчатом хемостате с одинаковым рабочим объёмом  $V$  (л) в каждой ступени и неизменным объёмом  $w$  (л), который удаляется из каждой ступени при процедуре обмена. Отношение массы водорослей в  $i$ -й ступени хемостата  $m_i$  (г) к рабочему объёму определяет текущую плотность культуры в данной ступени:

$$B_i = \frac{m_i}{V} \quad (3.16)$$

В результате процедуры обмена из  $i$ -й ступени хемостата удаляется объём  $w$ , в котором содержится масса водорослей  $m_i^*$ . В оставшемся объёме  $(V - w)$  содержится масса водорослей  $m_i^{**}$ . Следовательно, можно записать равенства:

$$m_i = m_i^* + m_i^{**}; m_i^* = w \cdot B_i; m_i^{**} = V \cdot B_i - w \cdot B_i = (V - w) \cdot B_i \quad (3.17)$$

В многоступенчатом хемостате после удаления объёма  $w$  в  $i$ -ю ступень поступает такой же объём суспензии из предыдущей ступени, поэтому плотность культуры в  $i$ -й ступени после обмена ( $B_i^{(-)}$ ) будет равна:

$$B_i^{(-)} = \frac{m_{i-1}^* + m_i^{**}}{V} = \frac{w \cdot B_{i-1} + (V-w) \cdot B_i}{V}, \quad (3.18)$$

где  $m_{i-1}^*$  – масса водорослей из предыдущей ступени, которая вносится в текущую ступень при процедуре обмена;  $B_{i-1}$  – плотность культуры в предыдущей ступени хемостата. Из последнего уравнения следует:

$$\frac{w}{V} = \frac{B_i - B_i^{(-)}}{B_i - B_{i-1}} = \frac{m_i^* - m_{i-1}^*}{m_i - m_{i-1}}. \quad (3.19)$$

Доля объёма при процедуре обмена равна отношению массы водорослей, удаляемой при процедуре обмена из текущей ступени к разнице масс водорослей в текущей и предыдущей ступени хемостата. Отношение плотности культуры до и после процедуры обмена указывает на величину разбавления культуры ( $\theta_i$ ), т.е. во сколько раз уменьшается масса водорослей и плотность культуры в  $i$ -й ступени:

$$\theta_i = \frac{B_i}{B_i^{(-)}} = \frac{V}{V-w \left(1 - \frac{B_{i-1}}{B_i}\right)} \quad (3.20)$$

Заметим, если культура разбавляется питательной средой, т.е.  $B_{i-1} = 0$ , то получается уравнение для первой ступени хемостата, полученное в работе [53].

$$\theta_1 = \frac{B_1}{B_1^{(-)}} = \frac{V}{V-w}$$

Из выражений (3.19) и (3.20) следует:

$$\frac{w}{V} = \frac{B_i - B_i^{(-)}}{B_i - B_{i-1}} = \frac{B_i - \frac{1}{\theta_i} B_i}{B_i - B_{i-1}} \quad (3.21)$$

Рост водорослей в культуре выражается двумя количественными характеристиками: продуктивностью и удельной скоростью роста. Поскольку за промежуток времени между процедурами обмена  $\Delta t$  (сут), плотность культуры в  $i$ -й ступени увеличится до величины  $B_i^{(+1)}$ , то на этом промежутке времени средняя скорость роста составит:

$$\bar{P}_i = \frac{B_i^{(+1)} - B_i^{(-)}}{\Delta t},$$

а средняя относительная скорость роста:

$$\bar{\mu}_i = \frac{B_i^{(+1)} - B_i^{(-)}}{B_i^{(-)} \cdot \Delta t}, \quad (3.22)$$

Убыль плотности определяется величиной разбавления культуры, которая зависит от массы водорослей, выносимой из текущей ступени хемостата при процедуре обмена, и массы водорослей, вносимой в рабочий объём из предыдущей ступени хемостата. Из рабочего объёма за одну процедуру обмена в течение промежутка времени  $\Delta t$  удаляется объём  $w$ , поэтому скорость протока культуры ( $F$ ) в текущей ступени хемостата равна:

$$F = \frac{w}{\Delta t},$$

а удельная скорость протока  $\omega$ :

$$\omega = \frac{F}{V} = \frac{w}{V \cdot \Delta t}. \quad (3.23)$$

Учитывая выражение (3.20) и (3.22), можно выразить величину удельной скорости протока питательной среды для  $i$ -й ступени следующим образом:

$$\omega \left(1 - \frac{B_{i-1}}{B_i}\right) = \left(1 - \frac{1}{\theta_i}\right) \frac{1}{\Delta t}; \quad \omega = \frac{1 - \frac{1}{\theta_i}}{1 - \frac{B_{i-1}}{B_i}} \frac{1}{\Delta t} \quad (3.24)$$

Заметим, выражение (3.23) позволяет рассчитать для  $i$ -й ступени удельную скорость протока суспензии водорослей (или питательной среды для 1-й ступени), которая во всех ступенях хемостата одинакова. Выражение (3.24) указывает на то, какой будет удельная скорость протока при уменьшении плотности культуры в  $i$ -й ступени в  $\theta_i$  раз с учётом плотности культуры в предыдущей ступени хемостата.

Изменения плотности культуры за промежуток времени  $\Delta t$  можно выразить через скорость роста и скорость протока. Из уравнений (3.21) и (3.23) следует:

$$\frac{\Delta B_i}{\Delta t} = \frac{B_i^{(+1)} - B_i^{(-)}}{\Delta t} - \frac{B_i - B_i^{(-)}}{\Delta t} = \bar{P}_i - \omega(B_i - B_{i-1}). \quad (3.25)$$

Таким образом, скорость изменения плотности квазинепрерывной культуры в текущей ступени хемостата определяется средней скоростью роста  $\bar{P}_i$ , скоростью внесения водорослей из предыдущей ступени ( $\omega \cdot B_{i-1}$ ), а также скоростью удаления водорослей при обмене ( $\omega \cdot B_i$ ). Выразим среднюю скорость

роста  $\bar{P}_i$  в единицах плотности культуры (биомассы) в  $i$ -й ступени хемостата:

$$\bar{P}_i = \tilde{\mu}_i \cdot B_i, \quad (3.26)$$

где  $\tilde{\mu}_i$  – коэффициент, отражающий долю прироста биомассы  $B_i$  за промежуток времени  $\Delta t$ .

По сути, этот коэффициент является относительной скоростью роста, аналогичной (3.22), с той разницей, что скорость прироста относится не к плотности культуры после обмена, а к плотности культуры до обмена  $B_i$ . Из сравнения (3.20) и (3.26) ясно, что  $\tilde{\mu}_i = \bar{\mu}_i \cdot \theta_i$  и отличие этих величин будет тем меньше, чем ближе  $\theta_i$  к единице и меньше интервал времени между разбавлениями культуры  $\Delta t$ .

Подставляя (3.26) в (3.25), получаем уравнение динамики плотности квазинепрерывной культуры в многоступенчатом хемостате:

$$\frac{\Delta B_i}{\Delta t} = \tilde{\mu}_i \cdot B_i - \omega(B_i - B_{i-1}) = \left[ \tilde{\mu}_i - \omega \left( 1 - \frac{B_{i-1}}{B_i} \right) \right] B_i. \quad (3.27)$$

Таким образом, получено уравнение, решение которого позволяет описать динамику плотности квазинепрерывной культуры в многоступенчатом хемостате. В частном случае при  $\Delta t \rightarrow 0$ ,  $\tilde{\mu}_i \rightarrow \mu_i$ ,  $\theta_i \rightarrow 1$  (непрерывный проток), получаем дифференциальные уравнения, идентичные уравнениям, опубликованным в работах [34, 56].

Для первой ступени хемостата, когда культура разбавляется питательной средой ( $B_{i-1} = 0$ ), уравнение (3.20) преобразуется в:

$$\frac{\Delta B_1}{\Delta t} = \tilde{\mu}_1 \cdot B_1 - \omega \cdot B_1 = (\tilde{\mu}_1 - \omega) B_1. \quad (3.28)$$

Это уравнение полностью идентично выражению, полученному ранее для квазинепрерывной культуры в одноступенчатом хемостате [53].

Поскольку переходные процессы при различных изменениях скорости протока питательной среды были кратковременны (рисунок 3.20), будем рассматривать только установившиеся процессы (стационарное динамическое равновесие), т.е., когда плотность культуры с течением времени в каждой ступени

хемостата остаётся неизменной ( $\Delta B_i=0$ ). Для условий стационарного динамического равновесия из (3.27) следуют уравнения для относительной скорости роста и продуктивности культуры в  $i$ -й ступени хемостата:

$$\tilde{\mu}_i = \omega \left(1 - \frac{B_{i-1}}{B_i}\right); \bar{P}_i = \omega(B_i - B_{i-1}). \quad (3.29)$$

Откуда следует связь плотностей культуры в соседних ступенях хемостата, а также скорость разбавления в  $i$ -й ступени в условиях стационарного динамического равновесия:

$$B_i = \frac{\omega}{\omega - \tilde{\mu}_i} B_{i-1}, \text{ откуда следует } \omega = \tilde{\mu}_i \frac{B_i}{B_i - B_{i-1}} = \frac{\bar{P}_i}{B_i - B_{i-1}} \quad (3.30)$$

Экспериментально полученная связь между плотностью культуры в 1-й и 2-й ступни хемостата представлена на рисунке 3.23. Из рисунка видно, что даже при максимальной скорости протока, когда наблюдался пристеночный рост, связь между плотностью культуры в 1-й и 2-й ступни достаточно хорошо описывается уравнением (3.30). Выражение для продуктивности культуры в  $i$ -й ступени (3.29) можно представить в виде:

$$B_i = \frac{\bar{P}_i}{\omega} + B_{i-1} \quad (3.31)$$

Поскольку у культуры в стационарном динамическом равновесии всегда  $\bar{P}_i > 0$  и  $\omega > 0$ , то для любого режима квазинепрерывного культивирования в многоступенчатом хемостате  $B_i > B_{i-1}$ . Если культура разбавляется питательной средой ( $B_{i-1} = 0$ ), тогда из (3.29) следует:

$$\tilde{\mu}_i = \omega; \bar{P}_1 = \omega \cdot B_1 \quad (3.32)$$

Для нахождения зависимости концентрации лимитирующего биогенного элемента в текущей ступени хемостата от скоростей протока и потребления субстрата клетками в процессе роста будем придерживаться логики вывода уравнения (3.28). По аналогии с (3.17) можно записать следующие выражения:

$$s_i = s_i^* + s_i^{**}; s_i^* = w \cdot S_i; s_i^{**} = V \cdot S_i - w \cdot S_i = (V - w) \cdot S_i, \quad (3.33)$$

где  $s_i$  – масса лимитирующего субстрата в рабочем объёме  $i$ -й ступени хемостата, г;  $s_i^*$  и  $s_i^{**}$  – масса лимитирующего субстрата в удаляемом объёме  $w$

при обмене и оставшемся объёме  $(V - w)$ ;  $S_i$  – концентрация лимитирующего субстрата в  $i$ -й ступени хемостата,  $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$ .

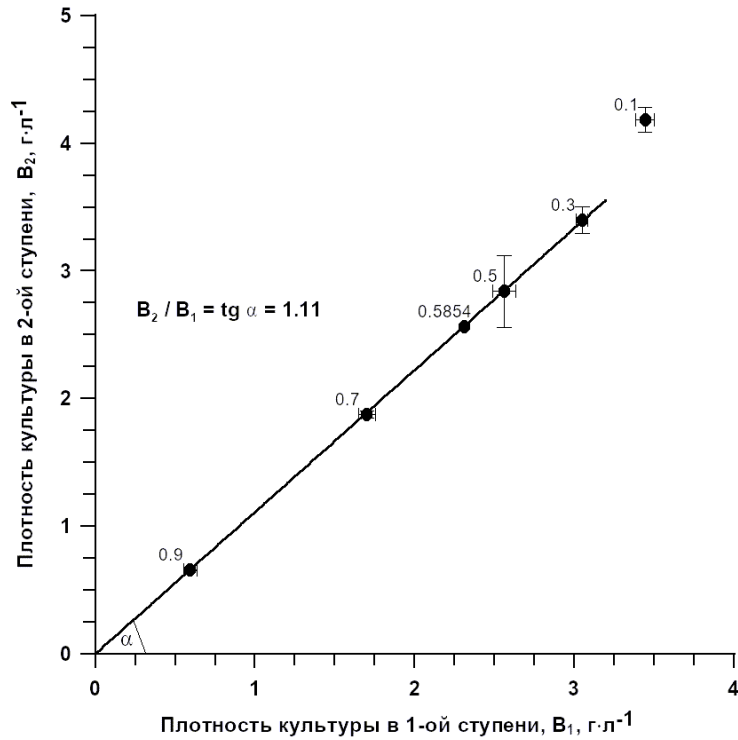


Рисунок 3.23 — Связь между плотностью культуры *Cylindrotheca closterium* в 1-й и 2-й ступенях хемостата в условиях стационарного динамического равновесия

Концентрация лимитирующего субстрата в  $i$ -й ступени после обмена ( $S_i^{(-)}$ ) будет равна:

$$S_i^{(-)} = \frac{S_{i-1}^* + S_i^{**}}{V} = \frac{w \cdot S_{i-1} + (V-w) \cdot S_i}{V}. \quad (3.34)$$

Из этого выражения следует:

$$\frac{w}{V} = \frac{S_i^{(-)} - S_i}{S_{i-1} - S_i} = \frac{S_{i-1}^* - S_i^*}{S_{i-1} - S_i} \quad (3.35)$$

Запишем изменение концентрации субстрата в  $i$ -й ступени хемостата ( $\Delta S_i$ ):

$$\underbrace{[S_i^{(-)} - S_i]}_{\text{прибыль}} - \underbrace{[S_i^{(-)} - S_i^{(+1)}]}_{\text{убыль}} = S_i^{(+1)} - S_i = \Delta S_i, \quad (3.36)$$

где  $S_i$  - концентрация субстрата до обмена;  $S_i^{(-)}$  - концентрация субстрата после процедуры обмена;  $S_i^{(+1)}$  - концентрация субстрата до обмена на следующем шаге квазинепрерывного культивирования.

Величину изменения концентрации субстрата (3.36) на промежутке времени  $\Delta t$  можно выразить через скорость потребления субстрата и скорость протока. Из выражений (3.35), (3.36) и (3.23) следует:

$$\frac{\Delta S_i}{\Delta t} = \frac{S_i^{(-)} - S_i}{\Delta t} - \frac{S_i^{(-)} - S_i^{(+1)}}{\Delta t} = \omega(S_{i-1} - S_i) - \bar{P}_{S_i}, \quad (3.37)$$

где  $\bar{P}_{S_i}$  - средняя скорость потребления лимитирующего субстрата клетками на промежутке времени  $\Delta t$ .

Доля кремния в биомассе *C. closterium* при разных условиях культивирования изменяется незначительно, поэтому можно предположить, что для любой скорости протока величина  $Y_f$  постоянна. В таком случае скорость потребления субстрата  $\bar{P}_{S_i}$  будет пропорциональна скорости роста  $\bar{P}_i$  микроводорослей. Следовательно, выражение (3.38) представляется в виде:

$$\frac{\Delta S_i}{\Delta t} = \frac{S_i^{(-)} - S_i}{\Delta t} - \frac{S_i^{(-)} - S_i^{(+1)}}{\Delta t} = \omega(S_{i-1} - S_i) - Y_{\text{п}} \cdot \bar{\mu}_i \cdot B_i, \quad (3.38)$$

Решение данного уравнения позволит описать динамику концентрации лимитирующего рост субстрата квазинепрерывной культуры в многоступенчатом хемостате. Тогда зависимость плотности культуры в  $i$ -й ступени от скорости разбавления:

$$B_i(\omega) = \frac{1}{\varepsilon_i} \frac{1}{Y_f} \left( S_{i-1} - \frac{K_S \cdot \omega}{\frac{1}{\varepsilon_i} \mu_m - \omega} \right) \quad (3.39)$$

В частном случае, для первой ступени хемостата, когда культура разбавляется питательной средой (то есть  $S_{i-1} = S_0$ ,  $\varepsilon_i = 1$ ), с учётом (3.32) запишем:

$$B_1(\omega) = \frac{1}{Y} S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \quad (3.40)$$

Подставляя в последнее выражение численные значения наблюдаемой потребности в кремнии из таблицы 3.5, константы насыщения из (3.15) и концентрации кремния в среде RS  $S_0 = 0,115 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  методом наименьших квадратов по экспериментальным данным рассчитаем  $\mu_m$ . На рисунке 3.23 показано соответствие экспериментальных данных и теоретической кривой (3.14) с рассчитанным значением  $\mu_m = 1,05 \text{ сут}^{-1}$  ( $R^2=0,97$ ). При расчёте значение плотности культуры при  $\omega=0,9 \text{ сут}^{-1}$  не учитывали. Как было сказано выше, при данной скорости протока отмечен пристеночный рост *C. closterium*.

Подставляем значение  $\mu_m = 1,05 \text{ сут}^{-1}$  в (3.40), получаем зависимость плотности культуры в первой ступени хемостата от удельной скорости протока:

$$B_1(\omega) = \frac{1}{0,035} \left( 0,115 - \frac{0,028 \cdot \omega}{1,05 - \omega} \right) \quad (3.41)$$

Заметим, несмотря на то, что в таблице 3.5 указано значение наблюдаемой потребности в кремнии  $Y_H = 38,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ , по результатам наших расчётов в проточной культуре величина наблюдаемой потребности равна  $Y_{\text{пр}} = 35,0 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ . Объяснить занижение потребности можно проявлением процессов автоселекции у микроорганизмов в проточной культуре. То есть, для накопительной культуры потребность в кремнии равна  $Y_H = 38,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ , а для проточной –  $Y_{\text{пр}} = 35,0 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ .

Анализируя выражение (3.40), можно отметить, что при некоторой критической скорости разбавления  $\omega$  значение  $B_1$  обращается в нуль (рисунок 3.24). Критическая скорость разбавления составила:

$$\omega_{\text{кр}}(B_1) = \mu_m \frac{S_0 - Y_{\text{пр}} \cdot B_1}{S_0 + K_S - Y_{\text{пр}} \cdot B_1}; \quad \omega_{\text{кр}}(0) = \mu_m \frac{S_0}{S_0 + K_S} = \frac{1,05 \cdot 0,115}{0,115 + 0,028} = 0,84 \text{ сут}^{-1} \quad (3.42)$$

Следовательно, с учётом (3.32), предельное значение  $\check{\mu}_1 = 0,84 \text{ сут}^{-1}$ . В сравнении с удельной скоростью роста  $\mu_H = 0,7 \text{ сут}^{-1}$ , полученной в накопительной культуре, это значение несколько выше, что связано с процессами автоселекции в проточной культуре [9].

Таким образом, для условий нашего эксперимента в накопительной культуре удельная скорость роста равна  $\mu_H = 0,7 \text{ сут}^{-1}$ , её предельное значение в

проточной культуре –  $\tilde{\mu}_1 = 0,84 \text{ сут}^{-1}$ , а её максимально возможное значение при лимитировании роста *C. closterium* кремнием –  $\mu_m = 1,05 \text{ сут}^{-1}$ . Отметим, максимальное значение  $\mu_m$  входит в выражение (3.15) и представляет собой некоторую видоспецифическую характеристику субстратзависимого роста *C. closterium* при лимитировании роста кремнием.

Для получения зависимости плотности культуры во 2-й ступени от  $\omega$  и  $\mu_2$  воспользуемся связью (3.30):

$$B_2(\omega, \mu_2) = \frac{\omega}{\omega - \tilde{\mu}_2} \frac{1}{Y_{\text{пр}}} \left( S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (3.43)$$

Для второй ступени хемостата можно записать:

$$B_2(\omega) = \frac{q_2}{Y_{\text{пр}}} \left( S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right) \quad (3.44)$$

Аналогично для  $i$ -й ступени ( $i \geq 2$ ):

$$B_i(\omega, \mu_2, \dots, \mu_i) = \frac{\omega^{i-1}}{\prod_{k=2}^i (\omega - \tilde{\mu}_k)} \frac{1}{Y_{\text{пр}}} \left( S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right), \quad (3.45)$$

Если  $q_i$  постоянная величина для любой пары соседних ступеней, то и произведение  $q_2 \cdot q_3 \cdot \dots \cdot q_i$  будет величиной постоянной. Следовательно:

$$B_i(\omega) = \frac{\prod_{k=2}^i q_k}{Y_{\text{пр}}} \left( S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right) \quad (3.46)$$

По данным нашего эксперимента (рисунок 3.23) угол наклона  $u$  зависимости  $B_2$  от  $B_1$  равен:

$$q_2 = \frac{\omega}{\omega - \tilde{\mu}_2} \quad \text{tg } \alpha = 1,11. \quad (3.47)$$

Поэтому зависимость плотности культуры во второй ступени хемостата от скорости разбавления можно представить следующим образом:

$$B_2(\omega) = 1,11 \frac{1}{Y_{\text{пр}}} \left( S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right) = \frac{1,11}{0,035} \left( 0,115 - \frac{0,028 \cdot \omega}{1,05 - \omega} \right). \quad (3.48)$$

На рисунке 3.24 показана зависимость плотности культуры во второй ступени хемостата от удельной скорости протока и соответствие экспериментальных данных и теоретической кривой (3.48).

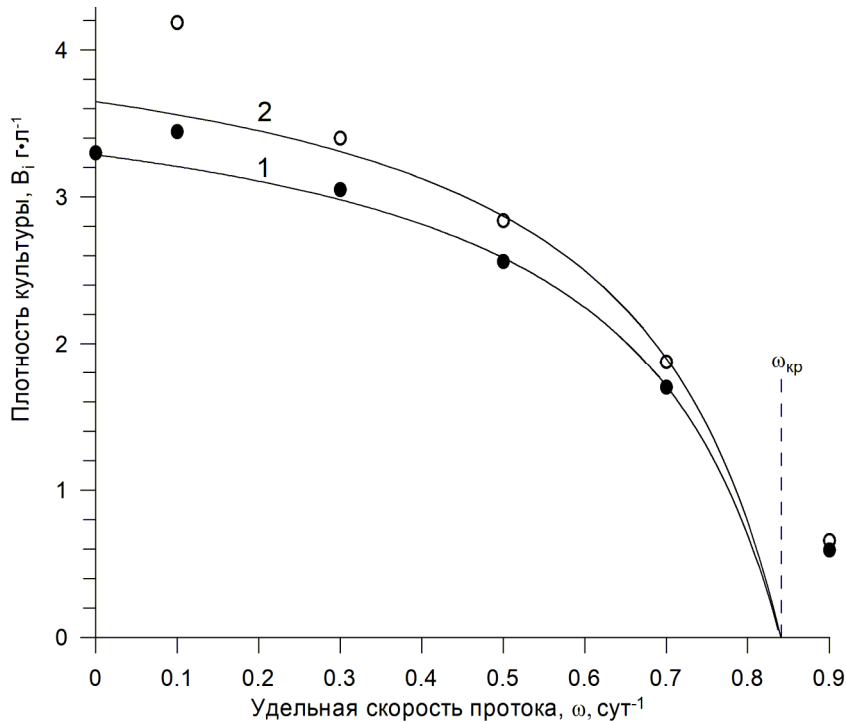


Рисунок 3.24 — Зависимость плотности культуры *Cyldrotheca closterium* от удельной скорости протока  $\omega$  в условиях стационарного динамического равновесия: 1 – первая ступень хемостата, расчёт по уравнению (3.41) ( $R^2=0,97$ ); 2 – вторая ступень, расчёт по уравнению (3.48) ( $R^2=0,96$ ). Пунктиром указана критическая скорость разбавления  $\omega_{кр}=0,84 \text{ сут}^{-1}$ .

Найдем величину урожая при различных режимах культивирования. Для этой цели подсчитаем суммарную продуктивность культуры в  $i$  ступенях хемостата в условиях стационарного динамического равновесия. Из выражения для продуктивности  $i$ -й ступени ясно, что суммарная продуктивность всех ступеней хемостата  $R_i$  равна:

$$R_i = \sum_{k=i}^i \overline{P}_k = \omega \cdot B_i. \quad (3.49)$$

Следовательно, урожай ( $H_i$ ) системы культивирования, состоящей из  $i$  ступеней в условиях стационарного динамического равновесия за некоторое фиксированное время составит:

$$H_i(t) = R_i \cdot t = \omega \cdot B_i \cdot t, \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \quad (3.50)$$

где  $t$  – время культивирования, сут.

Для нахождения продуктивности многоступенчатого хемостата подставим (3.46) в выражение (3.49):

$$R_i(\omega) = \omega \frac{\prod_{k=2}^i q_k}{Y_{\text{пр}}} \left( S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right) \quad (3.51)$$

Для частного случая  $R_1(\omega)$  и  $R_2(\omega)$  имеем:

$$R_1(\omega) = \omega \frac{1}{Y_{\text{пр}}} \left( S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right); R_2(\omega) = \omega \frac{q_2}{Y_{\text{пр}}} \left( S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (3.52)$$

Аналогичное выражение для одноступенчатого хемостата было получено в работе [34]. Подставляя экспериментальные значения и коэффициент  $q_2=1,11$  (см. (3.47)) в (3.52), имеем:

$$\begin{aligned} R_1(\omega) &= \omega \frac{1}{0,035} \left( 0,115 - \frac{0,028 \cdot \omega}{1,05 - \omega} \right); \\ R_2(\omega) &= \omega \frac{1,11}{0,035} \left( 0,115 - \frac{0,028 \cdot \omega}{1,05 - \omega} \right). \end{aligned} \quad (3.53)$$

Таким образом, получены зависимости продуктивности хемостата от удельной скорости потока. На рисунке 3.25 представлено соответствие экспериментальных данных и теоретических кривых (3.53).

Найдем оптимальное значение удельной скорости потока  $\omega_{\text{opt}}$ , при которой наблюдается максимальная продуктивность многоступенчатого хемостата. Для этого продифференцируем функцию (3.51) по  $\omega$ :

$$R_i'(\omega) = \frac{\prod_{k=2}^i q_k (K_S + S_0) \omega^2 - 2\mu_m \omega (K_S + S_0) + \mu_m^2 S_0}{Y_{\text{пр}} (\mu_m - \omega)^2}. \quad (3.54)$$

При  $R_i'(\omega)=0$  получаем квадратное уравнение:

$$\omega^2 - 2\mu_m \omega + \frac{\mu_m^2 S_0}{K_S + S_0} = 0. \quad (3.55)$$

Один из корней уравнения (3.55) не имеет смысла, т.к. должно выполняться условие  $\mu_m > \omega$ , второй корень – оптимальное значение удельной скорости потока, при которой достигается максимальная продуктивность всей многоступенчатой системы культивирования:

$$\omega_{\text{opt}} = \mu_m \left( 1 - \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}} \right), \quad (3.56)$$

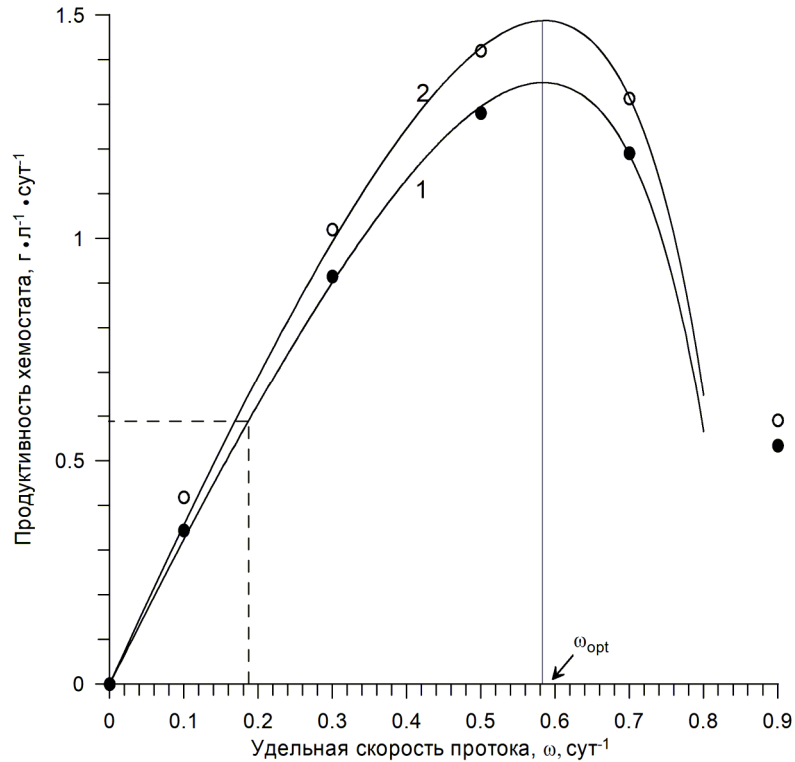


Рисунок 3.25 — Зависимость продуктивности *Cyldrotheca closterium* в хемостате в условиях стационарного динамического равновесия от удельной скорости протока. 1 и 2 – расчёт по уравнению (3.53) ( $R^2=0,98$ ) для одно- и двухступенчатого хемостата. Стрелкой указано оптимальное значение удельной скорости протока  $\omega_{opt}=0,59$ , при котором достигается максимальная продуктивность. Для сравнительной оценки пунктиром указана продуктивность накопительной культуры

Заметим, в последнем выражении величина  $\omega_{opt}$  не зависит от числа ступеней, поэтому уравнение (3.56) можно использовать для расчёта оптимальной удельной скорости протока как для одноступенчатого хемостата, так и для многоступенчатого.

Рассчитаем оптимальную удельную скорость протока для условий нашего эксперимента:

$$\omega_{opt}=1,05 \left( 1 - \sqrt{\frac{0,028}{0,115+0,028}} \right) = 0,59 \text{ сут}^{-1}. \quad (3.57)$$

А также по формулам (3.42), (3.48), (3.53) сделаем расчёт плотности культуры и продуктивности для каждой ступени хемостата при  $\omega_{\text{opt}}=0,59 \text{ сут}^{-1}$ . По формуле (3.50) найдем величину урожая одно- и двухступенчатого хемостата при оптимальной скорости протока за четверо суток культивирования. Результаты расчёта внесём в таблицу 3.6.

Таблица 3.6 — Продукционные характеристики культуры *Cylindrotheca closterium* в одно- и двухступенчатом хемостате в условиях стационарного динамического равновесия.

$\omega$	$B_1$	$\mu_1$	$R_1$	$H_1(5)$	$B_2$	$\mu_2$	$\bar{P}_2 = R_2 - R_1$	$R_2$	$H_2(5)$
0,1	3,44	0,1	0,344	1,72	4,19	0,02	0,074	0,419	2,09
0,3	3,05	0,3	0,915	4,58	3,40	0,03	0,106	1,021	5,10
0,5	2,56	0,5	1,281	6,40	2,84	0,05	0,139	1,420	7,10
$\omega_{\text{opt}}=0,59$	2,29	0,59	,348	6,76	2,54	0,06	0,150	1,498	7,51
0,7	1,70	0,7	1,191	5,95	1,88	0,07	0,123	1,314	6,57
0,9	0,59	0,9	0,534	2,67	0,66	0,09	0,057	0,591	2,96

Сокращения:  $\omega$  – удельная скорость протока,  $\text{сут}^{-1}$ ;  $B_1, B_2$  – плотность культуры в 1-ой и 2-ой ступенях хемостата,  $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$ ;  $\mu_1, \mu_2$  – удельная скорость роста;  $R_1, R_2$  – продуктивность,  $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ ;  $\bar{P}_2$  – продуктивность второй ступени хемостата;  $H_1(5), H_2(5)$  – урожай в хемостате за период времени  $t_f = 5$  суток

Проведём сравнение количества полученного урожая за фиксированный промежуток времени в условиях накопительной и проточного культивирования. Накопительное культивирование продолжалась 5 суток, поэтому расчёты будем вести для  $t_n = 5$  сут. Если накопительную культуру в момент достижения максимальной плотности  $B_m$  (начальный момент стационарной фазы роста) разбавить до исходной плотности  $B_0$ , тогда рост в накопительной культуре будет продолжен и максимальная плотность снова будет достигнута через промежуток

времени  $t_n$ . В условиях повторения циклов разбавления накопительной культуры через промежутки времени  $t_n$  накопительная культура становится частью проточного квазинепрерывного культивирования с промежутком времени между процедурами разбавления  $t - t_0 = t_n$ . Средняя продуктивность, относительная скорость роста и урожай на этом промежутке представляются как:

$$\bar{P}_H = \frac{B_m - B_0}{t - t_0} = \frac{B_H}{t_n}; \bar{\mu}_H = \frac{1}{B_m} \frac{B_m - B_0}{t - t_0} = \frac{\bar{P}_H}{B_m}; B_H = \bar{P}_H \cdot t_n. \quad (3.58)$$

С другой стороны, в виду (3.49) и (3.50) для квазинепрерывной культуры средняя продуктивность, относительная скорость роста и урожай имеют вид:

$$R_i = \omega \cdot B_i; \bar{\mu}_1 = \omega; H_{пр} = R_i \cdot t_n = \omega \cdot B_i \cdot t_n. \quad (3.59)$$

Сравнивая продуктивности двух квазинепрерывных культур (3.58) и (3.59) при одинаковой относительной скорости протока в условиях стационарного динамического равновесия (то есть  $\omega = \bar{\mu}_1 = \bar{\mu}_H$ ), имеем:

$$\frac{R_i}{\bar{P}_H} = \frac{\omega \cdot B_i}{\bar{\mu}_H \cdot B_m} = \frac{B_i}{B_m} < 1.$$

Следовательно, для условий  $\bar{\mu}_H = \omega$  накопительное культивирование более выгодно. Однако при увеличении скорости протока  $\bar{\mu}_H < \omega \leq \omega_{opt}$  больший выход урожая становится в проточной культуре. Причём максимальный выход урожая одноступенчатого хемостата достигается при оптимальной скорости протока  $\omega_{opt} = 0,59$  (рисунок 3.25).

Для расчёта продуктивности накопительной культуры подставим численные значения из нашего эксперимента в (3.58). В результате получим:  $\bar{P}_H = 0,62 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ,  $\bar{\mu}_H = 0,19 \text{ сут}^{-1}$ ,  $B_H = 3,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ . Для расчёта продуктивности хемостата для каждого из стационарных состояний воспользуемся выражением (3.58). Результаты расчёта внесём в таблицу 3.6. При  $\omega = 0,1$  за промежуток времени  $t_n$  проточная культура даёт меньший урожай в сравнении с накопительной культурой. Проточное культивирование становится выгодным при больших скоростях протока. Наибольший урожай достигается при оптимальной скорости протока:  $R_1(0,59) = 1,35 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ,  $H_1(5) = 6,76 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ , т.е.

процесс культивирования *C. closterium* в одноступенчатом хемостате выгодней периодического в 2,2 раза.

Сравним продуктивность одно- и двухступенчатого хемостата при условии поступления в систему культивирования на единицу объёма суспензии микроводорослей одинакового количества лимитирующего субстрата. Рабочий объём каждой ступени хемостата равен  $V$ , то есть суммарный объём суспензии микроводорослей в двухступенчатом хемостате равен  $2V$ . Следовательно, для соблюдения условий сравнения необходимо рабочий объём одноступенчатого хемостата увеличить вдвое или вдвое уменьшить удельную скорость протока.

Учитывая (3.31) и (3.49), запишем:

$$\frac{R_2}{R_1} = \frac{\omega B_2}{\frac{\omega}{2} B_1} = \frac{2B_2}{B_1} = 2 \cdot q_2 > 1.$$

Откуда следует, что в указанных выше условиях двухступенчатая система культивирования более продуктивна, нежели одноступенчатая. Данные о продуктивности одно- и двухступенчатого хемостата представлены в таблице 3.6.

Культура *C. closterium* характеризуется достаточно высокими показателями продуктивности как в накопительной, так и в проточной культуре. В накопительной культуре удельная скорость роста достигает  $\mu_n = 0,7 \text{ сут}^{-1}$ , а время удвоения биомассы –  $t_d = 0,987 \text{ сут}$ . В проточной культуре при критической скорости разбавления предельное значение удельной скорости роста культуры достигает  $\tilde{\mu}_1 = 0,84 \text{ сут}^{-1}$ . Для условий нашего эксперимента в одно- и двухступенчатом хемостате максимальная продуктивность наблюдается при оптимальной скорости протока  $\omega_{opt} = 0,59 \text{ сут}^{-1}$  и составляет  $R_1 = 1,348 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$  и  $R_2 = 1,498 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ . В проточной культуре продуктивность *C. closterium* в 2,2 раза выше по сравнению с периодической.

На основе экспериментальных данных проведён расчёт двух параметров уравнения Моно: максимальной удельной скорости роста  $\mu_m = 1,05 \text{ сут}^{-1}$  и константы насыщения  $K_S = 0,028 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  при лимитировании роста *C. closterium* кремнием. Также рассчитана наблюдаемая потребность водоросли в кремнии в

проточной культуре  $Y_{\text{пр}} = 35 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ . Показано, что наблюдаемая потребность в кремнии в проточной культуре ниже, чем в накопительной на 7,9 %. Отметим, величины  $\mu_m$ ,  $K_S$  и  $Y_{\text{пр}}$  являются важными физиологическими характеристиками диатомеи, которые играют ключевую роль при проектировании промышленных систем для интенсивного культивирования микроводорослей.

**Заключение по главе 3.** Определены средние значения потребностей микроводоросли *C. closterium* в азоте, фосфоре и кремнии. На основе установленных потребностей в основных биогенных элементах разработана новая питательная среда RS с целью получения плотной культуры. Подобран оптимальный источник азота для получения высоких продукционных характеристик. Показано, что использование мочевины в качестве дополнительного источника азота позволяет получить максимальный выход биомассы, т.к. расход мочевины при получении единицы биомассы в два раза меньше. *C. closterium* способна расти и вегетировать при высоких концентрациях нитрита, а добавление азота в аммонийной форме в среду RS во время активного роста микроводоросли приводит к ингибированию всех процессов метаболизма и гибели культуры. Установлена высокая эффективность утилизации углерода микроводорослью, которая составляет 90 %. Для обеспечения прироста  $1 \text{ г}\cdot\text{сут}^{-1}$  при температуре  $19 \text{ }^\circ\text{C}$  необходимо затратить минимум  $0,46 \text{ л CO}_2$  или  $1132 \text{ л}$  воздуха в сутки.

Показана возможность культивирования диатомеи на среде с высоким содержанием гидрокарбоната натрия. Добавление гидрокарбоната натрия в среду в значительной мере облегчает обеспечение культуры углеродом и способствует увеличению буферности системы, а также исключает резкие изменения pH и потери углерода в виде  $\text{CO}_2$ . Оптимальное значение pH среды для роста диатомеи находится в диапазоне 8,4-9,4. При более высоких значениях рост водорослей замедляется, а при достижении  $\text{pH} = 9,9$  культура переходит в фазу отмирания. Максимальная продуктивность диатомеи отмечена при  $19\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Гибель культуры

наступает при температуре ниже 5 °С и выше 35 °С. Самая высокая продуктивность *C. closterium* наблюдалась при интенсивности освещения 18 клк. Освещённость выше 18 клк проявляет угнетающее воздействие на рост и развитие микроводоросли, максимальная продуктивность существенно снижалась.

Максимальная продуктивность одно- и двухступенчатого хемостата отмечена при оптимальной скорости протока 0,59 сут<sup>-1</sup> и составляла 1,348 и 1,498 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. Показано, что в проточной культуре продуктивность *C. closterium* выше в 2,2 раза в сравнении с периодической. Удельная скорость роста, константы насыщения и концентрация лимитирующего субстрата в питательной среде являются важными производственными характеристиками *C. closterium*, которые играют ключевую роль при проектировании промышленных систем для интенсивного культивирования микроводорослей.

## ГЛАВА 4 БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Диатомовые водоросли характеризуются достаточно гибким метаболизмом, что позволяет управлять их биохимическим составом в процессе интенсивного культивирования [218, 259]. Главным достоинством при культивировании диатомовых водорослей являются высокая скорость деления клеток и возможность управления биохимическим составом в процессе выращивания.

### 4.1 Биохимический состав водоросли в условиях накопительного культивирования

Одним из наиболее важных способов управления биохимическим составом микроводорослей является изменение удельной скорости потока в проточной культуре от малых значений до предельных, т.е. когда происходит вымывание культуры [53]. Однако на практике при получении биомассы диатомовых водорослей и ценных веществ на их основе наиболее распространенным является метод накопительного культивирования.

В накопительной культуре управление биохимическим составом водорослей осуществляется посредством изменения световых условий, температуры, концентрации биогенных элементов и т.д. [124]. В процессе накопительного культивирования практически невозможно фиксировать значения внешних факторов среды, т.к. накопление биомассы влечет за собой изменение световых условий, концентрации биогенных элементов и экзометаболитов и т.д. Тем не менее, накопительное культивирование является важным этапом в исследовании продукционных характеристик культур микроводорослей, необходимых для организации проточного интенсивного культивирования. В литературе преимущественно приведены данные исследований именно накопительных

культур. Биохимический состав *C. closterium* по нашим данным в различных фазах роста при накопительном режиме культивирования приведен в таблице 4.1.

Таблица 4.1 — Биохимический состав диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* при накопительном культивировании.

Фазы роста	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %	Зола, %	Калорийность, ккал · кг <sup>-1</sup>
Экспоненциальная фаза	2±0,1	40±0,4	22±0,2	35±0,3	3,43
Фаза замедления роста	11±0,1	36±0,4	16±0,2	33±0,3	3,71
Начало стационарной фазы (восьмые сутки)	17±0,1	35±0,4	12±0,2	31±0,3	4,04
Конец стационарной фазы (21-ые сутки)	28±0,1	33±0,4	7±0,2	30±0,3	4,78

При накопительном культивировании в зависимости от фазы роста содержание массовой доли суммарных белков у вида изменяется от 33 до 40 % сухой массы. В экспоненциальной фазе роста содержание белка составляет 38-40 %, при достижении стационарной фазы роста концентрация белка снижается до 35-33 % и остаётся постоянной на протяжении всей стационарной фазы.

При накопительном культивировании *C. closterium* концентрация массовой доли суммарных липидов и углеводов в биомассе изменяется в широких пределах в зависимости от фазы роста. Содержание углеводов варьирует от 7 до 23 % сухой массы. Во время активного роста культуры зафиксированы максимальные значения концентрации углеводов (22-23 %), при переходе культуры в стационарную фазу роста содержание углеводов снижается до 12-13 % и уменьшается на протяжении всей стационарной фазы. В глубокой стационарной фазе роста (7-е сутки) содержание углеводов составляет 7-8 %.

Возможно, уменьшение содержания углеводов в биомассе *C. closterium* в стационарной фазе роста связано со снижением скорости темновых процессов фотосинтеза, что обусловлено лимитированием биосинтеза АТФ из-за недостатка биогенных элементами в питательной среде. Например, при отсутствии фосфора в среде процессы биосинтеза АТФ замедляются, что приводит к снижению скорости синтеза углеводов в цикле Кальвина [148].

Фракционный состав углеводов диатомовой водоросли *C. closterium* характеризуется высоким содержанием легко гидролизуемых углеводов (90 % общего содержания углеводов) и низким содержанием сахаров (5 %), а также трудно гидролизуемых углеводов (2-3 %). Данный факт подтверждается тем, что в диатомовых водорослях углеводы в основном представлены легко гидролизуемыми углеводами - полисахаридами (90 % от их общего количества). Количество водорастворимых и водонерастворимых полисахаридов в клетках водорослей представлены примерно поровну. Таким образом, *C. closterium* характеризуется достаточно низким содержанием углеводов (7-22 % сухой массы) по сравнению с другими диатомовыми водорослями, в которых концентрация углеводов может достигать 40 % [215].

Увеличение содержания липидов при лимитировании роста биогенными элементами – характерная реакция у многих видов водорослей [182]. По нашим данным в экспоненциальной фазе роста биомасса *C. closterium* характеризуется минимальным содержанием липидов – 3-5 % сухой массы. При переходе культуры в стационарную фазу роста наблюдается высокое накопление суммарных липидов – от 25 до 28 %. Высокая концентрация липидов обусловлена снижением облученности на единицу биомассы, а также лимитированием биогенными элементами. Снижение облучённости на единицу биомассы и недостаток или исключение кремневой кислоты приводит к снижению скорости биосинтеза белка, в результате чего в клетках накапливаются липиды [182, 282].

В стационарной фазе роста содержание липидов в данном виде также может достигать 23–30 % сухой массы в зависимости от условий культивирования.

Отмечено, что при относительно высокой интенсивности облучения ( $56 \text{ мкЕ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ) на среде f/2 было зарегистрировано большее содержание липидов (30 %), чем при низкой освещенности ( $11 \text{ мкЕ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ) на той же среде f/2 (23 % липидов) [101].

Культура *C. closterium* характеризуется средними показателями содержания золы - 30-35 % от сухой массы в различных фазах роста (рисунок 4.1). Данный факт указывает на то, что диатомея имеет достаточно небольшую калорийность -  $3,4 \text{ ккал}\cdot\text{кг}^{-1}$  сухой массы, т.к. на органическое вещество приходится 65–70 % сухой массы. Для сравнения, у зелёной микроводоросли *Chlorella vulgaris* калорийность составляет  $5,60 \text{ ккал}\cdot\text{кг}^{-1}$  сухой массы, у цианобактерии *Spirulina* sp. –  $4,98\text{-}5,10 \text{ ккал}\cdot\text{кг}^{-1}$ , у красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* –  $4,80 \text{ ккал}\cdot\text{кг}^{-1}$  [3, 287]. Следовательно, для роста биомассы *C. closterium* нужно затратить меньше энергии, чем зеленым и синезелёным водорослям, что дает возможность данному виду выживать в неблагоприятных световых условиях.

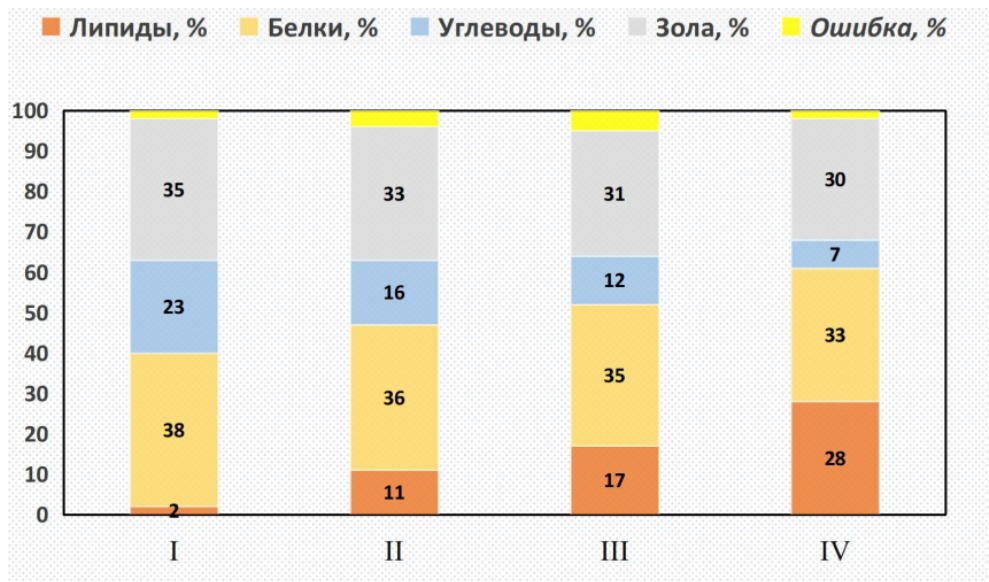


Рисунок 4.1 — Биохимический состав диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* в разных фазах роста в накопительной культуре. I - экспоненциальная фаза роста, II - фаза замедления роста, III - начало стационарной фазы роста, IV - конец стационарной фазы роста

Жирнокислотный и фракционный состав липидов *C. closterium* также изменяется в процессе роста в накопительном режиме культивирования в результате изменения внешних условий среды. Для *C. closterium* характерно преобладание полярных липидов в стационарной фазе роста; на долю ПНЖК может приходиться 50 % суммы жирных кислот [250]. Поэтому *C. closterium* может служить перспективным и быстро возобновляемым источником ПНЖК для человека. Из-за возрастающей потребности в ПНЖК необходимость в поиске альтернативного быстро возобновляемого источника ПНЖК становится очевидной и актуальной проблемой [182, 282].

Исследованию качественного и количественного состава ЖК у диатомовых водорослей посвящено много публикаций, но сравнение этих данных достаточно затруднительно [101, 185]. Связано это с тем, что концентрации индивидуальных ЖК обычно представляются в процентах от суммы ЖК, при этом доля суммы ЖК от сухой массы водорослей не уточняется. Концентрация суммарных ЖК в зависимости от фазы роста культуры изменяется в широких пределах. Поэтому для сравнительной оценки ЖК-состава микроводорослей целесообразно концентрации жирных кислот выражать не только в процентах от суммы ЖК, но и в промиллях (‰, мг·г<sup>-1</sup> сухой массы).

В данном разделе нами была поставлена цель исследовать жирнокислотный состав интенсивной культуры *C. closterium* в накопительном режиме. Для этого культуру адаптировали к условиям интенсивного культивирования и использовали среду RS, приготовленную на стерильной черноморской воде. В экспериментах *C. closterium* выращивали в режиме интенсивного культивирования, как описано в главе 2. Для получения плотной культуры использовали концентрированную среду RS, рассчитанную на 3 г сухой массы.

По нашим данным доля ЖК от общего содержания липидов возрастает на протяжении всей стационарной фазы роста. В условиях экспоненциального роста на 4-ые сутки эксперимента доля ЖК составляет 41 % общих липидов или 1,7 % сухой массы. В начале стационарной фазы роста (7-ые сутки культивирования)

доля ЖК достигает 42 % общих липидов или 7,14 % сухой массы и в конце стационарной фазы (21-ые сутки) содержание ЖК составляет 50 % общих липидов или 12,5 % сухой массы. Возможно, это обусловлено изменением пропорции отдельных классов липидов в процессе роста микроводоросли, а также изменением состава ЖК в самих липидах [101, 185].

Известно, что у многих видов диатомовых водорослей полярные липиды (фосфо- и гликолипиды), которые богаты ПНЖК, активно синтезируются в вегетативный период (в экспоненциальной фазе роста), а также в глубокой стационарной фазе при формировании покоящихся клеток [101, 185]. Концентрация индивидуальных ЖК в накопительном режиме культивирования *S. closterium* указаны в таблице 4.2.

В данном эксперименте содержание липидов на 4-ые сутки культивирования составляла 4,3 % сухой массы и постепенно возрастала при культивировании, и на первые сутки стационарной фазы (8-ые сутки) концентрация липидов в *S. closterium* достигла 17 %. На протяжении всей стационарной фазы зафиксировано возрастание липидов и на двадцать первые сутки культивирования содержание липидов достигало 25 %.

Жиры *S. closterium* по кислотному составу представляют собой смесь, состоящую из ненасыщенных и насыщенных кислот с  $C_{14}$  – 1-2 %,  $C_{16}$  – 50-62 %,  $C_{18}$  – 7-8 %,  $C_{22}$  – 1-3 % и  $C_{20}$  – 27-34 %. Среди моноеновых кислот преобладает пальмитолеиновая кислота (27,5-39 %), максимальное содержание которой зарегистрировано в экспоненциальной фазе роста (39 % суммы ЖК). При достижении культуры стационарной фазы концентрация данной кислоты существенно снижается и составляет 29,7 % от ЖК, и продолжает уменьшаться на протяжении всей стационарной фазы роста. Это можно объяснить тем, что данная кислота находится в начале цепочки биосинтеза длинноцепочечных жирных кислот [182]. В экспоненциальной и в стационарной фазе роста происходит синтез ПНЖК, предшественниками которых являются моноеновые кислоты [247].

Таблица 4.2 — Жирнокислотный состав *Cylindrotheca closterium* в различных фазах роста в накопительном режиме культивирования в сравнении другими видами диатомовых водорослей.

Наименование жирных кислот	Концентрация, % от суммы ЖК			
	Экспоненциальная фаза	Начало стационарной фазы	Конец стационарной фазы	Другие виды диатомовых водорослей
Миристиновая (C14:0)	1,23±0,09	2,06±0,15	2,05±0,15	0,9–29,9 [207]
Пентадекановая (C15:0)	0,36±0,055	0,25±0,038	0,38±0,057	0,6–44,49 [185]
Пальмитиновая (C16:0)	19,17±1,2	19,42±1,23	19,21±1,21	6,7–54,0 [207]
Стеариновая (C18:0)	1,28±0,122	0,79±0,075	0,42±0,04	0–20,4 [207]
Сумма НЖК	22,04	22,45	22,01	
Пальмитолеиновая (C16:1ω7)	39±2,60	29,74±2,0	27,49±1,85	1,0–58,7 [207]
Олеиновая (C18:1ω9c)	1,47±0,26	1±0,25	1±0,25	0,0–14,1 [207]
10-транс октадеценовая кислота (C18:1ω9t)	2,76±0,23	2,9±0,23	3,95±0,24	0,0–14,1 [207]
Сумма МЖК	43,23	33,6	32,5	
Гексадекатриеновая (C16:3ω4)	1,33±0,06	8,33±0,36	15,07±0,77	0,0–21,6 [207]
γ-линоленовая (C18:3ω6t)	1,16±0,1	1,91±0,16	1,92±0,16	0,7–3,3 [184, 185]
Линолевая (C18:2ω6c)	0,83±0,13	1,28±0,21	1±0,17	0,49–2,9 [101, 184]
Арахидоновая (C20:4ω6)	7,92±0,93	13 ±1,45	10,6±1,18	0,0–14 [207]
Эйкозопентаеновая (C20:5ω3)	19,17±1,37	20±1,39	16±1,11	0,0–46,1 [207]
Дигомо-γ-иноленовая (C20:3ω6)	0,34±0,042	0,3±0,042	0,31±0,38	0,2–0,9 [289]
Докозапентаеновая (C22:4 ω6)	1,27±0,04	0,85±0,08	0,88±0,08	0,3–3,1 [196]
Докозагексаеновая C22:6 ω3	1,71±0,44	0,35±0,09	0,33±0,085	0,4–4,8 [207, 250]
Сумма ПНЖК	33,6	45,7	45,2	
Отношение ω6/ω3	0,57	0,86	0,89	

Данный факт обуславливает уменьшение доли моноеновых кислот при выходе культуры в стационарную фазу роста и на протяжении всей стационарной

фазы. Надо подчеркнуть, что концентрация пальмитолеиновой кислоты достаточно высокая даже в конце стационарной фазы роста (29,7 % от ЖК или 34,36 мг·г<sup>-1</sup> сухой массы).

Основную долю насыщенных жирных кислот составляет пальмитиновая кислота (19-19,5 % от суммы ЖК). Доля данной кислоты при накопительном культивировании не изменяется, что обуславливает неизменную долю НЖК во всех фазах роста. Несмотря на то, что пальмитиновая кислота стоит в самом начале цепочки биосинтеза ненасыщенных жирных кислот, концентрация данной кислоты не уменьшается. Данный факт можно объяснить тем, что насыщенные жирные кислоты в основном входят в состав триацилглицеридов, которые могут накапливаться внутри клетки в виде жировых вакуолей и служить запасным энергетическим субстратом при неблагоприятных условиях [247]. Известно, что у диатомовых водорослей в стационарной фазе роста при лимитировании фосфора в питательной среде происходит увеличение скорости синтеза триацилглицеридов и пальмитолеиновой кислоты, что, возможно, компенсирует расход данной кислоты на синтез других кислот.

Среди полиеновых кислот наиболее высокое содержание зарегистрировано эйкозопентаеновой (16-20 %), гексадекатриеновой (15 %) и арахидоновой (7-13 %) кислот (таблица 4.2). Отмечено значительное увеличение гексадекатриеновой кислоты в процессе роста в накопительной культуре, минимальное содержание данной кислоты определено в экспоненциальной фазе роста (1,3 %), а максимальное – в глубокой стационарной фазе и составляет 15% от суммы ЖК или 18,8 мг·г<sup>-1</sup>. Гексадекатриеновая кислота входит в состав моногалактозилдиацилглицерина (МГДГ), компонента тилакоидных мембран, и синтезируется из пальмитолеиновой кислоты. Поэтому отмечено снижение доли гексадекатриеновой кислоты и увеличение доли пальмитолеиновой кислоты. МГДГ являются галактолипидами и отвечают также за адаптацию микроводорослей. В водорослях данная кислота выполняет защитную функцию от активных форм кислорода. Возможно, данная кислота может выполнять

антиокислительную защитную функцию и в организме человека.

*C. closterium* отличается высоким содержанием эйкозапентаеновой (16-20 %) и арахидоновой (7-13 %) кислот во всех фазах роста. Это имеет большое прикладное значение, поскольку эйкозапентаеновая кислота обладает профилактическим действием против сердечнососудистых заболеваний [70, 230], а арахидоновая кислота служит предшественником гормоноподобных веществ, известных как эйкозаноиды (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и др.) [60]. Содержание эйкозапентаеновой кислоты в *C. closterium* возрастает в экспоненциальной фазе роста и достигает своей максимальной концентрации (20 % от суммы ЖК или 11,89 мг·г<sup>-1</sup> сухой массы) на 8-ые сутки культивирования при выходе культуры в стационарную фазу. Максимальная концентрация арахидоновой кислоты (13 % от суммы ЖК или 9,5 мг·г<sup>-1</sup>) зафиксирована в глубокой стационарной фазе (21-ые сутки). Таким образом, суммарное содержание ПНЖК в биомассе *C. closterium* достигает своего максимального значения в начале стационарной фазы роста, на долю которых приходится 45–47 % от суммы жирных кислот, и остается величиной постоянной на протяжении всей стационарной фазы роста в накопительной культуре (рисунок 4.2).

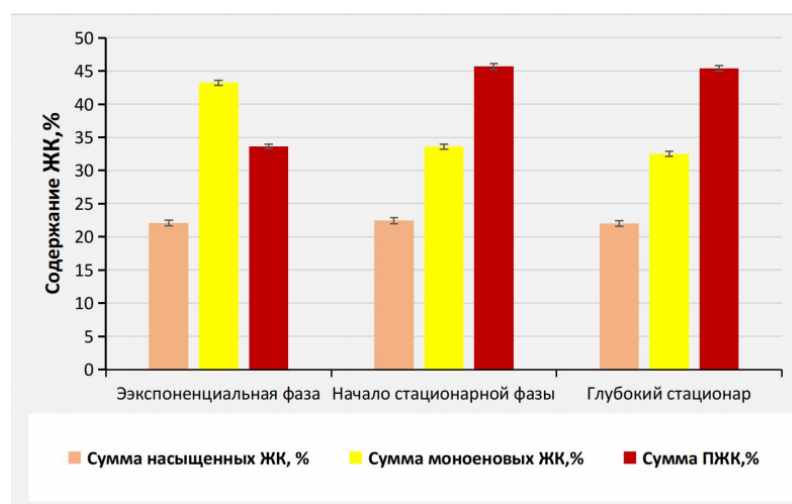


Рисунок 4.2 — Жирнокислотный состав интенсивной культуры *Cylindrotheca closterium* в накопительном режиме

Для человека незаменимыми ЖК являются линолевая и  $\alpha$ -линоленовая кислота, так как данные кислоты не синтезируются в организме и являются предшественниками для биосинтеза других n-3 и n-6 ПНЖК. Максимальная концентрация данных кислот в *C. closterium* зафиксирована в начале стационарной фазы и составляет 2 % и 1,3 % от суммы ЖК.

В *C. closterium* преобладают  $\omega$ 3 ПНЖК. Соотношение  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 варьирует от 0,57 до 0,89 в зависимости от фазы роста. Нужно отметить, что соотношение  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 показывает сбалансированность синтеза эйкозаноидов в организме человека и играет важную роль для здоровья. Продукты, имеющие соотношение  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ПНЖК больше двух, способствуют усилению патогенеза многих заболеваний, в том числе ишемической болезни сердца. Продукты с низким соотношением  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ПНЖК ( $\omega$ 6/ $\omega$ 3  $\leq$ 1) могут использоваться в качестве профилактики таких заболеваний, как аритмия сердца, инсульт и инфаркт миокарда, а также атеросклеротического изменения сосудов [70, 230].

Можно оценить максимальный выход ПНЖК при накопительном режиме культивирования. С этой целью рассчитана средняя скорость синтеза ПНЖК за единицу времени, которая достигает своего максимального значения (9 мг·г<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>) на 11-ые сутки культивирования (рисунок 4.3). Максимальные средние скорости биосинтеза ПНЖК (8,5-9 мг·г<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>) зарегистрированы на протяжении 6 суток начиная с девятых суток и по 14 сутки культивирования. Таким образом, сбор биомассы можно осуществлять с целью получения максимального выхода ПНЖК с девятых по четырнадцатые сутки накопительного культивирования.

Следовательно, высокие продукционные показатели *C. closterium* в интенсивной культуре, а также его жирнокислотный состав, который характеризуется высокой долей полиеновых жирных кислот и низким соотношением  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ПНЖК ( $\omega$ 6/ $\omega$ 3 = 0,5-0,8), позволяет отнести *C. closterium* к перспективным объектам для искусственного воспроизводства ценных ПНЖК в промышленных масштабах.

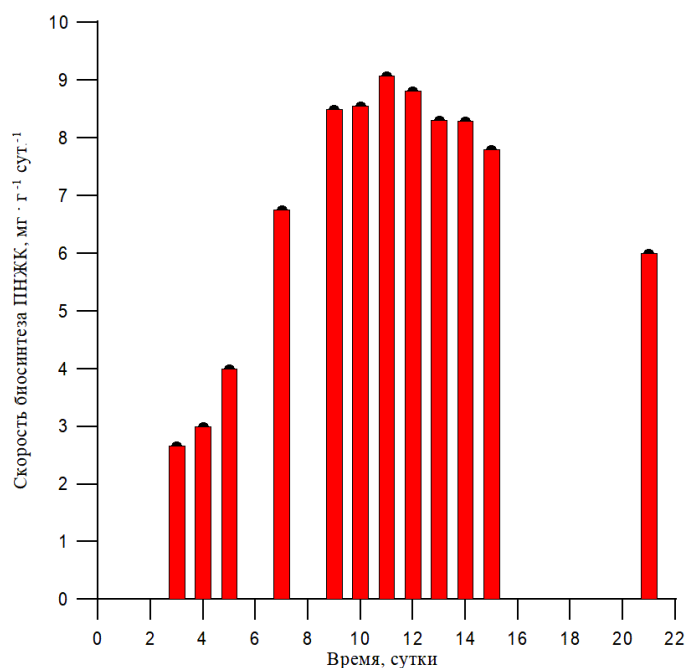


Рисунок 4.3 — Средняя скорость биосинтеза ПНЖК в накопительном режиме культивирования *Cylindrotheca closterium*

Липиды, продуцируемые *C. closterium*, кроме нейтральных и полярных липидов, также включают в себя стеролы, углеводороды и производные пренила, такие как токоферолы и каротиноиды.

Актуальной задачей является исследовать динамику накопления Фк в биомассе *C. closterium* в накопительном режиме культивирования, так как Фк обладает антиоксидантной, иммуномодулирующей и противораковой активностью [96, 118, 146, 165]. Обнаружено, что концентрация Фк в биомассе в начале стационарной фазы сильно варьировала в зависимости от соотношения биогенных элементов питательной среды. Поэтому сначала была поставлена цель – оптимизировать среду RS для получения высокого выхода Фк в начале стационарной фазы роста.

При выращивании *C. closterium* в интенсивном режиме на среде RS в начале стационарной фазы содержание Фк достигло  $2 \pm 0,2$  мг·г<sup>-1</sup> сухой массы, что значительно меньше, чем на среде F (5 мг·г<sup>-1</sup>). Проанализировав соотношения

биогенных элементов в данных средах, обнаружено, что соотношение азот : фосфор (N : P) сильно влияет на содержание Фк в начале стационарной фазы. В среде RS соотношение N : P равно шести, а в питательной среде F – 12. Экспериментально подобрали соотношение N : P в среде RS для максимального накопления Фк в биомассе *C. closterium* в конце стационарной фазы роста. Условия эксперимента описаны в главе 2. Соотношения N : P в среде RS составляли 6, 9, 12, 15 и 23.

При полном минеральном обеспечении максимальная плотность культуры на пятые – шестые сутки при различных соотношениях N : P в среде RS достигла своих расчетных величин ( $3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ). Содержание Фк в конце стационарной фазы сильно зависело от соотношения N : P в среде RS. При соотношении N : P = 6 и 9 концентрация Фк в начале стационарной фазы роста достигала 2 и 3  $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$  (рисунок 4.4). При соотношении N : P = 12 и 15 концентрация Фк достигала  $5 \pm 0,3$  и  $7 \pm 0,3 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ , а при N : P = 23 составляла  $8 \pm 0,3 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ .

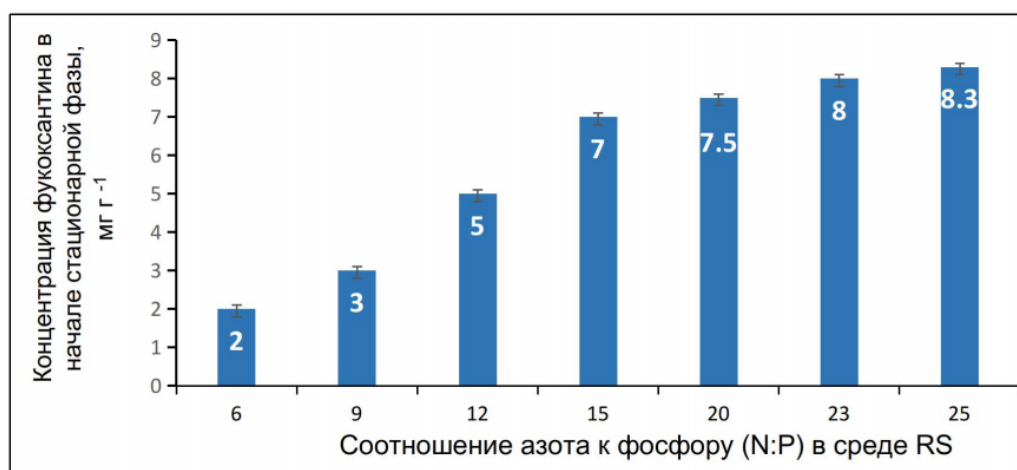


Рисунок 4.4 — Зависимость максимальной концентрации фукоксантина в биомассе *Cylindrotheca closterium* в начале стационарной фазы роста накопительной культуры от соотношения азот-фосфор в питательной среде RS

Таким образом, увеличение соотношения азота к фосфору в среде приводит к увеличению содержания Фк в биомассе *C. closterium* в начале стационарной фазы роста. При увеличении соотношения N : P до 15 содержание Фк в начале стационарной фазы линейно возрастает и при соотношении N : P = 15, содержание Фк достигает  $7 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$  (рисунок 4.4). Это можно объяснить тем, что именно азот в клетке обеспечивает синтез белков, входящих в светособирающие фукоксантин – хлорофилл белковые комплексы, а также синтез всех ферментов, участвующих в биосинтезе Фк. Дальнейшее увеличение соотношения азота к фосфору в среде не приводит к значительным изменениям содержания Фк в биомассе. Следовательно, оптимальным соотношением N : P в среде для максимального выхода Фк в начале стационарной фазы роста выбрано 15.

Цель дальнейшего исследования – проследить динамику изменения Фк в интенсивной культуре *C. closterium* в различных фазах роста (рисунок 4.5). Во время активного роста в экспоненциальной фазе концентрация Фк составляла  $0,5\text{--}1,5 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ . При переходе культуры в стационарную фазу роста концентрация Фк достигла  $7 \pm 0,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$  в основном за счет увеличения своей биомассы, а также синтеза Фк в клетках во время фазы замедления роста. В течение всей стационарной фазы роста зафиксировано постоянное увеличение содержания Фк в биомассе *C. closterium* и в конце стационарной фазы (на 16-е сутки) концентрация Фк достигала своего максимального значения.

Высокая активность синтеза Фк в клетках в стационарной фазе роста связана с тем, что низкие значения концентраций питательных веществ в среде на стационарной фазе роста способствуют формированию стрессовых условий, при которых активизируются процессы каротегенеза. Недостаток освещенности также способствует синтезу Фк. Поскольку при недостатке освещенности более востребована светособирающая функция и синтез ксантофиллов переключается на образование Фк, основными функциями Фк в клетках диатомей являются поглощение и передача энергии света хлорофиллу *a* [280].

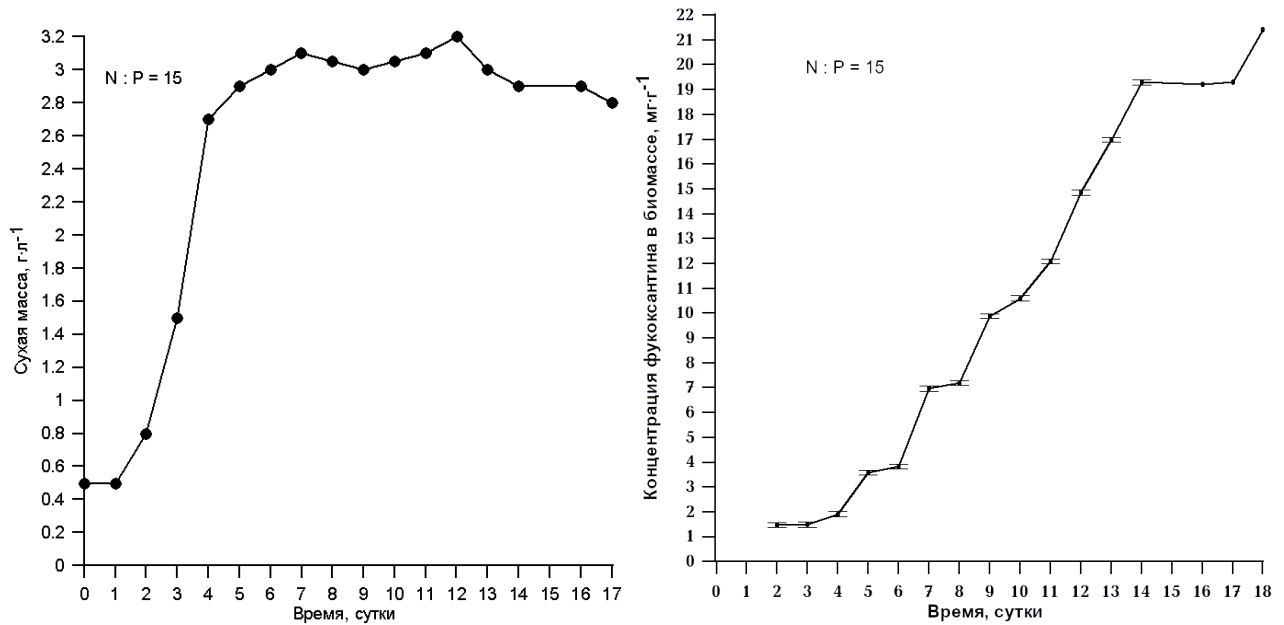


Рисунок 4.5 — Накопительная кривая культуры *Cyndrotheca closterium* с длинной стационарной фазой роста (слева) и накопление фукоксантина в клетках (справа)

В течение всей экспоненциальной фазы роста зафиксированы низкие скорости накопления Фк (от 0,3 до 0,4 мг·г<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>) и высокая удельная скорость роста за счет того, что все процессы метаболизма направлены на синтез структурных компонентов клетки. Скорость накопления Фк достигает своего минимального значения (0,2 мг·г<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>) в конце экспоненциальной фазы роста. При переходе в стационарную фазу роста наблюдается резкое увеличение скорости накопления Фк до 2 мг·г<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup> в основном за счет синтеза Фк в клетках микроводоросли, при этом прекращаются все процессы роста и развития клеток. Этот процесс вызван резким уменьшением освещенности и уменьшением концентраций всех биогенных элементов в питательной среде.

Следовательно, величина выхода Фк в накопительной культуре *C. closterium* зависит, с одной стороны, от скорости накопления биомассы, и, с другой стороны, от скорости процессов биосинтеза Фк в самой клетке. В течение всей экспоненциальной фазы роста наблюдается увеличение содержания Фк в культуре, в основном за счет увеличения биомассы микроводоросли. В

стационарной фазе в условиях глубокого лимитирования по биогенным элементам зафиксирован активный синтез Фк. Концентрация Фк достигает своего максимального значения в конце стационарной фазы роста.

Можно оценить максимальный выход Фк при накопительном режиме культивирования. С этой целью была рассчитана средняя скорость синтеза Фк за единицу времени по формуле:

$$\Phi_K = \frac{\Phi_{K1} - \Phi_{K2}}{t - t_n}$$

где:  $\Phi_{K1}$  - концентрация Фк в текущий момент времени  $t$ ;  $\Phi_{K2}$  - концентрация Фк в начальный момент времени  $t_n$ . Из рисунка 4.6 видно, что средняя скорость накопления Фк достигает своего максимального значения на 14-ые сутки культивирования ( $1,29 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ).

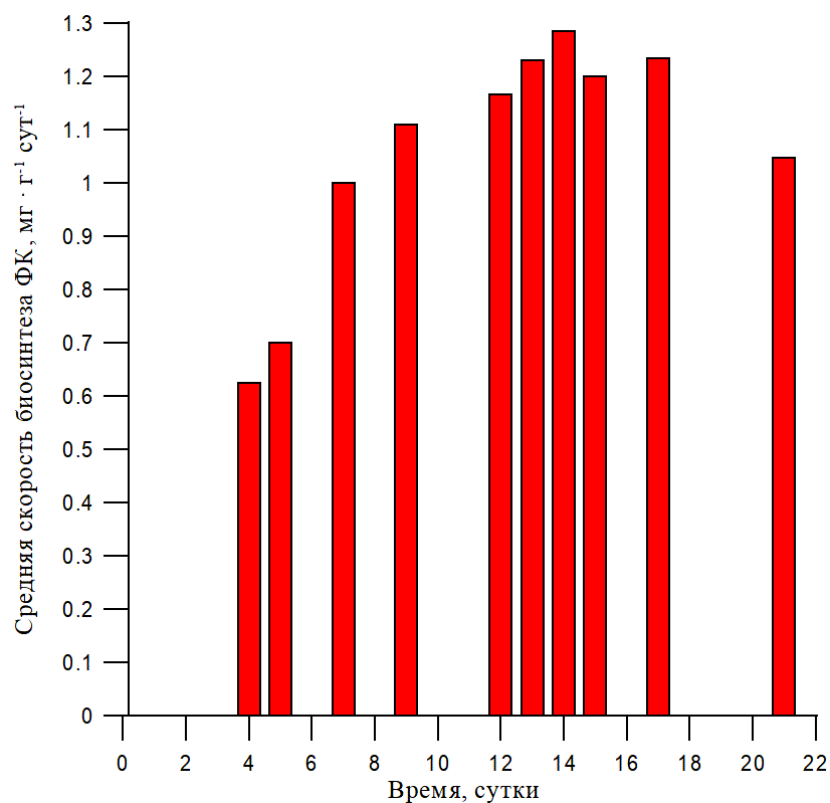


Рисунок 4.6 — Средняя скорость биосинтеза фукоксантина в накопительном режиме культивирования *Cyndrotheca closterium*

В дальнейшем нами была определена зависимость между концентрациями Фк и общих липидов в биомассе *C. closterium*. Культуру даптировали к концентрированным минеральным питательным средам. Затем культуру использовали в качестве инокулята для накопительного и проточного культивирования. Плотность культуры определяли методом йодатной окисляемости [6] или прямым взвешиванием сырой массы микроводорослей после осаждения клеток центрифугированием при 1600 g .

На рисунке 4.7 представлена зависимость накопления Фк и общих липидов в клетках *C. closterium* при различных условиях культивирования. В диапазоне содержания Фк от 0 до 10 мг·г<sup>-1</sup> наблюдается линейная зависимость с углом наклона 2,28. Затем идет насыщение – концентрация Фк увеличивается, а содержание липидов остается неизменным.

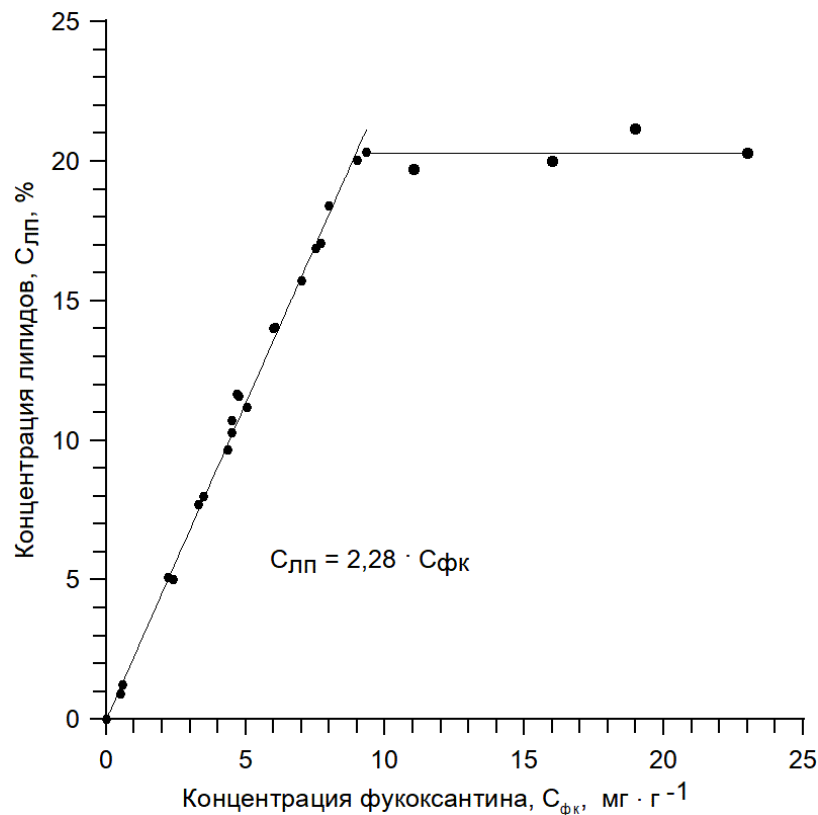


Рисунок 4.7 — Зависимость концентраций Фк и общих липидов в биомассе *Cylindrotheca closterium*

Линейную зависимость между концентрациями Фк и общих липидов до определенного значения Фк в культуре можно объяснить тем, что и Фк и липиды являются структурными компонентами пластид [55], и синтез липидов в основном идёт по прокариотическому пути метаболизма, а не по эукариотическому пути [228]. В условиях лимитирования роста биогенными элементами фотосинтетические мембраны, включающие липиды и Фк, активно синтезируются для защиты фотосинтетического аппарата от повреждающего действия света, причем доля липидов и Фк остаётся неизменной.

При накоплении липидов до 21 % синтез липидов приостанавливается, а концентрация Фк продолжает увеличиваться до 23 мг·г<sup>-1</sup>. Принято считать, что Фк локализован в фотосинтетической мембране и выполняет защитную функцию. Согласованный синтез фотосинтетических липидсодержащих структур при малом содержании Фк (до 10 мг·г<sup>-1</sup>) в клетках, по-видимому, это подтверждает. Не ясным остается вопрос о локализации Фк в клетках, когда его концентрация достигает 23 мг·г<sup>-1</sup> (рисунок 4.5). Возможно, линейная зависимость между концентрациями Фк и общих липидов характерна для всех диатомей, но для каждого вида водорослей коэффициент перехода будет индивидуальным.

Полученная линейная зависимость позволяет вычислять содержание общих липидов при исследовании культур диатомей. Зная концентрацию Фк (до 10 мг·г<sup>-1</sup>) у *C. closterium*, можно определить концентрацию липидов по уравнению:

$$C_{\text{лп}} = K \cdot C_{\text{Фк}},$$

где  $C_{\text{лп}}$  – концентрация липидов, %;  $C_{\text{Фк}}$  – концентрация Фк, мг·г<sup>-1</sup>;  $K = 2,28$  – коэффициент перехода от концентрации Фк к концентрации общих липидов.

Линейную зависимость можно использовать для разработки экспресс-метода определения общих липидов по оптической плотности культуры *C. closterium* или её экстрактов, т. к. концентрация Фк и оптическая плотность также связаны функциональной зависимостью.

## 4.2 Биохимический состав водоросли в условиях двухступенчатого хемостата

В накопительной культуре условия среды постоянно изменяются. Преимущественно это обусловлено увеличением плотности культуры из-за чего проявляется эффект самозатенения клеток и, как следствие, уменьшение облученности на единицу биомассы. Кроме того, с течением времени при накопительном культивировании в питательной среде уменьшаются концентрации биогенных элементов, в среде накапливаются экзометаболиты и пр. Важно отметить, что изменение условий среды в накопительной культуре приводит к изменению биохимического состава микроводорослей. В связи с чем, не всегда удаётся достичь высокой эффективности технологических процессов получения ценных веществ из микроводорослей.

Для обеспечения и поддержания оптимальных условий культивирования, не изменяющихся во времени, используют другой способ выращивания микроводорослей – проточное культивирование. Важным преимуществом проточного культивирования является возможность достижения оптимальных условий среды для роста клеток и биосинтеза БАВ, что обеспечивает в условиях стационарного динамического равновесия постоянство биохимического состава получаемой биомассы.

В тех случаях, когда процессы роста и накопления БАВ разобщены, используют многоступенчатую систему культивирования, в частности двухступенчатый хемостат. Так, при активном росте у *C. closterium* ПНЖК и Фк практически не накапливаются. Активный биосинтез этих веществ наблюдается только при лимитировании роста биогенными элементами [71, 211]. Использование двухступенчатого проточного культивирования позволяет учесть разобщённость процессов роста клеток и биосинтеза целевых веществ, поскольку в первой ступени с высоким содержанием биогенных элементов наблюдается активный рост, а во второй – при лимитировании роста биогенами – активный

синтез ПНЖК и Фк. Варьируя скоростью разбавления культуры, появляется возможность управления процессом накопления целевых продуктов в биомассе микроводорослей и достижения максимальных скоростей биосинтеза ПНЖК и Фк в оптимальных условиях [264].

Известно, что бентосные виды микроводорослей, в том числе *C. closterium*, имеют удельный вес клеток выше единицы. Поэтому при слабом перемешивании клетки оседают на дно. Как в лабораторных исследованиях, так и в промышленных масштабах эта особенность позволяет варьировать величиной протока для каждой ступени системы культивирования, тем самым управляя скоростью роста в первой ступени и накоплением целевого вещества во второй ступени. Частным случаем проточной системы культивирования является двухступенчатый хемостат с одинаковой скоростью протока в обеих ступенях.

В данном разделе представлены результаты исследований биохимического состава *C. closterium* в двухступенчатом хемостате при различных удельных скоростях протока. Культуру *C. closterium* в хемостате выращивали на среде RS с увеличенной концентрацией каждого компонента в 3 раза при оптимальной температуре и освещённости. Более подробно условия культивирования *C. closterium* в двухступенчатом хемостате были описаны выше.

Рассмотрим одноступенчатый хемостат (первую ступень) с различной удельной скоростью протока: 0,1; 0,3; 0,5 и 0,7 сут<sup>-1</sup>. Процессы роста культуры *C. closterium*, а также биосинтез Фк, липидов и ПНЖК в хемостате взаимосвязаны. Биохимический состав водоросли при различных удельных скоростях протока приведён в таблице 4.3. При удельной скорости протока 0,1 сут<sup>-1</sup> биомасса имеет наибольшую калорийность, т.к. характеризуется максимальной долей липидов и высокой концентрацией Фк и ПНЖК. С повышением скорости протока отмечено повышение продуктивности культуры и снижение содержания липидов, ПНЖК и Фк (рисунок 4.8). Данный факт можно объяснить тем, что с увеличением скоростей протока концентрация лимитирующего субстрата в среде увеличивается и, как следствие, увеличивается продуктивность.

Таблица 4.3 — Биохимический состав *C. closterium* в первой ступени хемостата при различных удельных скоростях протока

Удельная скорость протока, сут <sup>-1</sup>	ФК, мг·г <sup>-1</sup>	ПНЖК, %	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %	Зола, %
$\omega = 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	2,86	$6,8 \pm 0,1$	$39 \pm 0,5$	$15 \pm 0,4$	39,0
$\omega = 0,3$	$2,6 \pm 0,1$	2,36	$5,9 \pm 0,1$	$40 \pm 0,5$	$17 \pm 0,5$	38,0
$\omega = 0,5$	$1,5 \pm 0,1$	1,32	$3,4 \pm 0,1$	$40 \pm 0,5$	$19 \pm 0,4$	37,6
$\omega = 0,7$	$0,7 \pm 0,1$	0,60	$1,59 \pm 0,1$	$42 \pm 0,5$	$22 \pm 0,4$	35,0
$\omega = 0,9$	$0,5 \pm 0,1$	0,4	$1,14 \pm 0,1$	$42 \pm 0,5$	$24 \pm 0,4$	35,0

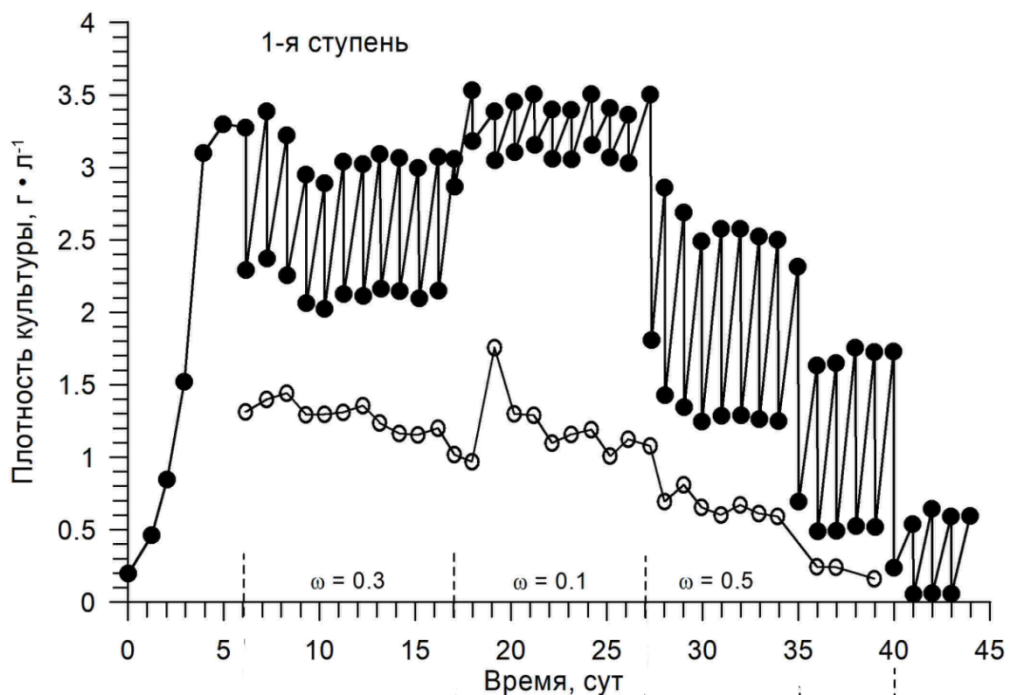


Рисунок 4.8 — Динамика плотности культуры *Cylindrotheca closterium* и концентрации фукоксантина при изменении удельной скорости протока в первой ступени хемостата

Но поскольку процессы биосинтеза разобщены, концентрация липидов и ФК, и ПНЖК в биомассе уменьшается. Также можно отметить, что при снижении плотности проточной культуры увеличивается облучённость на единицу биомассы, что может приводить к частичной деструкции ФК и других ценных веществ.

Рассчитаем скорости синтеза ФК, липидов и ПНЖК в сутки при различных удельных скоростях протока в первой ступени хемостата по формулам:

$$P_{\text{ФК}} = \omega \cdot F_x \cdot B_i; \quad P_{\text{PUFA}} = \omega \cdot C_{\text{PUFA}} \cdot B_i; \quad P_{\text{Lip}} = \omega \cdot C_{\text{Lip}} \cdot B_i,$$

где  $P_{\text{ФК}}$ ,  $P_{\text{PUFA}}$ ,  $P_{\text{Lip}}$  – продуктивность ФК, ПНЖК и липидов,  $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ;  $\omega$  – удельная скорость протока,  $\text{сут}^{-1}$ ;  $B_i$  – текущая плотность культуры при заданной удельной скорости протока,  $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$ ;  $F_x$  – концентрация ФК,  $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ ;  $C_{\text{Lip}}$  – концентрация липидов,  $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ ;  $C_{\text{PUFA}}$  – концентрация ПНЖК,  $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ .

Таблица 4.4 – Скорость синтеза фукоксантина, липидов и ПНЖК *Cylindrotheca closterium* в первой ступени хемостата при различных скоростях протока.

Удельная скорость протока, $\text{сут}^{-1}$	Максимальная продуктивность	Выход ФК, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$	Выход липидов, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$	Выход ПНЖК, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$
$\omega = 0,1$	0,34	1,03	28,49	8,57
$\omega = 0,3$	0,92	2,38	62,1	21,24
$\omega = 0,5$	1,28	1,92	50,49	19,89
$\omega = 0,7$	1,19	0,83	20,8	8,51
$\omega = 0,9$	0,76	0,3	6,9	3,24

В первой ступени хемостата максимальный выход ФК, липидов и ПНЖК наблюдается при удельной скорости протока  $0,3 \text{ сут}^{-1}$ , т.е. при данных условиях культивирования скорость синтеза ФК достигает  $2,38 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ , липидов –  $62,1 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$  и ПНЖК –  $21,24 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ . Заметим, что максимальная скорость синтеза биомассы в целом наблюдается при удельной скорости протока  $\omega = 0,59$  (рисунок 4.8), но для синтеза липидов требуется скорость протока вдвое меньше.

При оптимальной для роста удельной скорости протока  $\omega = 0,59$  культура *S. closterium* имеет максимальные продукционные показатели ( $1,28 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ). Но при этом концентрация Фк в биомассе достаточно мала и составляет  $1,5 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ .

Сопоставляя накопительное культивирование и одноступенчатый хемостат, отметим, что показатели средней продуктивности липидов, Фк и ПНЖК в единицу времени имеют близкие значения. В режиме накопительного культивирования и условиях одноступенчатого хемостата при удельной скорости протока  $0,3 \text{ сут}^{-1}$  в течение 20-ти суток культивирования выход Фк с литра культуры составляет 51 и 49 мг, соответственно. Накопительное культивирование характеризуется продолжительной стационарной фазой роста (15 суток), в которой отмечено активное накопление Фк, ПНЖК и липидов. Средняя скорость биосинтеза Фк на данном промежутке времени составляет:

$$P_{\text{Фк}} = \frac{F_{\text{X}_{\text{кон}}} - F_{\text{X}_0}}{t_{\text{кон}} - t_0} = 2,55 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1},$$

где  $P_{\text{Фк}}$  – средняя скорость биосинтеза фукоксантина,  $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ;  $F_{\text{X}_{\text{кон}}}$  и  $F_{\text{X}_0}$  – концентрация фукоксантина в конечный и начальный момент времени,  $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$ .

В условиях одноступенчатого хемостата при удельной скорости протока  $0,3 \text{ сут}^{-1}$  средняя скорость биосинтеза фукоксантина составляет:

$$P_{\text{Фк}} = \omega \cdot F_{\text{X}} \cdot V_i = 2,4 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$$

где  $V_i$  – текущая плотность культуры при заданной удельной скорости протока,  $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$ .

То есть в накопительной и проточной культуре средняя скорость биосинтеза Фк практически одинаковая. В таком случае можно считать, что проточное культивирование в одноступенчатом хемостате для накопления ценных веществ никаких преимуществ не имеет. Однако существенным недостатком накопительного культивирования является необходимость в продолжительной стационарной фазе роста (в нашем случае 15 суток) для получения биомассы с высоким содержанием целевого продукта (Фк, ПНЖК и др.).

В стационарной фазе роста культура характеризуется нестабильностью:

клетки агглютинируют, клетки прикрепляются к стенкам фотобиореактора, велика вероятность перехода культуры в фазу отмирания и пр. Обычно нестабильность обусловлена лимитированием роста из-за отсутствия биогенных элементов в среде, неспособностью клеток поглощать биогенные элементы, а также недостатком светового обеспечения клеток. Важно отметить нестабильность процессов, проходящих в стационарной фазе роста, которые трудно предсказуемы особенно в реакторах большого объёма (10 л и более), что приводит к немалым трудностям при организации биотехнологических процессов на производстве. Также к недостаткам накопительного культивирования можно отнести существенные потери времени при полной остановке процесса культивирования для чистки и стерилизации реактора после сбора всей биомассы.

Таким образом, для стабильного непрерывного производства целевых веществ на основе культуры *C. closterium*, а также для управления их синтезом в самой биомассе целесообразно использовать проточную культуру.

Рассмотрим двухступенчатый хемостат с равным объёмом каждой из ступеней и одинаковой удельной скоростью протока. В первой ступени, куда попадает свежая среда, наблюдается активный рост клеток, в то время как во второй ступени, куда попадала биомасса из первой ступени, создаются стрессовые условия из-за лимитирования роста культуры биогенными элементами. Это приводит к накоплению в биомассе Фк, липидов и ПНЖК во второй ступени. В таблице 4.5 представлены средние концентрации Фк, липидов, ПНЖК, белков и углеводов в биомассе *C. closterium* в двухступенчатом хемостате. При возрастании скорости протока с 0,1 до 0,5 сут<sup>-1</sup> отмечено снижение концентраций Фк с 11 до 3 мг·г<sup>-1</sup>, липидов - с 18 до 3 % и увеличение содержания углеводов.

В качестве критерия для оценки возможности управления процессами биосинтеза ПНЖК и Фк, во второй ступени хемостата предлагается использовать величину продуктивности и концентрации Фк, т. к. общая доля липидов в биомассе линейно связана с концентрацией Фк. Для первой ступени хемостата наибольшая продуктивность достигается при плотности культуры в стационарном

динамическом равновесии от 2,3 до 2,8 г·л<sup>-1</sup> (рисунок 4.8), что соответствует удельной скорости протока 0,5-0,7 сут<sup>-1</sup>.

При больших скоростях протока в двухступенчатом хемостате из первой ступени питательная среда попадает во вторую ступень и скорость роста во второй ступени также увеличивается, что приводит к малому накоплению Фк в клетках (1-3 мг·г<sup>-1</sup>). Такая же концентрация Фк наблюдается в экспоненциальной фазе роста накопительного культивирования. Поскольку с увеличением скорости протока во второй ступени хемостата концентрация Фк, липидов и ПНЖК снижается (рисунок 4.9, таблица 4.5), для получения максимального выхода Фк использование удельных скоростей выше 0,5 сут<sup>-1</sup> не имеет смысла.

Таблица 4.5 — Биохимический состав *Cylindrotheca closterium* во второй ступени хемостата при различных удельных скоростях протока.

Удельная скорость протока, сут <sup>-1</sup>	Фк, мг·г <sup>-1</sup>	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %	Зола, %	ПНЖК, %
$\omega = 0,1$	10,50±0,1	18,00±0,1	37,00±0,5	11,00±0,4	33,0	8,64
$\omega = 0,3$	5,10±0,1	10,70±0,1	36,47±0,5	17,50±0,4	36,2	4,82
$\omega = 0,5$	3,40±0,1	2,89±0,1	35,50±0,5	24,00±0,4	36,0	1,24
$\omega = 0,7$	1,10±0,1	2,10±0,1	36,00±0,5	25,00±0,4	37,0	0,5
$\omega = 0,9$	0,70±0,1	1,40±0,1	34,5±0,5	25,50±0,4	37,0	0,32

В двухступенчатом хемостате концентрации белка и золы в биомассе *C. closterium* с изменением удельной скорости протока варьируют незначительно (таблица 4.5). Это обусловлено тем, что содержание азота в среде в избытке, а концентрация кремния в среде рассчитана по потребности *C. closterium* для построения кремнистого панциря. Таким образом, в двухступенчатом хемостате

биомасса характеризуется максимальной калорийностью и максимальным содержанием БАВ: Фк, липидов и ПНЖК при удельной скорости протока  $0,1 \text{ сут}^{-1}$ .

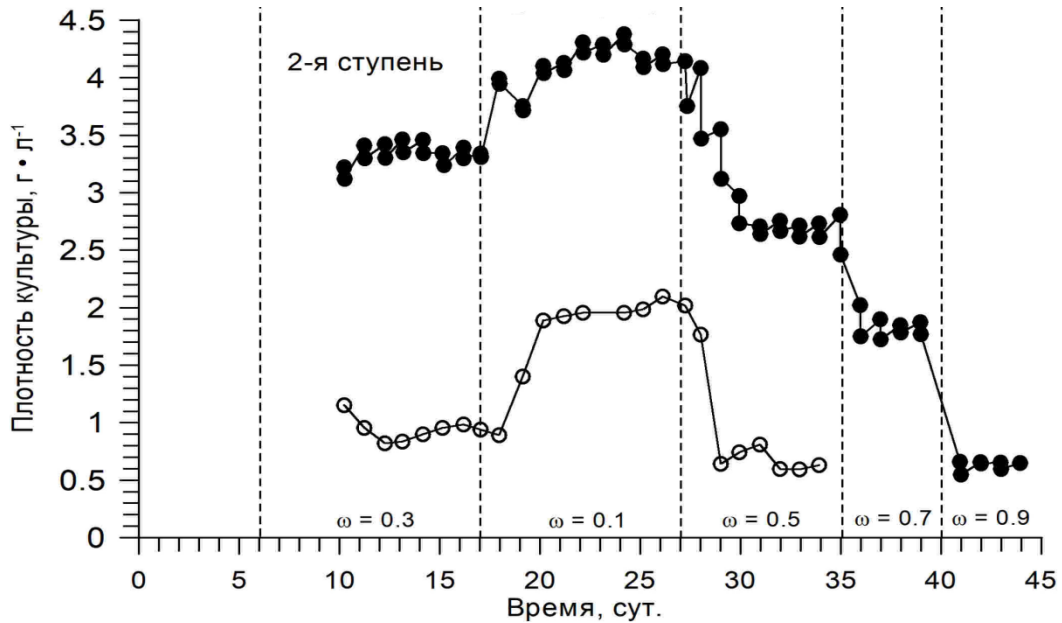


Рисунок 4.9 — Динамика плотности культуры *Cyindrotheca closterium* и концентрации фукоксантина при изменении удельной скорости протока во второй ступени хемостата

Данный факт можно объяснить тем, что при удельной скорости протока  $0,1 \text{ сут}^{-1}$  во вторую ступень не попадают такие биогенные элементы как фосфор и кремний, т.к. в первой ступени хемостата эти элементы полностью используются для построения клеточных компонентов. Это приводит к лимитированию по фосфору и кремнию во второй ступени, а также повышению рН среды, за счёт чего наблюдается активный синтез БАВ внутри клеток.

Для определения удельной скорости протока, при которой будет наблюдаться максимальный выход ценных веществ в режиме двухступенчатого хемостата, рассчитаем скорости синтеза Фк, липидов и ПНЖК в сутки при различных удельных скоростях протока (таблица 4.6).

Таблица 4.6 — Скорость синтеза фукоксантина, липидов и ПНЖК в биомассе *Cylindrotheca closterium* в режиме двухступенчатого хемостата при различных удельных скоростях протока.

Удельная скорость протока, сут <sup>-1</sup>	Максимальная продуктивность, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	Выход Фк в сутки, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	Выход липидов, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	Выход ПНЖК, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>
$\omega = 0,1$	0,42	4,4	75,42	36,2
$\omega = 0,3$	1,05	6,1	105,3	45,2
$\omega = 0,5$	1,48	5,0	42,92	17,2
$\omega = 0,7$	1,3	1,44	27,62	11,0
$\omega = 0,9$	0,63	0,38	8,82	3,53

Из таблицы 4.6 видно, что для максимального выхода биомассы с высоким содержанием фукоксантина, липидов и ПНЖК в двухступенчатом хемостате необходимо устанавливать удельную скорость протока равную 0,3 сут<sup>-1</sup>.

Заметим, в эксперименте с двухступенчатым хемостатом были проведены исследования с фиксированными удельными скоростями протока. Следовательно, это не позволяет достаточно точно установить значение оптимальной скорости протока. Для этой цели воспользуемся графическим методом (рисунок 4.10). Отообразим на одном графике зависимости продуктивности культуры и концентрации фукоксантина в биомассе от удельной скорости протока. Точка пересечения двух кривых указывает на оптимальную скорость протока, при которой наблюдается максимальный выход биомассы с максимальным содержанием фукоксантина.

Из графика видно, что для двухступенчатого хемостата оптимальная удельная скорость протока равна 0,26 сут<sup>-1</sup>, при которой зафиксирована максимальная продуктивность Фк (6,5 мг·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>), а, следовательно, липидов и ПНЖК, так как содержание Фк и липидов линейно связано. Следовательно, если стоит задача получить высокий выход биомассы с высоким содержанием ФК,

липидов и ПНЖК в двухступенчатом хемостате, тогда необходимо устанавливать удельную скорость протока равную  $0,26 \text{ сут}^{-1}$ .

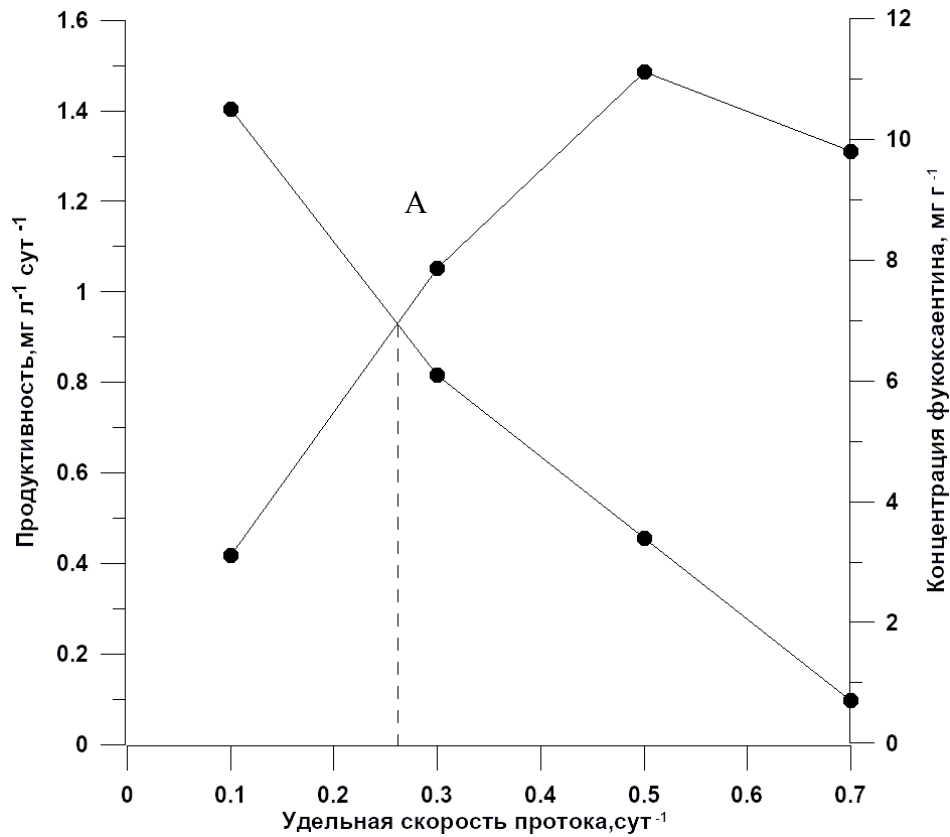


Рисунок 4.10 — Зависимость продуктивности и концентрации фукоксантина от удельной скорости протока в биомассе *Cyldrotheca closterium*

Несмотря на то, что максимальная скорость биосинтеза ценных веществ достигается при удельной скорости протока  $0,26 \text{ сут}^{-1}$ , в ряде случаев целесообразно использовать проточную культуру *C. closterium* с меньшей скоростью протока. Например, если стоит задача извлечения БАВ из биомассы на последующих этапах технологического процесса. При удельной скорости протока  $0,1 \text{ сут}^{-1}$  наблюдается меньшая продуктивность, но доля ценных веществ в биомассе максимальна (рисунок 4.9). Большая концентрация липидов, ФК и ПНЖК в биомассе повышает эффективность процесса экстракции этих веществ.

Сопоставляя максимальный выход БАВ при накопительном режиме культивирования и в хемостате, отметим, что при двухступенчатом хемостате показатели максимальной продуктивности липидов, фукоксантина и ПНЖК в единицу времени превышают в 2,4 раза аналогичные показатели при накопительном культивировании и режиме одноступенчатого хемостата. Если как в режиме накопительного культивирования, так и в условиях одноступенчатого хемостата в течении двадцати суток максимальный выход фукоксантина с литра культуры не превышал 54 мг, то в условиях двухступенчатого хемостата максимальный выход фукоксантина в течении двадцати суток составил 130 мг.

Проанализируем состав ЖК во второй ступени хемостата при удельных скоростях протока 0,1 и 0,3 сут<sup>-1</sup>. Именно при удельной скорости протока 0,1 сут<sup>-1</sup> в режиме двухстадийного хемостата биомасса имеет оптимальный биохимический состав и наибольшую калорийность и при удельной скорости протока равной 0,3 сут<sup>-1</sup> зафиксирован максимальный выход БАВ (таблица 4.7).

С увеличением удельной скорости протока повышается суммарная концентрация мононенасыщенных ЖК от 28 до 32 % от общего содержания ЖК, при этом концентрация ПНЖК незначительно снижается с 52 до 47 %. При пересчёте на сухую биомассу во второй ступени хемостата с увеличением скорости протока с 10 до 50 % доля от сухой биомассы ПНЖК уменьшается с 9 % до 1 %.

Все основные жирные кислоты при различных скоростях протока во второй ступени хемостата остаются доминирующими: среди ПНЖК - эйкозапентоеновая (17,5-18 % от суммы ЖК), арахидоновая (10-12 %), и гексадекатриеновая кислота (10-12 %); среди мононенасыщенных ЖК – пальмитолеиновая (19-22 %); среди насыщенных ЖК – пальмитиновая (15-16 %). Удельная скорость протока не повлияла на процентное содержание отдельных доминирующих ЖК, таких как пальмитиновая и эйкозапентоеновые кислоты.

Таблица 4.7 — Жирнокислотный состав *Cylindrotheca closterium* в режиме двухступенчатого хемостата при различных удельных скоростях протока.

Наименование ЖК	% от суммы ЖК	
	10 % проток	30 % проток
Миристиновая (C14:0)	1,25±0,09	1,49± 0,11
Пентадекановая (C15:0)	0,25±0,038	0,29±0,044
Пальмитиновая (C16:0)	15,93±1,12	15,97±1,12
Стеариновая (C18:0)	2,82±0,27	2,83±0,27
Сумма НЖК	20,25	20,58
Гексадеценовая (C16:1ω5)	2,95±0,2	3,6±0,23
Пальмитолеиновая (C16:1ω7)	19,12±1,29	22,08±1,49
Олеиновая (C18:1ω9t)	2,00±0,27	1,55±0,20
Methyl oleate (C18:1ω9cis) Methyl cis-9-octadecenoate	3,82±0,36	5,03±0,46
Сумма МНЖК	27,89	32,26
Гексадекатриеновая (C16:3ω4)	14,45±0,60	12,05±0,50
Methyl 6,9,12,15 hexadecatetraenoate	1,57	2,03
Линолевая (C18:2ω6)	1,91±0,32	1,55±0,26
γ-линоленовая (C18:3ω6)	1,74±0,21	1,86±0,22
Арахидоновая (C20:4ω6)	12,98±1,45	10,38±1,16
Эйкозопентаеновая (C20:5ω3)	17,84±1,24	17,19±1,19
Докозапентаеновая (C22:5ω3)	1,06±0,12	1,16±0,14
Докозагексаеновая (C22:6ω3)	0,5±0,13	0,94±0,24
Сумма ПНЖК	51,67	47,16
ω6/ω3	0,86	0,69
ω3/ω6	1,2:1	1,45:1

При увеличении удельной скорости потока с 0,1 до 0,3 сут<sup>-1</sup> отмечено снижение арахидоновой кислоты с 12 до 10 % от общего содержания ЖК, концентрация остальных полиненасыщенных жирных кислот остаётся без изменения, за счёт чего соотношение  $\omega 3/\omega 6$  незначительно варьирует от 1,2 : 1 до 1,45 : 1. Из приведённых данных видно, что в микроводоросли преобладают  $\omega 3$  жирные кислоты, что особенно ценно для здоровья человека. Следовательно, диатомовую водоросль *C. closterium* можно использовать в качестве источника  $\omega 3$  жирных кислот с целью профилактики сердечнососудистых заболеваний.

**Заключение по главе 4.** Содержание общих липидов, углеводов и жирных кислот в биомассе *C. closterium* изменяется в широких пределах в зависимости от фазы роста культуры при накопительном режиме культивирования. В экспоненциальной фазе роста биомасса *C. closterium* характеризуется высокой концентрацией углеводов (22-23 % от сухой массы), минимальным содержанием липидов (2-3 %) и жирных кислот (1,7 %). При переходе культуры в стационарную фазу роста зафиксированы активные процессы биосинтеза Фк, липидов и ПНЖК, так как культура попадает в лимитирование по фосфору и кремнию, освещенность на единицу биомассы снижается, и уровень рН повышается. В начале стационарной фазы роста содержание углеводов резко снижается до 12-13 %, а концентрация липидов увеличивается до 17-18 %, при этом наблюдаются достаточно высокие концентрации жирных кислот (7,14 %). В конце стационарной фазы роста, когда культура *C. closterium* уже определённое время прибывала в стрессовых условиях, биомасса характеризуется максимальной концентрацией липидов (28 %), жирных кислот (12,5 %) и фукоксантина (20 мг·г<sup>-1</sup>).

Таким образом, у диатомовой водоросли процессы роста и накопления ценных веществ разобщены, поэтому для её культивирования необходимо использовать двухступенчатый хемостат. В первой ступени хемостата отмечен активный рост культуры, а во второй ступени – синтез Фк и ПНЖК. При больших скоростях потока (0,5-0,9 сут<sup>-1</sup>) в двухступенчатом хемостате во второй ступени наблюдается малое накопление ценных веществ (концентрация Фк составляет 1-3

мг·г<sup>-1</sup>), так как среда из первой ступени хемостата попадает во вторую ступень и здесь скорость роста также увеличивается. В двухступенчатом хемостате биомасса *C. closterium* характеризуется максимальной калорийностью и содержанием БАВ: Фк (10 мг·г<sup>-1</sup>), липидов (18 %) и ПНЖК при минимальной удельной скорости протока 0,1 сут<sup>-1</sup>.

Для получения высокого выхода биомассы *C. closterium* необходимо устанавливать в двухступенчатом хемостате удельную скорость протока 0,3 сут<sup>-1</sup>. Однако если стоит задача извлечения БАВ из биомассы на последующих этапах технологического процесса, то целесообразно использовать биомассу, полученную в двухступенчатом хемостате при скоростях протока 0,1 сут<sup>-1</sup>, так как доля ценных веществ в биомассе максимальна. Большая концентрация липидов, Фк и ПНЖК в биомассе повышает эффективность процесса экстракции этих веществ. У *C. closterium* в накопительном и проточном режимах культивирования отмечено преобладание ω3 полиненасыщенные жирные кислоты. Соотношение ω6/ω3 варьирует от 0,57 до 0,89.

При двухступенчатом хемостате показатели максимальной продуктивности липидов, фукоксантина и ПНЖК превышают в 2,4 раза аналогичные показатели при накопительном культивировании.

Получена принципиально важная зависимость между концентрацией липидов и фукоксантина в биомассе *C. closterium*. Установлено, что в накопительном и проточном режимах культивирования *C. closterium* концентрации общих липидов и Фк (до 10 мг·г<sup>-1</sup> Фк) связаны линейно. Поэтому на основе данной зависимости можно разработать экспресс-метод определения липидов в интенсивной культуре.

## ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM*

Водоросль *C. closterium* способна синтезировать целый ряд биологически активных и ценных веществ: незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты (эйкозапентаеновая и арахидоновая кислоты), каротиноиды (фукоксантин и диадиноксантин), йодорганические соединения и др. [182, 227, 245]. Поэтому её можно рассматривать как перспективный объект для биотехнологий.

При культивировании *C. closterium* в промышленных масштабах биомасса микроводоросли может представлять биологически ценный продукт, обогащенный полиненасыщенными жирными кислотами (5 % от сухой массы), так и фукоксантином (до 1-2 %) и другими каротиноидами [99, 149, 182, 224, 227, 245]. Эти вещества играют ключевую роль в здоровье человека [10, 224] и рассматриваются как основной компонент функционального питания.

В исследованиях японских и других ученых показано, что фукоксантин чрезвычайно активен. При потреблении продуктов с Фк отмечены положительные изменения в организме. Доказано, что Фк обладает такими свойствами, как снижение избыточного веса за счет образования митохондриального белка (UCP1) в белой жировой ткани, уменьшение уровня глюкозы в крови, благодаря синтезу докозагексаеновой омега-3 жирной кислоты. Особо следует отметить противоопухолевое действие фукоксантина на клетки лейкоза человека, рака простаты и молочной железы; при этом сам препарат не токсичен [99, 224].

С целью создания лечебно-профилактических продуктов нами разработан ряд технологий создания и хранения продуктов на основе биомассы *C. closterium* с высоким содержанием БАВ. При получении биомассы учитывали, что процессы роста и накопления ценных веществ у микроводоросли разобщены, поэтому использовали метод двухстадийной накопительной культуры [53].

## 5.1 Технология получения биомассы диатомовой водоросли с высоким содержанием фукоксантина

Для получения продукта был разработан и запатентован способ получения биомассы диатомовой водоросли *C. closterium* с высоким содержанием фукоксантина, который реализуется следующим образом [49]. Для интенсивного культивирования используют инокулят, который получен в течение 5-7 дней. Водоросль выращивали в накопительном режиме на среде 5F при освещении 6 клк и непрерывном барботаже воздухом ( $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$  культуры). Для засева культиваторов использовали активно делящуюся культуру, взятую на линейной стадии роста, когда её продуктивность максимальна. Суспензию клеток вносили в культиваторы из расчета, чтобы начальная плотность культур составляла не менее 0,1-0,2 г сухого вещества на 1 л культуры. Процесс культивирования *C. closterium* осуществляли на модифицированной нами питательной среде (таблица 5.1).

Микроводоросль выращивали в плоскопараллельных культиваторах с освещаемой поверхностью  $0,0425 \text{ м}^2$  и толщиной освещаемого слоя 5 см. При этом выход фукоксантина на стационарной фазе роста увеличивается и в конце стационарной фазы роста зависит от концентрации биогенных элементов в среде и толщины освещаемого слоя.

При данном способе выращивания в течение 15 суток с одного двухлитрового культиватора можно получить 30 г сырой массы с высоким содержанием фукоксантина ( $14,7 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$  сухой массы или  $38,76 \text{ мг}$  с литра культуры). Биомасса, полученная данным способом, содержит не только высокие концентрации Фк, но и имеет высокое содержание ПНЖК. Концентрация ПНЖК в биомассе в конце стационарной фазы роста достигает 52 % общих липидов или в пересчете на сухую биомассу 4 %. Следовательно, *C. closterium* является перспективным объектом для получения не только фукоксантина, но и ПНЖК.

Таблица 5.1 — Модифицированная питательная среда RS для накопительного культивирования диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*.

Компонент	Навеска, г·л <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	7,50
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> × 9H <sub>2</sub> O	3,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,50
Na <sub>2</sub> EDTA	0,872
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,63
NaMoO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,063
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,1
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,22
CoCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,1
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	0,18

Однако при разработке технологий производства различных продуктов возникает вопрос о сохранении фукоксантина в биомассе водорослей. Известно, что Фк способен разрушаться в биомассе микроводорослей под действием кислорода воздуха, как сильнейшего окислителя, а также под действием солнечных лучей и высокой температуры [265, 288]. Поэтому нами проведён ряд экспериментов, в которых выявлены сроки и условия хранения различных продуктов, содержащих Фк.

Первоначально установлено, что сырая биомасса *C. closterium* при комнатной температуре на свету не подлежит хранению, т. к. в течение суток в ней происходят процессы разложения органических веществ. Поэтому в дальнейшем с целью сохранения БАВ биомассу обезвоживали. Для этого сырую биомассу высушивали в термостате при температуре 37-38 °С в течение 18 ч до постоянного веса. При данном способе высушивания Фк практически не

разрушается, потери составляют 0,3-0,5 мг·г<sup>-1</sup><sub>сух.</sub>. Повышение температуры выше 40 °С в процессе высушивания биомассы приводит к разрушению фукоксантина и значительным его потерям [244].

Следующая цель нашего исследования – определить динамику разрушения фукоксантина в сухой биомассе в зависимости от температуры при хранении в темноте. Для оценки скорости разрушения Фк в сухой биомассе пробы хранили в темноте при комнатной температуре 24 °С и на холоде при 5 °С в течение пяти месяцев. Ниже представлена динамика разрушения Фк в сухой биомассе *C. closterium* при различной температуре за этот период времени (рисунок 5.1).

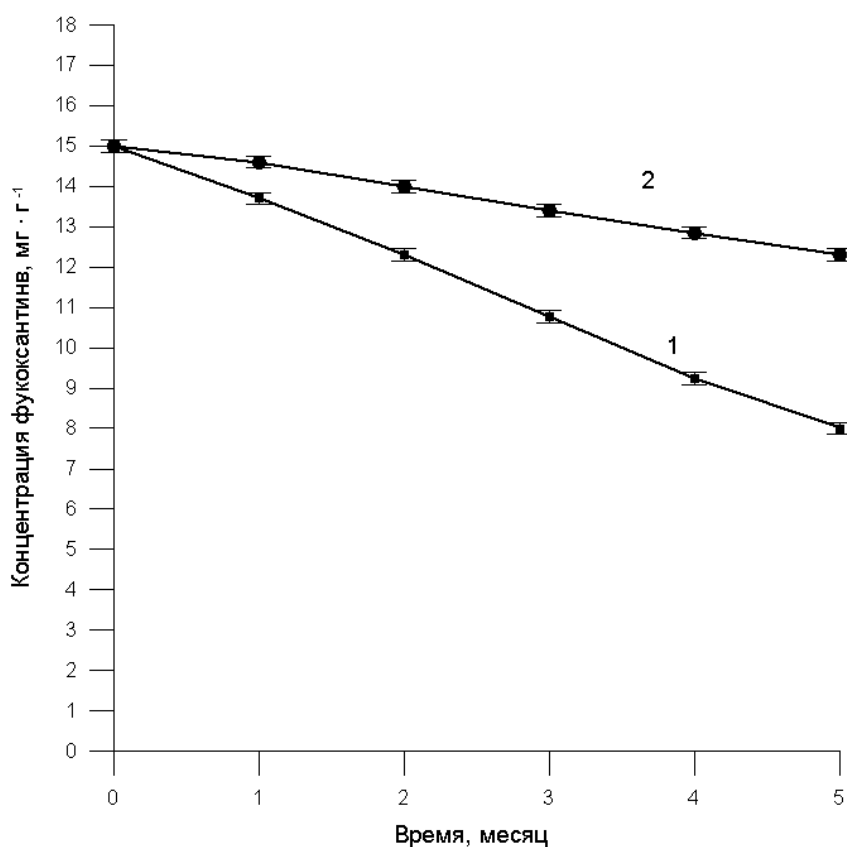


Рисунок 5.1 — Динамика разрушения фукоксантина в сухой биомассе диатомовой водоросли *Cyldrotheca closterium* при различной температуре: 1 – при 24 °С, 2 – при 5 °С

Из приведенных графиков видно, что температура сильно влияет на скорость разрушения фукоксантина в сухой биомассе. Так, при температуре 24 °С Фк разрушался со скоростью 0,047 мг·сут<sup>-1</sup>, а при 5 °С – 0,018 мг·сут<sup>-1</sup>. Таким образом, с понижением температуры хранения биомассы с 24 до 5 °С скорость разрушения Фк снижалась в три раза. Следовательно, потеря фукоксантина за пять месяцев в сухой биомассе при хранении в темноте при комнатной температуре (24 °С) составляла 47 %, а при температуре 5 °С – 18 %. Фукоксантин довольно быстро разрушается в сухой биомассе *C. closterium* даже при пониженной температуре, поэтому для его сохранения необходимо исключать доступ атмосферного кислорода, например, используя вакуумную упаковку.

Известно, что этиловый спирт является хорошим консервантом, поэтому было сделано предположение, что раствор фукоксантина в этом консерванте разрушаться не будет, и разработан биологически ценный продукт – спиртовой экстракт из биомассы диатомовой водоросли *C. closterium*.

## 5.2 Спиртовой экстракт из биомассы диатомовой водоросли

Обычно для экстракции фукоксантина из микроводорослей используют полярные растворители, такие как этанол, ацетон и др. [102, 204, 275, 280]. Для этих целей наибольшее предпочтение отдается этанолу, в связи с тем, что он используется в пищевой промышленности и не ядовит [61, 137, 162]. Для ускорения процесса экстракции температуру спирта повышают [163, 280], а для получения экстрактов Фк, освобождённых от других пигментов, используют различные приёмы, например, многократную экстракцию с различным временем процесса экстрагирования [162]. При этом основными целями являются: с одной стороны, максимальное извлечение Фк из биомассы, с другой – получение раствора с максимальной концентрацией Фк. Отметим также, что при работе с большими объёмами возможности использования различных приёмов экстрагирования Фк сужаются из-за высокой стоимости и продолжительности

процесса экстракции. Например, каждая процедура экстракции связана с последующим отделением супернатанта центрифугированием или фильтрованием.

Классические методы экстракции пигментов основаны на многократном извлечении пигментов малыми объёмами растворителя из биомассы [132, 204, 222]. Однако для экстракции фукоксантина из биомассы *C. closterium* такой подход неприемлем, поскольку, с одной стороны, Фк из сухой биомассы полностью извлечь практически не удаётся даже многократной экстракцией спиртом. С другой стороны, многократная экстракция Фк из сырой биомассы невозможна из-за разбавления спирта внутриклеточной водой, что снижает концентрацию спирта и делает невозможным экстракцию Фк [280]. Поэтому экстракцию фукоксантина проводили только из сырой биомассы *C. closterium*.

По нашим данным при температуре 20-25°C экстракция фукоксантина из сырой биомассы по истечении 18-24 ч прекращается. Достаточно длительное время экстракции Фк из сырой биомассы обусловлено тем, что панцирь микроводоросли в таких условиях не разрушается. Экстракция происходит благодаря тому, что кремнистый панцирь обладает перфорациями – системой отверстий створок, через которую происходит связь протопласта с внешней средой [98, 131, 138]. Поэтому для полного выхода фукоксантина из клеток необходимо большое количество этанола и длительное время (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Экстракция фукоксантина спиртом из сырой биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*.

Соотношение сырая масса (г) : спирт (мл)	Доля экстрагированного фукоксантина, % от общего содержания в клетках
1 : 5	64,8 %
1 : 8	85,7 %
1 : 10	98,8 %

Из таблицы 5.2 видно, что для полного извлечения Фк из клеток необходимо большое количество спирта. В результате экстракции получается водно-спиртовой раствор с достаточно низкой концентрацией Фк ( $0,04 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ). Ясно, что для больших масштабов данный способ экстракции малоэффективен.

Эффективность экстракции Фк можно повысить, удаляя внутриклеточную воду 50 % спиртом. Для этого необходимо к сырой биомассе добавить спирт в соотношении 1 : 1 и удерживать в течение 15 мин. Далее экстрагировать 96 % спиртом в течение 2 ч, что позволяет извлечь до 33 % Фк, а посредством последующей экстракции – до 60 % от общего его содержания в биомассе. В результате в объединенном водно-спиртовом растворе концентрация Фк достигает  $0,18 - 0,2 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . То есть, удаление внутриклеточной воды спиртом и последовательное экстрагирование Фк позволяет уменьшить расход спирта и повысить эффективность экстракции. Итак, для извлечения Фк из сырой биомассы *C. closterium* наиболее эффективной является экстракция 96 % спиртом после удаления внутриклеточной воды 50-75 % водно-спиртовым раствором.

При экстракции любых лабильных веществ важным моментом являются потери вещества во время хранения и экстракции. Нами проведен ряд экспериментов, демонстрирующих динамику разрушения фукоксантина в водно-спиртовом растворе (рисунок 5.2). Видно, что Фк в течение месяца в спирте разрушается с незначительной скоростью ( $0,01-0,02 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}\cdot\text{мес}^{-1}$ ), в то время как в сухой массе скорость разрушения достаточно высока даже при пониженной температуре (рисунок 5.1). Поэтому можно с уверенностью сказать, что экстракция фукоксантина спиртом не влечёт за собой его разрушения.

Таким образом, фукоксантин достаточно хорошо сохраняется в водно-спиртовом растворе длительное время. Незначительное разрушение фукоксантина возможно из-за проникновения кислорода из воздуха.

В спиртовой вытяжке помимо фукоксантина присутствуют хлорофиллы *a* и *c*, диадиноксантин, каротины и ПНЖК. Эти БАВ обладают антиоксидантной, иммунологической и противоопухолевой активностью [204].

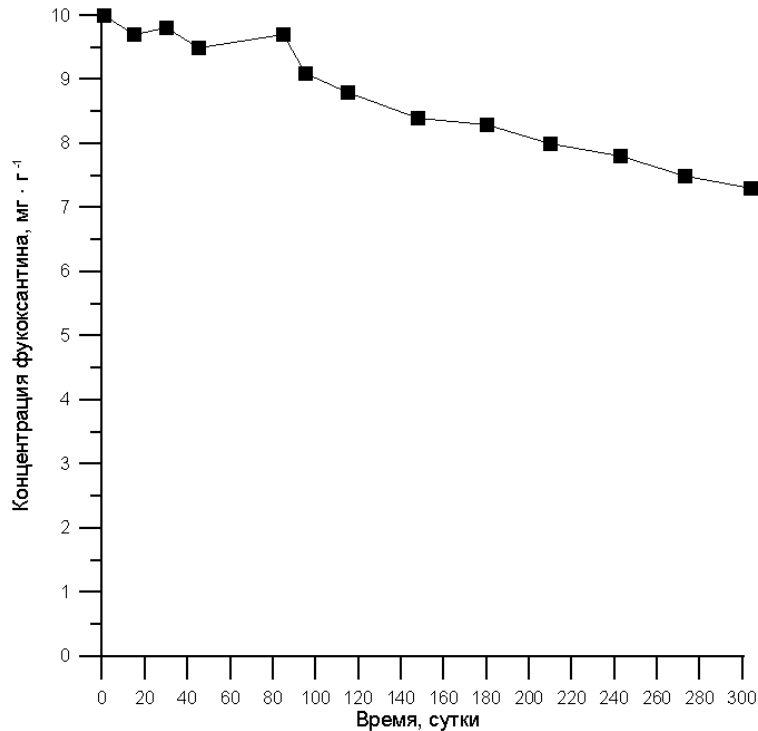


Рисунок 5.2 — Динамика разрушения фукоксантина в спирте при температуре 25 °С

Необходимо отметить, что спиртовые настойки, даже с высоким содержанием Фк, имеют противопоказания. Их нельзя принимать детям и беременным женщинам. Поэтому был разработан новый биологически активный продукт без этанола – растительное масло, насыщенное фукоксантином [32].

### 5.3 Способ обогащения растительного масла фукоксантином

Масло, обогащенное фукоксантином, в отличие от спиртовой вытяжки, не имеет побочных эффектов и возрастных ограничений. Данный продукт получен на основе сырой биомассы *C. closterium*. Для достижения полученной цели смешивают в определенном соотношении растительные масла, в частности оливковое масло, и спиртовую вытяжку, обогащенную Фк. Полученную смесь настаивают в течение 60 мин., а затем отделяют масляную фракцию. При

добавлении в растительное масло спиртовой вытяжки происходит перераспределение каротиноидов между двумя фракциями. При этом масло и спиртовая вытяжка не смешиваются, в масляную фракцию переходит только часть Фк, находящегося в спиртовой вытяжке. Процесс перераспределения фукоксантина между маслом и спиртом зависит от объёмного соотношения масла : спирт и проходит в течение часа.

Для получения масла, обогащённого Фк, оптимальным соотношением двух веществ - растительного масла, не содержащего каротиноиды, и спиртовой вытяжки, обогащенной Фк, является 5 : 1 (таблица 5.3). При объединении масло и спиртовая вытяжка не смешиваются, происходит процесс перераспределения Фк между спиртовой вытяжкой и маслом. При оптимальном соотношении 73 % Фк переходит в масло. Таким образом, получили функциональный продукт, в котором содержание Фк составляет от 0,1 до 0,2 мг на 1 мл масла.

Таблица 5.3 — Концентрация фукоксантина в масле и спиртовой вытяжке, обогащенной фукоксантином, при разных соотношениях двух фаз.

№ опыта	Соотношение спиртовая вытяжка : масло, мл	Концентрация фукоксантина в спиртовой вытяжке и в масле, %
1	5 : 1	89,5 : 9
2	1 : 2	38 : 53
3	2 : 1	76 : 22
4	1 : 1	60 : 27,5
5	1 : 5	26,4 : 73,2

Полученное масло характеризуется хорошими органолептическими показателями – приятным вкусом и ароматом, коричневым цветом с красноватым

оттенком, высоким содержанием фукоксантина, который повышает его биологическую ценность.

#### 5.4 Фукоксантин в кристаллической форме

Кроме получения БАВ для пищевой промышленности, фукоксантин нашел широкое применение в медицине. Однако при разработке новых медицинских препаратов на основе фукоксантина необходимо получить фукоксантин в кристаллической форме. Поэтому была поставлена цель – разработать полупромышленную технологию получения Фк из биомассы культивируемой *C. closterium* для дальнейшего его использования в медицине.

Сам способ получения фукоксантина в кристаллической форме подробно описан в главе 2. Фк экстрагировали из биомассы *C. closterium* спиртом. Затем добавляли дистиллированную воду в соотношении 1 : 2 и отделяли осадок центрифугированием. Процедуру повторяли до полного освобождения от хлорофиллов и других каротиноидов. На последней стадии полученную оранжево-красную фракцию Фк перекристаллизовали из диэтилового эфира – гексана или из хлористого метилена – гексана. Выделившиеся кристаллы Фк промывали гексаном и высушивали в потоке аргона.

Кристаллический Фк охарактеризовали методами масспектрометрии и ядерного магнитного резонанса. Соотношение транс- и цисизомеров Фк, полученное после перекристаллизации из диэтилового эфира, составляло 95 : 4. В то же время после перекристаллизации Фк из хлористого метилена соотношение изомеров составляло 99,0 : 0,5. Таким образом, разработана полупромышленная технология получения кристаллического Фк из биомассы диатомовой водоросли *C. closterium*.

С использованием этой технологии получено значительное количество (1 г) кристаллического фукоксантина, которое в дальнейшем может быть использовано для разработки противоопухолевых препаратов.

## 5.5 Полупромышленное культивирование диатомовой водоросли

По современным представлениям в природе обитает более 30000 видов микроводорослей [141]. Каждый вид обладает уникальными особенностями метаболизма и биохимического состава. Это дает широкие возможности в создании новых биотехнологий производства как самой биомассы микроводорослей, так и ценных органических соединений природного происхождения [51, 68, 73, 174]. Особый интерес для биотехнологии представляют морские микроводоросли, поскольку они способны синтезировать ряд физиологически активных соединений, аналогов которым нет ни у пресноводных микроводорослей, ни у высших растений, ни у других групп организмов [23, 27, 115, 147, 155].

Из всего разнообразия микроводорослей в промышленных масштабах используется не более двух десятков [27]. Такая ограниченность во многом обусловлена отсутствием высокопродуктивных систем культивирования с эффективным перемешиванием суспензии при малых затратах энергии. Так, широко используемые для промышленного культивирования микроводорослей фотобиореакторы типа «бассейн» характеризуются низкими затратами энергии для перемешивания, но малопродуктивны [33, 147]. Из-за неравномерности перемешивания суспензии такие фотобиореакторы не позволяют получать интенсивную культуру микроводорослей, у которых плотность клеток больше единицы, например, культуры бентосных видов. Высокопродуктивные фотобиореакторы вертикального типа требуют использования дорогостоящего оборудования, а также значительных затрат энергии для перемешивания культуры, более того, из-за проявления эффекта масштабирования затраты энергии возрастают непропорционально объёму суспензии микроводорослей [5, 33, 58].

Все имеющиеся на сегодняшний день промышленные фотобиореакторы можно разделить на две группы: фотобиореактор типа «бассейн» с различными вариациями (каналы, каскады, бассейны с уклоном для стекания суспензии) и

фотобиореактор вертикального типа (трубы, плоскопараллельный тип). Каждая конструкция обладает своими недостатками и преимуществами, но все они характеризуются тем, что перемешивание осуществляется за счет барботажа воздуха или работы механической мешалки, погруженной в суспензию. Использование мешалок для перемешивания в значительной степени сужает круг культивируемых объектов, поскольку являются достаточно травматичными для клеток многих видов микроводорослей. Перемешивание посредством барботажа воздуха достаточно затратное (не менее 1 Вт на 1 л суспензии). Кроме того, для плотной интенсивной культуры существенной проблемой является образование пены на поверхности суспензии.

Наиболее совершенной по эффектности, затратам энергии на перемешивание суспензии, массообмену, масштабированию, простоте конструкции и удобству в обслуживании является разработка новосибирских ученых – газовихревая система культивирования [7] (рисунок 5.3).



Рисунок 5.3 — Общий вид лабораторного газовихревого фотобиореактора, объём 5 л. Показано появление вихря в суспензии [7]

Важным отличием газовихревого фотобиореактора является то, что активное перемешивание осуществляется за счет создания над суспензией и внутри суспензии вихревых потоков («торнадо») посредством трения воздуха о поверхность суспензии. Такой способ перемешивания обладает рядом преимуществ:

1. Во всем объеме суспензии практически отсутствуют «мертвые» зоны, а также зоны локального завышения плотности суспензии. Клетки во всем объеме распределены равномерно.

2. Мощное придонное течение и восходящий поток в центре фотобиореактора позволяет получить интенсивную культуру любых неприкрепленных организмов, при этом потоки перемешивают культуру.

3. В плотной культуре микроводорослей на поверхности культуры практически не образуется пена за счет создания газового вихря над суспензией.

4. Вихревой способ перемешивания не является травматичным для клеток микроводорослей.

5. За счет трения потоков воздуха о поверхность культуры в значительной степени увеличивается массообмен кислорода и углекислоты между суспензией и атмосферой.

В настоящее время в мире не существует промышленных технологий выращивания морских бентосных микроводорослей, которые являются источником ценных БАВ для нужд фармакологии, химии, пищевой промышленности и т.д. В связи с этим, нами была поставлена цель - разработать промышленную технологию интенсивного культивирования бентопланктонной диатомеи *C. closterium* с использованием газовихревого фотобиореактора.

Культуру *C. closterium* адаптировали к разработанной нами ранее среде RS (таблица 5.1) на люминостае при температуре 15-18 °С и круглосуточном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40. После адаптации культуру использовали в качестве инокулята для накопительного культивирования в газовихревой системе культивирования. Объем суспензии в фотобиореакторе составлял 580 л, рабочий слой (высота суспензии) – 0,08 м, освещаемая поверхность – 7,3 м<sup>2</sup>. В качестве источника освещения использовали лампы ДРЛ-700, которые давали среднюю освещённость на поверхности культуры 7,1 клк. Эксперименты проводили при pH = 8-9. На протяжении всего процесса выращивания культуру непрерывно перемешивали за счет создания вихревых

потоков воздуха посредством вращения активатора с частотой 1200 об·мин<sup>-1</sup>. Затраты энергии на перемешивание составляли около 0,06 Вт·л<sup>-1</sup> суспензии. Общий вид промышленной газовихревой системы культивирования *C. closterium* представлен на рисунке 5.4.



Рисунок 5.4 — Общий вид промышленного газовихревого фотобиореактора

Ниже приведены две накопительные кривые с расчетом биогенных элементов в питательной среде на максимальную плотность культуры *C. closterium* 3 г·л<sup>-1</sup> и на 7 г·л<sup>-1</sup> сухой массы (рисунок 5.5). Из рисунка видно, что максимальная плотность культуры достигла расчетных величин, а максимальная продуктивность культуры составила 1,2 г·л<sup>-1</sup>.

В качестве источника углерода при накопительном культивировании использовали атмосферный углекислый газ без дополнительной подачи CO<sub>2</sub>, что в значительной степени упростило процесс культивирования. Таким образом, использование газовихревой системы культивирования позволило получить продуктивность культуры микроводорослей, превышающую в 3-4 раза показатели других систем культивирования [7]. Отделение биомассы от культуральной среды осуществляли посредством фильтрования суспензии через синтетическую

гидрофобную ткань. Высушивали биомассу в потоке теплого воздуха (30 °С). В результате 15 дней интенсивного культивирования было получено 3,5 кг сухой биомассы *C. closterium*.

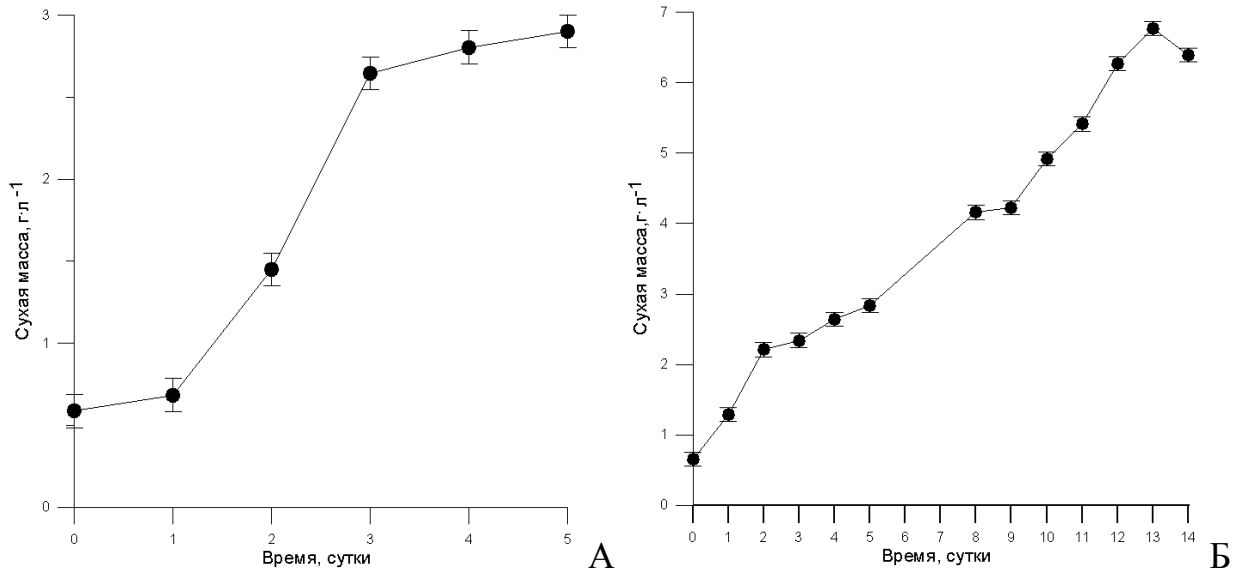


Рисунок 5.5 — Динамика плотности накопительной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* в газовихревом фотобиореакторе на питательной среде RS, рассчитанной на максимальную плотность культуры 3 г·л<sup>-1</sup> (А) и 7 г·л<sup>-1</sup> (Б)

При разработке технологии учитывали следующие особенности культуры:

1. *C. closterium* легко оседает на дно при выключении перемешивания, что позволяет концентрировать суспензию в 20 и более раз в течение 1-2 часов без затрат энергии.

2. Спектр поглощения культуры характеризуется максимальной шириной поглощения света (рисунок 5.6), что позволяет получать плотную интенсивную культуру при относительно малых облученностях.

3. Клетки *C. closterium* способны утилизировать световую энергию более эффективно в сравнении с планктонными видами, поэтому их продуктивность выше, в сравнении с другими видами микроводорослей.

4. Несмотря на то, что клетки *C. closterium* достаточно малы (6-20 мкм), при сгущении суспензии они агглютинируют и образуют конгломераты, что позволяет использовать фильтрацию, как наиболее дешёвый метод отделения биомассы от культуральной среды.

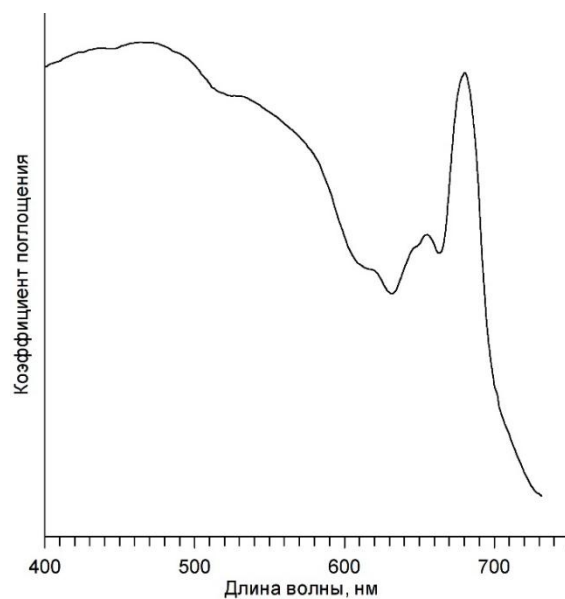


Рисунок 5.6 — Спектр поглощения культуры диатомовой водоросли *Cylandrotheca closterium*

Таким образом, впервые разработана полупромышленная технология производства биомассы диатомовой водоросли *C. closterium* с использованием газовыхревого фотобиореактора. В качестве источника углерода при накопительном культивировании использовали атмосферный  $\text{CO}_2$ .

**Заключение по главе 5.** Показано, что диатомею *Cylandrotheca closterium* можно рассматривать как перспективный объект для биотехнологии. На основе использования биомассы водоросли разработан ряд технологий получения целевых продуктов с высоким содержанием БАВ с целью дальнейшего создания

функциональных лечебно-профилактических продуктов. Разработаны технологические регламенты хранения *C. closterium*. Установлено, что сырая биомасса микроводоросли при комнатной температуре на свету не подлежит хранению, т.к. в течение суток в ней происходят процессы разложения органических веществ. Поэтому с целью сохранения БАВ биомассу необходимо обезвоживать.

В результате использования новой питательной среды разработаны технологические условия выращивания *C. closterium* с высоким содержанием фукоксантина (до 14,7 мг на 1 г сухой массы). Биомасса водоросли, полученная данным способом, содержит не только фукоксантин, но и имеет высокое содержание ПНЖК. Концентрация ПНЖК в биомассе в конце стационарной фазы роста достигает 52 % общих липидов или в пересчете на сухую биомассу 4 %. Экстракция фукоксантина спиртом не влечёт за собой его разрушения и Фк достаточно хорошо сохраняется в водно-спиртовом растворе длительное время. В спиртовой вытяжке помимо Фк присутствуют ПНЖК, хлорофиллы *a* и *c*, диадиноксантин и каротин. Разработан новый биологически активный продукт без спирта – растительное масло, насыщенное фукоксантином. Полученный продукт характеризуется хорошими органолептическими показателями – приятным вкусом и ароматом, коричневым цветом с красноватым оттенком, высоким содержанием Фк. Поскольку фукоксантин имеет хорошие перспективы применения в медицине, разработана полупромышленная технология получения Фк в кристаллической форме из биомассы культивируемой микроводоросли. В связи с отсутствием в настоящее время промышленных установок по выращиванию морских бентосных микроводорослей, разработана технологию интенсивного культивирования диатомеи *C. closterium* с использованием газовихревого фотобиореактора, работающего по принципу «торнадо». Использование такой системы культивирования позволило получить продуктивность культуры микроводоросли, превышающую в 3-4 раза показатели для других систем культивирования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ собственных и литературных данных показал, что диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* является перспективным, быстро возобновляемым источником фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот. Для стабильного непрерывного производства целевых веществ на основе микроводорослей, а также для управления их синтезом в самой биомассе целесообразно использовать проточную культуру. Однако данные по культивированию *C. closterium* в проточной культуре отсутствуют, а также как и исследования по выявлению влияния различных факторов среды на физиологические механизмы, определяющие скорости накопления ПНЖК и Фк в проточной культуре и, в частности, в двухступенчатом хемостате. Большая часть исследований культуры *C. closterium* проведены ранее в накопительном режиме на обеднённых питательных средах F/2 и F, что не позволяет получить плотную культуру, и не даёт полноценного понимания о потенциале диатомеи, продукционных и биохимических характеристиках, в частности скорости биосинтеза ПНЖК и фукоксантина.

Поэтому данное диссертационное исследование было направлено на получение интенсивной культуры *C. closterium* и проведение комплекса исследований биохимических и продукционных характеристик в интенсивной культуре. А также исследованию динамики накопления ценных веществ, как в накопительной, так и в проточной культуре. Для этого потребовалось разработать новую питательную среду RS, в которой получена интенсивная плотная культура на основе установленных потребностей диатомовой водоросли в основных биогенных элементах. Оптимальными для роста *C. closterium* в накопительной и проточной культуре является диапазон температур от 18 до 20 °С, освещённости 280-310 мкЕ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> и рН среды от 8,4 до 9,4. Существенным недостатком накопительного культивирования является необходимость в продолжительной стационарной фазе роста для получения биомассы с высоким содержанием

целевого продукта. Удержание культуры в длительной стационарной фазе роста приводит к трудно прогнозируемым процессам, в результате которых культура переходит в фазу отмирания. В качестве альтернативы накопительному культивированию нами предложено использовать проточное культивирование. В проточном двухступенчатом режиме показатели максимальной продуктивности липидов, фукоксантина и ПНЖК превышают в 2,4 раза аналогичные показатели при накопительном культивировании. В проточном режиме двухступенчатого хемостата при удельной скорости протока  $0,3 \text{ сут}^{-1}$  зафиксированы максимальные скорости биосинтеза ценных веществ: фукоксантина –  $6,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ; липидов –  $105,3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$  и ПНЖК –  $45,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ .

На основе использования биомассы диатомовой водоросли *C. closterium* с высоким содержанием Фк и ПНЖК разработан ряд технологий получения целевых продуктов с высоким содержанием ценных веществ для дальнейшего создания функциональных лечебно-профилактических продуктов.

Таким образом, диатомовая водоросль *C. closterium* – перспективный и удобный объект для биотехнологических исследований. Важным для исследований проточных культур является способность микроводоросли быстро оседать на дно фотобиореактора в отсутствие перемешивания, что позволяет проводить исследования культуры в условиях непропорционально проточного одноступенчатого и многоступенчатого режимов культивирования. Это направление является перспективным, поскольку такой режим культивирования позволяет более гибко управлять биосинтезом ценных веществ в биомассе микроводоросли посредством смены лимитирующих факторов, которые способствуют увеличению скоростей биосинтеза фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана новая питательная среда RS для получения интенсивной плотной культуры диатомовой водоросли *C. closterium* на основе установленных потребностей в основных биогенных элементах.
2. Оптимальными условиями для культивирования *C. closterium* являются: питательная среда RS, температура – 16-20 °С, поверхностная облученность – 280-310 мкЕ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, рН – 8,4-9,4.
3. Максимальная продуктивность *C. closterium* в одно- и двухступенчатом хемостате отмечена при скорости протока 0,59 сут<sup>-1</sup> и составляет 1,34 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup> и 1,49 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. Максимальные скорости биосинтеза фукоксантина, липидов и ПНЖК в двухступенчатом хемостате зафиксированы при удельной скорости протока 0,3 сут<sup>-1</sup>.
4. Обнаружена линейная зависимость между концентрациями общих липидов и фукоксантина (в диапазоне от 0 до 10 мг·г<sup>-1</sup>) в биомассе *C. closterium* при различных условиях проточного и накопительного культивирования.
5. Производительность проточной системы культивирования *C. closterium* в 2,2 раза выше накопительной. Скорость биосинтеза фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот в двухступенчатом хемостате превышает в 2,4 раза аналогичные показатели при накопительном культивировании. При различных режимах культивирования выявлено преобладание ω3 полиненасыщенных жирных кислот в биомассе *C. closterium*. Соотношение ω-6/ω-3 варьирует от 0,57 до 0,89.
6. Разработаны новые технологии получения целевых продуктов лечебно-профилактического назначения из биомассы и БАВ *C. closterium*: биомасса с высоким содержанием фукоксантина и ПНЖК как биологически ценный продукт; спиртовой экстракт БАВ; оливковое масло, обогащённое фукоксантином; кристаллический фукоксантин.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АО – антиоксиданты;

АФК (ROS) – активные реакционноспособные виды кислорода;

БАВ – биологически активные вещества;

ЖК – жирные кислоты;

МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин;

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты;

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот;

НЖК – насыщенные жирные кислоты;

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты;

ТАГ – триацилглицериды;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

ТМ – тилакоидные мембраны;

УФ – ультрафиолетовое излучение;

ФАР – фотосинтетически активная радиация;

Фк, Fx – фукоксантин;

ЭПК – эйкозапентаеновая кислота;

ЭПС – экзополисахариды;

Ах – атероксантин;

АТР – аденозитрифосфат;

Chl *a* и Chl *c* – хлорофилл *a* и хлорофилл *c*;

Ddx – диадиноксантин

DdxC – диадиноксантиновый цикл;

Dtx – диатоксантин;

DtxC – диадиноксантиновый цикл;

FCPs – фукоксантин - хлорофилл *a/c* светособирающие белковые комплексы;

Fd-NIR – ферредоксин зависимая нитритредуктаза;

Gln – глутамин;

Glu – глутамат;

GS-GOGAT-глутамин – глутамат-синтазный цикл или цикл мочевины;

LHCs – светособирающие комплексы;

LHCI – светособирающий комплекс фотосистемы I;

LHCII – светособирающий комплекс фотосистемы II;

NADH – нитратредуктаза;

NADP – никотинамидаденин динуклеотид фосфат;

NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции;

NR – нитратредуктаза;

PA – фотосинтетический аппарат;

PSI – фотоокислительная фотосистема I;

PSII – фотоокислительная фотосистема II;

RC – реакционный центр;

VDE – виолаксантин де-эпоксидаза;

Vx – виолаксантин;

VxC – виолаксантиновый цикл;

Zx – зеаксантин.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барсуков В.И. Пламенно - эмиссионные и атомно - абсорбционные методы анализа и инструментальные способы повышения их чувствительности / В.И. Барсуков. - Москва: Машиностроение - 1, 2004. - 172 с.
2. Белянин В.Н. Рост водоросли *Playmonas viridis* в опытах по оптимизации микроэлементного состава среды / В.Н. Белянин, Р.П. Тренкеншу, В.А. Силкин // Биология моря. - 1979. - № 4. - С. 14 – 19.
3. Белянин В.Н. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей [Текст]: монография / В.Н. Белянин, Ф.Я. Сидько, Р.П. Тренкеншу. Новосибирск: Наука, 1980. - 136 с.
4. Бондаренко А.В. Диатомовые водоросли бентоса Крымского побережья Азовского моря / А.В. Бондаренко, Л.И. Рябушко // Современные проблемы альгологии и VII школа по морской биологии: материалы международной научной конференции, Ростов - на - Дону, 9 - 13 июня 2008 г. – Ростов – на - Дону, 2008. - С. 61–63.
5. Волова Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. - Новосибирск: СО РАН, 1999. - 252 с.
6. Геворгиз Р.Г. Оценка плотности культуры фототрофных микроорганизмов методом йодатной окисляемости / Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова, Л.Л. Никонова, Н.И. Бобко, М.В. Нехорошев. - Севастополь: ФБГУН ИМБИ, 2015. - 31 с.
7. Геворгиз Р.Г. Промышленная технология производства биомассы морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin с использованием газовихревого фотобиореактора / Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова, Ю.В. Зозуля, И.П. Уваров, А.П. Репков, А.С. Лелеков // Актуальные вопросы биологической физики и химии. - 2016. - № 1-1. - С. 73-77.
8. Геворгиз Р.Г. Количественное определение массовой доли суммарных белков в воздушно-сухой биомассе микроводорослей методом Лоури: учебно-

методическое пособие / Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова, М.В. Нехорошев. ФБГУН ИМБИ. - Севастополь, 2017. - 43 с.

9. Гительзон И.И. Максимальная скорость размножения бактерий и возможность её определения / И.И. Гительзон, А.М. Фиш, Р.И. Чумакова, А.М. Кузнецов // ДАН СССР. - 1973. - Т. 211, №. 6. - С. 1453- 1455.

10. Гладышев М.И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты и их пищевые источники для человека / М.И. Гладышев // Journal of Siberian Federal University. Biology. - 2012 - Vol. 5, iss. 4. - P. 352-386.

11. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2018 году». Москва: Минприроды России; НПП «Кадастр», 2019. - 844 с.

12. Гусяков Н.Е. Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Черного моря и прилегающих водоемов / Н.Е. Гусяков, О.А. Закордонец, В.П. Герасимюк. - Киев: Наук. думка, 1992. - 115 с.

13. Железнова С.Н. Зависимость продуктивности интенсивной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin от концентрации биогенных элементов в питательной среде / С.Н. Железнова, Р.Г. Геворгиз, В.И. Рябушко // Экологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление прибрежной зоной: материалы молодежной научно-практической конференции, 29 сент. - 5 окт. 2014 г. - Севастополь, 2014а. - С. 48-50.

14. Железнова С.Н. Интенсивная культура диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin / С.Н. Железнова, Р.Г. Геворгиз // Вопросы современной альгологии. - 2014б. - № 1 (5).

15. Железнова С.Н. Питательная среда для интенсивной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin - перспективного объекта биотехнологий /С.Н. Железнова, Р.Г. Геворгиз, Н.И. Бобко, А.С. Лелеков // Актуальная биотехнология. - 2015. - Т. 14, № 3. - С. 46 - 48.

16. Железнова С.Н. Способ получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* / С.Н. Железнова, Р.Г. Геворгиз, В.И. Рябушко: пат. на изобретение 2582182 Российская Федерация; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН». Севастополь, заявка. № 2014138859, заявлено 25.09.2014. Положительное решение на выдачу патента на изобретение от 18.01.2016 г.; опубл. 04.2016. Бюл. № 11
17. Кейтс М. Техника липидологии: выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. Пер. с англ. д-ра хим. наук В.А. Вавера. - Москва: Мир, 1975. – 322 с.
18. Киселев И.А. Состав и распределение фитопланктона в Амурском Лимане / И.А. Киселев // Исследование морей СССР. - 1931. - Т. 14. - С. 31–79.
19. Куприянова Е.В. СО<sub>2</sub>-концентрирующий механизм и его особенности у галоалкалофильных цианобактерий / Е.В. Куприянова, О.С. Самылина // Микробиология. - 2015. - Т. 84, № 2. - С. 144–159.
20. Ланская Л.И. Культивирование микроводорослей / Л.И. Ланская // Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур) / Ред. Хайлова К.М. - Киев: Наукова думка, 1971. - С. 3-21.
21. Левич А. П. Процесс «потребление – рост» в культурах микроводорослей и потребности клеток в компонентах минерального питания / А. П. Левич, Н. В. Ревкова, Н. Г. Булгаков // Экологический прогноз / Ред. В. Н. Максимова. - Москва: Изд-во МГУ, 1986. - С. 132 – 139.
22. Лелеков А.С. Оценка коэффициента абсорбции углерода культурой *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross / А.С. Лелеков, И.Н. Гудвилевич, Р.Г. Геворгиз, Р.П. Тренкеншу, А.О. Бадисова // Морские биологические исследования: достижения и перспективы: в 3-х т.: сб. материалов Всероссийской научно - практической конференции с международным участием, приуроченной к 145 - летию Севастопольской биологической станции, Севастополь, 19 - 24 сентября 2016 г. Севастополь, 2016. Т. 3. - С. 404–407.

23. Макарова Е.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем / Е.И. Макарова, И.П. Отурина, А.И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. - 2009. - Вып. 20. - С. 120 - 133.
24. Метод IP 470/03. Определение алюминия, кремния, ванадия, никеля, железа, кальция, цинка и натрия в остаточных топливах озолением, сплавлением и атомно-абсорбционной спектрометрией / Сборник методик IP, 2003. - С. 12.
25. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов: учеб-метод., пособие / В.В. Сапожников. - Москва: ВНИРО, 1988. - С. 119.
26. Методы физиолого - биохимического исследования водорослей / Л.А. Сиренко, А.И. Сакевич, Л.Ф. Осипов, Л.Ф. Лукина, М.И. Кузьменко, В.Н. Козицкая, И.М. Величко, В.О. Мыслович, М.Я. Гавриленко, В.В. Арендарчук, Ю.А. Кирпенко // Методы физиолого - биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. - Киев: Наукова думка, 1975. - С. 75 – 212.
27. Минюк Г.С. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор / Г.С. Минюк, И.В. Дробецкая, И.Н. Чубчикова, Н.В. Терентьева // Морський екологічний журнал. - 2008. - Т. 7, № 2. - С. 5 - 23.
28. Морозова-Водяницкая Н.В. Фитопланктон Черного моря. Ч. 1 / Н.В. Морозова-Водяницкая // Труды Севастопольской биологической станции. - 1948. - Т. 4. - С. 39 - 172.
29. Непрерывное культивирование микроорганизмов: Пер. с англ. / Ред. И. Малек, З. Фенцль. - Москва: Пищевая промышленность, 1968. - 546 с.
30. Нестерова Д.А. «Цветение» воды в северо-западной части Черного моря (Обзор) / Д.А. Нестерова // Альгология. - 2001. – Т. 11, №4. - С. 502—513.
31. Нехорошев М.В. Культивируемые водоросли – коммерческий источник антиоксидантов / М.В. Нехорошев, В.И. Рябушко, С.Н. Железнова, Р.Г. Геворгиз // Российский биотерапевтический журнал. - Т. 15, №1. - 2016. - С. 74.
32. Нехорошев М.В. Способ обогащения растительного масла фукоксантином / М.В. Нехорошев, Р.Г. Геворгиз, В.И. Рябушко, С.Н. Железнова:

пат. на изобр. 2629276 Российская Федерация. МПК А23D 9/00; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН». Севастополь., заявка. № 2016114635, заявлено 14.04.2016; опубл.28.08.2017 Бюл. № 25.

33. Онищенко Е.М. К вопросу о путях повышения эффективности наземных открытых систем культивирования микроводорослей / Е.М. Онищенко // Живые и биокосные системы. - 2015. - № 14.

34. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С.Дж. Перт / Пер. с англ. Т.А. Петровой, И.Н. Позмоговой; Ред. И.Л. Работнова - Москва: Мир, 1978. - 330 с.

35. Пицык Г.К. О качественном составе фитопланктона Азовского моря / Г.К. Пицык // Труды Севастопольской биологической станции. - 1963. - Т. 16. - С. 71–89.

36. Прошкина -Лавренко А.И. Диатомовые водоросли планктона Черного моря / А.И. Прошкина -Лавренко. - Москва; Ленинград: Изд - во АН СССР, 1955. - 222 с.

37. Прошкина -Лавренко А.И. Диатомовые водоросли бентоса Черного моря / А.И. Прошкина -Лавренко. - Москва; Ленинград: Изд-во АН СССР, 1963а. - 243 с.

38. Прошкина-Лавренко А.И. Диатомовые водоросли планктона Азовского моря / А.И. Прошкина-Лавренко. - Москва ; Ленинград: АН СССР, 1963б. - 190 с.

39. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры / Под ред. А.И. Агатовой. - Москва: ВНИРО, 2004. - 123 с.

40. Руководство по химическому анализу морских и пресных вод при экологическом мониторинге рыбохозяйственных водоемов и перспективных для

промысла районов Мирового Океана / Под ред. В.В. Сапожникова. - Москва: ВНИРО, 2003. - 202 с.

41. Рябушко В.И. Микрофитобентос Чёрного моря: продуктивность сообщества микрофитобентоса твердых грунтов прибрежной зоны Чёрного моря и её адаптационный потенциал в условиях переменных факторов внешней среды / В.И. Рябушко, М.Ю. Алеев, Л.И. Рябушко, Р.И. Ли // Микроводоросли Чёрного моря: проблемы биоразнообразия, сохранения и биотехнологического использования. - Севастополь: ЭКОСИ – Гидрофизика. - 2008. - С. 50 – 59.

42. Рябушко В.И. Среда для интенсивного культивирования *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (Bacillariophyta) / В.И. Рябушко, С.Н. Железнова, Р.Г. Геворгиз, Н.И. Бобко, А.С. Лелеков // Альгология. - 2016а. - Т. 26, № 3. - С. 237-247.

43. Рябушко Л.И. Микрофитообрастания искусственных и природных субстратов в Черном море / Л.И. Рябушко, С.Е. Завалко // Ботанический журнал - 1992. - Т.77, № 5. - С. 33-39.

44. Рябушко Л.И. Потенциально опасные микроводоросли Азово-Черноморского бассейна: моногр. / Л.И. Рябушко. - Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. - 286 с.

45. Рябушко Л.И. Биоразнообразие и продуктивность микрофитобентоса Чёрного моря / Л.И. Рябушко, М.Ю. Алеев, В.И. Рябушко // Проблемы биологической океанографии XXI века, посвященная 135-летию Ин-та биологии южных морей: материалы Международной научной конференции, Севастополь, 19 - 21 сентября, 2006., г. Севастополь, 2006. - 80 с.

46. Рябушко Л.И. Микроводоросли планктона и бентоса Азовского моря (чек-лист, синонимика, комментарий) / Л.И. Рябушко, А.В. Бондаренко / под ред. А.В. Гаевской. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. - 211 с.

47. Рябушко Л.И. Микрофитобентос Чёрного моря /Л.И. Рябушко / ред. А.В. Гаевская. - Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2013. - 416 с.

48. Рябушко Л.И. Диатомовые водоросли микрофитобентоса Японского моря: моногр / Л.И. Рябушко, А.А.Бегун. - Севастополь: КИА, 2016б. - Т. 2. - 322 с.
49. Рябушко В.И. Способ получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* с повышенным содержанием фукоксантина / В.И. Рябушко, Р.Г. Геворгиз, М.В. Нехорошев, С.Н. Железнова: пат. на изобр. 2655221 Российская Федерация. МПК A01G 33/00 (2006.01); C12N 1/12 (2006.01); заявитель и патентообладатель Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН; № 2016134855; заявл. 25.08.2016; опубл. 24.05.2018, Бюл. № 15.
50. Скопинцев Б.А. Формирование современного химического состава вод Чёрного моря / Б.А. Скопинцев. - Ленинград: Гидрометеиздат, 1975. - 336 с.
51. Сиренко Л.А. Каротиноиды гидробионтов / Л.А. Сиренко, Т.В. Паршикова // Экология моря. - Вып. 67. – 2005. - С. 63 – 67.
52. Сонненфелд П. Рассолы и эвапориты: Пер. с англ. / П. Сонненфелд. - Москва: Мир, 1988. - 480 с.
53. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 2. Квазинепрерывная культура / Р.П. Тренкеншу // Экология моря. - 2005. - Вып. 67. - С. 98 - 110.
54. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 6. Предельные скорости роста / Р.П. Тренкеншу // Экология моря. - 2010. - Спец. вып. 80. - С. 85 - 91.
55. Тренкеншу Р.П. Динамическая модель биотрансформации резервных и структурных форм биомассы микроводорослей в темноте / Р.П. Тренкеншу // Вопросы современной альгологии. - 2016. - № 2 (12). - С. 1 - 12.
56. Фенцл Э. Теоретический анализ систем непрерывных культур / Э. Фенцл // Непрерывное культивирование микроорганизмов. - Пер. с англ. - Москва: Пищевая промышленность, 1968, с. 64 - 150.
57. Хорн Р.А. Морская химия (структура воды и химия гидросферы): Пер. с англ. / Р.А. Хорн. - Москва: Мир, 1972. - 400 с.

58. Цоглин Л.Н. Биотехнология микроводорослей / Л.Н. Цоглин, Н.А. Пронина - Москва: Научный мир, 2012. - 184 с.
59. Шнюкова Е.И. Экзополисахариды Bacillariophyta. Обзор / Е.И. Шнюкова, Е.К. Золотарева // *Algologia*. - 2015. - Т. 25, №1. - С. 3 - 20.
60. Abdo S.M. Potential production of omega fatty acids from microalgae / S.M. Abdo, G.H. Ali, F.K. El-Baz // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. - 2015. - Vol. 34, iss. 2. - P. 210 - 215.
61. Abu-Ghannam N. Seaweed carotenoid fucoxanthin as functional food / N. Abu-Ghannam, E. Shannon // *Microbial functional foods and nutraceuticals* // Eds. V. K. Gupta, H. Treichel, V. Shapaval, L. Antonio de Oliveira, M. G. Tuohy. - Chichester, UK, 2017. - Chapter 3. - P. 39 - 64.
62. Affan A. Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium* / A. Affan, S.-J. Heo, Y.-J. Jeon, J.-B. Lee // *Journal of Phycology*. - 2009. - Vol. 45, iss. 6. - P. 1405 - 1415.
63. Ahad F. Iodine, iodine metabolism and iodine deficiency disorders revisited / F. Ahad, S.A. Ganie // *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. - 2010. - Vol. 14, iss. 1. - P. 13 - 17.
64. Allen A.E. An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms / A.E. Allen, A. Vardi, C. Bowler // *Current Opinion in Plant Biology*. - 2006. - Vol. 9, iss. 3. - P. 264 - 273.
65. Allen A.E. Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms / A.E. Allen, C.L. Dupont, M. Oborník, A. Horák, A. Nunes-Nesi, J.P. McCrow, H. Zheng, D.A. Johnson, H. Hu, A.R. Fernie, C. Bowler // *Nature*. - 2011. - Vol. 473, iss. 7346. - P. 203 - 207.
66. Anderson L.A. On the hydrogen and oxygen-content of marine phytoplankton / L.A. Anderson // *Deep - Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. - 1995. - Vol. 42, iss. 9. - P. 1675 - 1680.
67. Andersson M.G.I. Uptake of dissolved inorganic nitrogen, urea and amino acids in the scheldt estuary: comparison of organic carbon and nitrogen uptake / M.G.I.

Andersson, P. Van Rijswijk, J.J. Middelburg // *Aquatic Microbial Ecology*. - 2006. - Vol. 44, iss. 3. - P. 303 - 315.

68. Andrade L.M. *Chlorella* and *spirulina* microalgae as sources of functional foods, nutraceuticals, and food supplements; an overview / L.M. Andrade, C.J. Andrade, M. Dias, C.A.O. Nascimento, M.A. Mendes // *MOJ Food Processing & Technology*. - 2018. - Vol. 6, iss. 1. - P. 45 - 58.

69. Antonyak H.L. Iodine in abiotic and biotic environments / H.L. Antonyak, N.E. Panas, O.I. Pershyn, A.I. Polishchuk, N.K. Hoyvanovych // *Studia Biologica*. - 2018. - Vol. 12, iss. 2. - P. 117 - 134.

70. Asztalos I.B. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular disease risk factors: a randomized clinical trial / I.B. Asztalos, J.A. Gleason, S. Sever, R. Gedik, B.F. Asztalos, K.V. Horvath, M.L. Dansinger, S. Lamon-Fava, E.J. Schaefer // *Metabolism*. - 2016. - Vol. 65, iss. 11. - P. 1636 - 1645.

71. Aziz M.A. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review / M.A. Aziz, K.A. Kassim, Z. Shokravi, F.M. Jakarni, H.Y. Liu, N. Zaini, L.S. Tan, A.B.M. S. Islam, H. Shokravi // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. - 2020. - Vol. 119. - P. 1 - 15.

72. Baldisserotto C. Biological aspects and biotechnological potential of marine diatoms in relation to different light regimens / C. Baldisserotto, A. Sabia. L. Ferroni, S. Pancaldi // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. - 2019. - Vol. 35, iss. 2. - P. 1 - 9.

73. Barrow C. Marine nutraceuticals and functional foods / C. Barrow / Ed. C. Barrow, F. Shahidi. - London: Taylor & Francis, 2008. - 105 pp.

74. Benoiston A.-S. The evolution of diatoms and their biogeochemical functions / A.-S. Benoiston<sup>1</sup>, F.M. Ibarbalz, L. Bittner, L. Guidi, O. Jahn, S. Dutkiewicz, C. Bowler // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. - 2017. - Vol. 372, iss. 1728. - P. 1 - 10.

75. Berges J. Minireview: algal nitrate reductases / J. Berges // *European Journal of Phycology*. - 1997. - Vol. 32, iss. 1. - P. 3 - 8.

76. Berges J.A. Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) / J.A. Berges, D.E. Varela, P.J. Harrison // Marine Ecology Progress Series. - 2002. - Vol. 225. - P. 139 - 146.
77. Bertrand M. Carotenoid biosynthesis in diatoms / M. Bertrand // Photosynthesis Research. - 2010. - Vol. 106, iss. 1 - 2. - P. 89 - 102.
78. Biswas H. Effects of iron availability on pigment signature and biogenic silica production in the coastal diatom *Chaetoceros gracilis* / H. Biswas, D. Bandyopadhyaya // Advances in Oceanography and Limnology. - 2013. - Vol. 4, iss. 1. - P. 20 - 42.
79. Blasco D. Effect of ammonium on the regulation of nitrate assimilation in natural phytoplankton populations / D. Blasco, H.L. Conway // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. - 1982. - Vol. 61, iss. 2. - P. 157 - 168.
80. Bluhm K. Transformation of iodate to iodide in marine phytoplankton driven by cell senescence / K. Bluhm, P. Croot, K. Wuttig, K. Lochte // Aquatic Biology. - 2010. - Vol. 11. - P. 1 - 15.
81. Bodeanu N. Structure et dynamique de falgoflore unicellulaire dans les eaux du Littoral Roumain de la mer Noire / N. Bodeanu // Cercetari Marine "Recherches Marines". - 1987-1988. - №. 20/21. - P. 19 - 251.
82. Bohórquez J. Different types of diatom-derived extracellular polymeric substances drive changes in heterotrophic bacterial communities from intertidal sediments / J. Bohórquez, T.J. McGenity, S. Papaspyrou, E. García-Robledo, A. Corzo, G.J.C. Underwood // Frontiers in Microbiology. - 2017. - Vol. 8, iss. 245. - P. 1 - 16.
83. Bojko M. Diadinoxanthin de-epoxidation as important factor in the short-term stabilization of diatom photosynthetic membranes exposed to different temperatures / M. Bojko, M. Olchawa-Pajor, R. Goss, S. Schaller-Laudel, K. Strzałka, D. Latowski // Plant Cell and Environment. - 2018. - Vol. 42, iss. 4. - P. 1 - 59.

84. Bressler S.L. Detection of glutamine synthetase activity in marine phytoplankton: optimization of the biosynthetic assay / S.L. Bressler, S.I. Ahmed // *Marine Ecology Progress Series*. - 1984. - Vol. 14 - P. 207 - 217.
85. Bromke M.A. Amino acid biosynthesis pathways in diatoms / M.A. Bromke // *Metabolites*. - 2013. - Vol. 3, iss. 2. - P. 294 - 311.
86. Brouwer J.F.C. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) / J.F.C. Brouwer, L.J. Stal // *Journal of Phycology*. - 2002. - Vol. 38, iss. 3. - P. 464 - 472.
87. Brown M.R. The amino acid and gross composition of marine diatoms potentially useful for mariculture / M.R. Brown, S.W. Jeffrey // *Journal of Applied Phycology*. - 1995. - Vol. 7, iss.6. - P. 521 - 527.
88. Brzezinski M.A. Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms / M.A. Brzezinski, R.J. Olson, S.W. Chisholm // *Marine Ecology Progress Series*. - 1990. - Vol. 67. - P. 83 - 96.
89. Büchel C. Functional proteomics of light-harvesting complex proteins under varying light-conditions in diatoms / C. Büchel, C. Wilhelm, V. Wagner, M. Mittag // *Journal of Plant Physiology*. - 2017. - Vol. 217. - P. 38–43.
90. Büchel C. Light-Harvesting complexes of diatoms: fucoxanthin-chlorophyll proteins / C. Büchel // *Photosynthesis in algae: biochemical and physiological mechanisms* / Eds. A.W. D. Larkum, A.R. Grossmann, J.A. Raven. – Switzerland, 2020. – P. 441 – 457.
91. Bule M.H. Microalgae as a source of high-value bioactive compounds / M.H. Bule, I. Ahmed, F. Maqbool, M. Bilal, H.M.N. Iqbal // *Frontiers in Bioscience*. - 2018. - Vol. 10, iss. 1. - P. 197 - 216.
92. Chen C. Accumulation of free amino acids in marine diatom resting cells during rejuvenation / C. Chen, Q. Li, Q. Zhou, L. Sun, M. Zheng, Y. Gao // *Journal of Sea Research*. - 2014. - Vol. 85. - P. 483 - 490.
93. Chilton F.H. Diet-gene interactions and PUFA metabolism: a potential contributor to health disparities and human diseases / F.H. Chilton, R.C. Murphy, B.A.

Wilson, S. Sergeant, H. Ainsworth, M.C. Seeds, R.A. Mathias // *Nutrients*. - 2014. - Vol. 6, iss. 5. - P. 1993 - 2022.

94. Chilton F.H. Precision nutrition and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: a case for personalized supplementation approaches for the prevention and management of human diseases / F.H. Chilton, R. Dutta, L.M. Reynolds, S. Sergeant, R.A. Mathias, M.C. Seeds // *Nutrients*. - 2017. - Vol. 9, iss. 11. - P. 1 - 26.

95. Chino Y. Formation of the adult rudiment of sea urchins is influenced by thyroid hormones / Y. Chino, M. Saito, K. Yamasu, T. Suyemitsu, K. Ishihara // *Developmental Biology*. - 1994. - Vol. 161, iss. 1. - P. 1 - 11.

96. Chung T.W. Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells / T.W. Chung, H.J. Choi, J.Y. Lee, H.S. Jeong, C.H. Kim, M. Joo, J.Y. Choi, C.W. Han, S.Y. Kim, J.S. Choi, K.T. Ha // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2013. - Vol. 439, iss. 4. - P. 580 - 585.

97. Courtois de Viçose G. Effects of density on growth rates of four benthic diatoms and variations in biochemical composition associated with growth phase / G. Courtois de Viçose, A. Porta, M.P. Viera, H. Fernández-Palacios, M.S. Izquierdo // *Journal of Applied Phycology*. - 2012. - Vol. 24, iss. 6. - P. 1427 - 1437.

98. Crawford R.M. The siliceous components of the diatom cell wall and their morphological variation / R. M. Crawford // *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems* / Eds. T.L. Simpson, B.E. Volcani. - Springer, New York, NY, 1981. - P. 129 - 156.

99. Das S.K. Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down regulation of cyclin D / S.K. Das, T. Hashimoto, K. Kanazawa // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2008. - Vol. 1780, iss. 4. - P. 743 - 749.

100. De la Cuesta J.L. Iodine assimilation by marine diatoms and other phytoplankton in nitrate-replete conditions / J.L. de la Cuesta, S.L. Manley // *Limnology and Oceanography*. - 2009. - Vol. 54. - P. 1653 - 1664.

101. Demirel Z. Fatty acid profile and lipid content of *Cylindrotheca closterium* cultivated in air-lift photobioreactor / Z. Demirel, E. Imamoglu, M. Conk Dalay //

Journal of Chemical Technology & Biotechnology. - 2015. - Vol. 90, iss. 12. - P. 2290 - 2296.

102. Derwenskus F. Pressurized extraction of unsaturated fatty acids and carotenoids from wet *Chlorella vulgaris* and *Phaeodactylum tricornutum* biomass using subcritical liquids / F. Derwenskus, F. Metz, A. Gille, U. Schmid-Staiger, K. Briviba, U. Schließmann, T. Hirth // *Global Change Biology Bioenergy*. - 2018. - Vol. 11. - P. 335 - 344.

103. De Tommasi E. Diatom frustule morphogenesis and function: a multidisciplinary survey / E. De Tommasi, J. Gielis, A. Rogato // *Marine Genomics*. - 2017. - Vol. 35. - P. 1 - 18.

104. Dibois M. Colometric method for determination of sugars and related substances / M. Dibois, K. A. Gilles, Y. K. Hamilton, P. A. Reber, F. Smith // *Analytical Chemistry*. - 1956. - Vol. 28, iss 3. - P. 350 - 356.

105. D'Ippolito G. Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production / G. D'Ippolito, A. Sardo, D. Paris, F.M. Vella, M.G. Adelfi, P. Botte, C. Gallo, A. Fontana // *Biotechnology for Biofuels*. - 2015. - Vol. 8, iss 1. - P. 1 - 10.

106. Domingues N. Response of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to photooxidative stress resulting from high light exposure / N. Domingues, A.R. Matos, J. Marques da Silva, P. Cartaxana / Ed. S. Lin // *PloS One*. - 2012. - Vol. 7, iss. 6. - P. 1 - 6.

107. Dong H.P. High light stress triggers distinct proteomic responses in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* / H.P. Dong, Y.L. Dong, L. Cui, S. Balamurugan, J. Gao, S.H. Lu, T. Jiang // *BMC Genomics*. - 2016. - Vol. 17, iss. 1. - P. 1 - 14.

108. Englert G. 1 D and 2 D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series / G. Englert, T. Biornland, S. Liaaen-Jensen // *Magnetic Resonance in Chemistry*. - 1990. - Vol. 28, iss. 6. - P. 519 - 528.

109. Eppard M. Investigations on gene copy number, introns and chromosomal arrangement of genes encoding the fucoxanthin chlorophyll a/c-binding proteins of the

centric diatom *Cyclotella cryptica* / M. Eppard, E. Rhiel // *Protist.* - 2000. - Vol. 151, iss. 1. - P. 27 - 39.

110. Falciatore A. Revealing the molecular secrets of marine diatoms / A. Falciatore, C. Bowler // *Annual Review of Plant Biology.* - 2002. - Vol. 53, iss. 1. - P. 109 - 130.

111. Falkowski P.G. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). II. Relative abundance of chloroplast proteins / P.G. Falkowski, A. Sukenik, R. Herzig // *Journal of Phycology.* - 1989. - Vol. 25, iss. 3. - P. 471 - 478.

112. Falkowski P.G. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton / P.G. Falkowski // *Science.* - 2004. - Vol. 305. - P. 354 - 360.

113. Flynn K.J. Characteristics of the uptake system for L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricornutum* / K.J. Flynn, P.J. Syrett // *Marine Biology.* - 1986. - Vol. 90, iss. 2. - P. 151 - 158.

114. Fox J.M. Minerals and trace elements in microalgae / J.M. Fox, P.V. Zimba // *Microalgae in health and disease prevention* / Eds.: I. Levine, J. Fleurence. - Academic Press, 2018. - P. 177 - 193.

115. Fu W. Bioactive compounds from microalgae: current development and prospects / W. Fu, D.R. Nelson, Z. Yi, M. Xu, B. Khraiwesh, K. Jijakli, A. Chaiboonchoe, A. Alzahmi, D. Al-Khairi, S. Brynjolfsson, K. Salehi-Ashtiani // *Studies in Natural Products Chemistry.* - 2017. - Vol. 54. - P. 199 - 225.

116. Fuentes S. Silicon deficiency induces alkaline phosphatase enzyme activity in cultures of four marine diatoms / S. Fuentes, G.H. Wikfors, S. Meseck // *Estuaries and Coasts.* - 2014. - Vol. 37, iss. 2. - P. 312 - 324.

117. Fujiki T. Relationship between light absorption and the xanthophyll-cycle pigments in marine diatoms / T. Fujiki, S. Taguchi // *Plankton Biology and Ecology.* - 2001. - Vol. 48, iss. 2. - P. 96 - 103.

118. Gammone M.A. Marine carotenoids against oxidative stress: effects on human health / M.A. Gammone, G. Riccioni, N. D'Orazio // *Marine Drugs.* - 2015a. - Vol. 13, iss. 10. - P. 6226 - 6246.

119. Gammone M.A. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin / M.A. Gammone, N. D'Orazio // *Marine Drugs*. - 2015b. - Vol. 13. - P. 2196 - 2214.
120. Gao K. Effects of ocean acidification on marine photosynthetic organisms under the concurrent influences of warming, UV radiation, and deoxygenation / K. Gao, J. Beardall, D.-P. Häder, J.M. Hall-Spencer, G. Gao, D.A. Hutchins // *Frontiers in Marine Science*. - 2019a. - Vol. 6. - P. 1 - 18.
121. Gao G. A two-stage model with nitrogen and silicon limitation enhances lipid productivity and biodiesel features of the marine bloom-forming diatom *Skeletonema costatum* / G. Gao, M. Wu, Q. Fu, X. Li, J. Xu // *Bioresource Technology*. - 2019b. - Vol. 289. - P. 1 - 9.
122. Gómez-Loredo A. Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions / A. Gómez-Loredo, J. Benavides, M. Rito-Palomares, J.A.B. Lozano // *Journal of Applied Phycology*. - 2015. - Vol. 28, iss. 2. - P. 849 - 860.
123. Goss R. Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae / R. Goss, T. Jakob // *Photosynthesis Research*. - 2010. - Vol. 106. - P. 103 - 122.
124. Granata T. Dependency of microalgal production on biomass and the relationship to yield and bioreactor scale-up for biofuels: a statistical analysis of 60+ years of algal bioreactor data / T. Granata // *BioEnergy Research*. - 2017. - Vol. 10, iss. 1. - P. 267 - 287.
125. Grant B.R. Growth of *Cylindrotheca closterium* var. *californica* (Mereschk.) Reimann & Lewin on nitrate, ammonia, and urea / B.R. Grant, J. Madgwick, Pont G. Dal // *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. - 1967. - Vol. 18, iss. 2. - P. 129 - 136.
126. Grant B.R. Light-stimulated nitrate and nitrite assimilation in several species of algae / B.R. Grant, I.M. Turner // *Comparative Biochemistry and Physiology*. - 1969. - Vol. 29, iss.3.- P. 995 - 1004.

127. Grant C.S. Microalgal pigment ratios in relation to light intensity: implications for chemotaxonomy / C.S. Grant, J.W. Louda // *Aquatic Biology*. - 2010. - Vol. 11. - P. 127 - 138.
128. Granum E. A simple combined method for determination of  $\beta$ -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms / E. Granum, S.M. Myklestad // *Hydrobiologia*. - 2002. - Vol. 477, iss. 1. - P. 155 - 161.
129. Green B.R. The evolution of light-harvesting antennas / B.R. Green // *Light-harvesting antennas in photosynthesis* / Eds.: B.R. Green, W.W. Parson. - Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003. - P. 129 - 168.
130. Grouneva I. Phylogenetic viewpoints on regulation of light harvesting and electron transport in eukaryotic photosynthetic organisms / I. Grouneva, P.J. Gollan, S. Kangasjärvi, M. Suorsa, M. Tikkanen, E.-M. Aro // *Planta*. - 2013. - Vol. 237. - P. 399–412.
131. Gross M. The mysteries of the diatoms / M. Gross // *Current Biology*. - 2012.- Vol. 22, iss. 15. - P. 581 - 585.
132. Grosso C. Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds / C. Grosso, P. Valentao, F. Ferreres, P.B. Andrade // *Marine Drugs*. - 2015. - Vol. 13, iss. 5. - P. 3182 - 3230.
133. Gügi B. Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms / B. Gügi, T. Le Costaouec, C. Burel, P. Lerouge, W. Helbert, M. Bardor // *Marine Drugs*. - 2015. - Vol. 13, iss. 9. - P. 5993 - 6018.
134. Guglielmi G. The light-harvesting antenna of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Evidence for a diadinoxanthin-binding subcomplex / G. Guglielmi, J. Lavaud, B. Rousseau, A.-L. Etienne, J. Houmard, A.V. Ruban // *The FEBS Journal*. - 2005. - Vol. 272, iss. 17. - P. 4339 - 4348.
135. Guillard R.R.L. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran / R.R.L. Guillard, J. Ryther // *Canadian Journal of Microbiology*. - 1963. - Vol. 8, iss. 2. - P. 229 - 239.

136. Guiry M.D. *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reiman and J. C. Lewin. AlgaeBase / M.D Guiry, G.M. Guiry. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2020.

[http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=33309](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=33309). Accessed 25 January 2020.

137. Guo B. Screening of diatom strains and characterization of *Cyclotella cryptica* as a potential fucoxanthin producer / B. Guo, B. Liu, B. Yang, P. Sun, X. Lu, J. Liu, F. Chen // Marine Drugs. - 2016. - Vol. 14, iss. 7. - P. 1 - 14.

138. Hamm C.E. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection / C.E. Hamm, R. Merkel, O. Springer, P. Jurkoj, C. Maier, K. Prechtel, V. Smetacek // Nature. - 2003. - Vol. 421. - P. 841 - 843.

139. Harwood J.L. Fatty acid metabolism / J.L. Harwood // Annual Review of Plant Physiology. - 1988. - Vol. 39. - P. 101 - 138.

140. Hashimoto T. The distribution and accumulation of fucoxanthin and its metabolites after oral administration in mice / T. Hashimoto, Y. Ozaki, M. Taminato, S.K. Dass, M. Mizuno, K. Yoshimura, T. Maoka, K. Kanazawa // British Journal of Nutrition. - 2009. - Vol. 102. - P. 242 - 248.

141. Hasle G.R. Marine diatoms / G.R. Hasle, E.E. Syvertsen // Identifying marine diatoms and dinoflagellates / Ed C.R. Tomas. - Amsterdam, The Netherland, 1996. - P. 5 - 385.

142. Herbert D. The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study / D. Herbert, R. Elsworth, R.C. Telling // The Journal of General Microbiology. - 1956. - Vol. 14. - C. 601 - 622.

143. Heydarizadeh P. Regulation of secondary compounds synthesis by photosynthetic organisms under stress / P. Heydarizadeh // Biochemistry, Molecular Biology. Université du Maine, 2015. - P. 1 - 236.

144. Hildebrand M. Understanding Diatom Cell Wall Silicification-Moving Forward / M. Hildebrand, S.J.L. Lerch, R.P. Shrestha // Frontiers in Marine Science. – 2018. – Vol. 5. – P. 1-19.

145. Hosokawa M. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR $\gamma$  ligand, troglitazone, on colon cancer cells / M. Hosokawa, M. Kudo, H. Maeda, H. Kohno, T. Tanaka, K. Miyashita // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2004. - Vol. 1675, iss. 1 - 3. - P. 113 - 119.

146. Hosokawa M. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-Ay mice / M. Hosokawa, T. Miyashita, S. Nishikawa, S. Emi, T. Tsukui, F. Beppu, T. Okada, K. Miyashita // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. - 2010. - Vol. 504. - P. 17 - 25.

147. Huang Q. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms / Q. Huang, F. Jiang, L. Wang, C. Yang // *Engineering*. - 2017. - Vol. 3, iss. 3. - P. 318 - 329.

148. Huang W. Reduced vacuolar  $\beta$ -1,3-glucan synthesis affects carbohydrate metabolism as well as plastid homeostasis and structure in *Phaeodactylum tricorutum* / W. Huang, I. Haferkamp, B. Lepetit, M. Molchanova, S. Hou, W. Jeblick, C.R. Bártulos, P.G. Kroth // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. - 2018. - Vol. 115, iss. 18. - P. 4791 - 4796.

149. Igbal G. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications / G. Igbal, R. Valivety // *Trends in Biotechnology*. - 1997. - Vol. 15, iss. 10. - P. 401 - 409.

150. Iwamoto K. Characterization of intracellular iodine accumulation by iodine-tolerant microalgae / K. Iwamoto, Y. Shiraiwa // *Procedia Environmental Sciences*. - 2012. - Vol. 15. - P. 34 - 42.

151. Jahns P. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids / P. Jahns, D. Latowski, K. Strzalka // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2009. - Vol. 1787, iss. 1. - P. 3 - 14.

152. Jansson C. Calcifying cyanobacteria – the potential of biomineralization for carbon capture and storage / C. Jansson, T. Northen // *Current Opinion in Biotechnology*. - 2010. - Vol. 21, iss.3. - P. 365 - 371.

153. Jensen E.L. A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton / E.L. Jensen, R. Clement, A. Kosta, S.C. Maberly, B. Gontero // The ISME Journal. - 2019. - Vol. 13. - P. 2094 - 2106.

154. Jiang H. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) / H. Jiang, K. Gao // Journal of Phycology. - 2004. - Vol. 40, iss. 4. - P. 651 - 654.

155. Jin E.S. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application / E.S. Jin, J.E.W. Polle, H.K. Lee, S.M. Hyun, M. Chang // Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2003. - Vol. 13, iss. 2. - P. 165 - 174.

156. Jiroutová K. A gene in the process of endosymbiotic transfer / K. Jiroutová, L. Kořený, C. Bowler, M. Oborník // PLoS ONE. - 2010. - Vol. 5, iss. 10. - P. 1 - 9.

157. Joshi J. Biochemical characterization of Fucoxanthin Chlorophyll a/c binding proteins in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*: Dissertation for attaining the PhD degree of Natural Sciences. Frankfurt am Main. 2011. 145 pp.

158. Junior A.M.M. Chemical composition of three microalgae species for possible use in mariculture / A.M.M. Junior, E.B. Neto, M.L. Koenig, E.E. Leça // Brazilian Archives of Biology and Technology. - 2007. - Vol. 50, iss. 3. - P. 461 - 467.

159. Keeling P.J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids / P.J. Keeling // Philosophical Transactions of the Royal Society B. - 2010. - Vol. 365, iss. 1541. - P. 729 - 748.

160. Khan S.A. Unraveling the complex relationship triad between lipids, obesity, and inflammation / S.A. Khan, A. Ali, S.A. Khan, S.A. Zahran, G. Damanhour, E. Azhar, I. Qadri // Mediators of Inflammation. - 2014. - Vol. 2014. - P. 1 - 16.

161. Kilian O. Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids / Kilian O., Kroth P.G. // The Plant Journal. - 2005. - Vol. 41, iss. 2. - P. 175 - 183.

162. Kim S.M. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* / S.M. Kim, Y.-J. Jung, O.-N. Kwon, K.H. Cha, B.-H. Um, D. Chung, C.-H. Pan // Applied Biochemistry and Biotechnology. - 2012. - Vol. 166, iss. 7. - P. 1843 - 1855.

163. Kim J.-C. Solvent extraction of fucoxanthin from *Phaeodactylum tricornutum* / J.-C. Kim // Separation Science and Technology. - 2014. - Vol. 49, iss. 3. - P. 410 - 415.

164. Kingston M.B. Growth and motility of the diatom *Cylindrotheca closterium*: implications for commercial applications / M.B. Kingston // Journal of the North Carolina Academy of Science. - 2009. - Vol. 125, iss. 4. - P. 138 - 142.

165. Kiruba N.J.M. Thatheyus discovering promising anti-cancer drug candidates from marine algae / N.J.M. Kiruba, M.A. Pradeep, A.J. Thatheyus // Science International. - 2018. - Vol. 6, iss. 2. - P. 44 - 50.

166. Klinthong W. A review: microalgae and their applications in CO<sub>2</sub> capture and renewable energy / W. Klinthong, Y.-H. Yang, C.-H. Huang, C.-S. Tan // Aerosol and Air Quality Research. - 2015. - Vol. 15, iss. 2. - P. 712 - 742.

167. Kolber Z. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II / Z. Kolber, J. Zehr, P. Falkowski // Plant Physiology. - 1988. - Vol. 88, iss. 3. - P. 923 - 929.

168. Kroth P.G. Protein transport into secondary plastids and the evolution of primary and secondary plastids / P.G. Kroth // International Review of Cytology. - 2002. - Vol. 221. - P. 191 - 255.

169. Kröger N. Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis / N. Kröger, S. Lorenz, E. Brunner, M. Sumper // Science. - 2002. - Vol. 298, iss. 5593. - P. 584-586.

170. Kuczynska P. Photosynthetic pigments in diatoms / P. Kuczynska, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka // Marine Drugs. - 2015. - Vol. 13, iss. 9. - P. 5847 - 5881.

171. Kuczynska P. Characterisation of carotenoids involved in the xanthophyll cycle / P. Kuczynska, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka // *Carotenoids* / Eds. D.J. Cvetković, G.S. Nikolić - IntechOpen, 2017. - P. 3 - 16.
172. Kula M. Culture density influence on the photosynthetic efficiency of microalgae growing under different spectral compositions of light / M. Kula, H.M. Kalaji, A. Skoczowski // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. - 2017. - Vol. 167. - P. 290 - 298.
173. Kumar S.R. Fucoxanthin: a marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms / S.R. Kumar, M. Hosokawa, K. Miyashita // *Marine Drugs*. - 2013. - Vol. 11. - P. 5130 - 5147.
174. Kuppusamy P. Potential pharmaceutical and biomedical applications of diatoms microalgae-an overview / P. Kuppusamy, I. Soundharrajan, S. Srigopalram, M.M Yusoff, G.P. Maniam, N. Govindan, K.C. Choi // *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. - 2017. - Vol. 46. - P. 663 - 667.
175. Latowski D. Violaxanthin and diadinoxanthin cycles as an important photoprotective mechanism in photosynthesis / D. Latowski, S. Schaller, M. Olchawa-Pajor, R. Goss, K. Strzalka // *Russian Journal of Plant Physiology*. - 2011. - Vol. 58, iss. 6. - P. 952 - 964.
176. Lauritano C. Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities / C. Lauritano, J.H. Andersen, E. Hansen, M. Albrigtsen, L. Escalera, F. Esposito, K. Helland, K. Ø. Hanssen, G. Romano, A. Ianora // *Frontiers in Marine Science*. - 2016. - Vol. 3, iss. 68. - P. 1 - 12.
177. Lavaud J. Fast regulation of photosynthesis in diatoms: mechanisms, evolution and ecophysiology / J. Lavaud // *Functional Plant Science and Biotechnology*. - 2007. - Vol. 1. - P. 267 - 287.
178. Lebeau T. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales / T. Lebeau, J.-M. Robert // *Applied Microbiology and Biotechnology*. - 2003. - Vol. 60, iss. 6. - P. 612 - 623.

179. Lepetit B. Evidence for the existence of one antenna-associated, lipid-dissolved, and two protein-bound pools of diadinoxanthin cycle pigments in diatoms / B. Lepetit, D. Volke, M. Gilbert, C. Wilhelm, R. Goss // *Plant Physiology*. - 2010. - Vol. 154, iss. 4. - P. 1905 - 1920.
180. Lewin J. Heterotrophic nutrition of the marine pennate diatom, *Cylindrotheca fusiformis* / J. Lewin, J.A. Hellebust // *Canadian Journal of Microbiology*. - 1970. - Vol. 16, iss. 11. - P. 1123 - 1129.
181. Li W. Interactive effects of ocean acidification and nitrogen-limitation on the diatom *Phaeodactylum tricornutum* / W. Li, K. Gao, J. Beardall // *PloS One*. - 2012. - Vol. 7, iss. 12. - P. 1 - 8.
182. Li H.-Y. Biochemical and genetic engineering of diatoms for polyunsaturated fatty acid biosynthesis / H.-Y. Li, Y. Lu, J.-W. Zheng, W.-D. Yang, J.-S. Liu // *Marine Drugs*. - 2014. - Vol. 12, iss. 1. - P. 153 - 166.
183. Li G. Interactive effects of nitrogen and light on growth rates and RUBISCO content of small and large centric diatoms / G. Li, D.A. Campbell // *Photosynthesis Research*. - 2017. - Vol. 131, iss. 1. - P. 93 - 103.
184. Liang L. Effect of light intensity on the total lipid and fatty acid composition of six strains of marine diatoms / L. Liang, K. Mai, S. Sun, D. Yu // *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. - 2001. - Vol. 19, iss.3. - P. 249 - 254.
185. Liang L. Effects of harvest stage on the total lipid and fatty acid composition of four *Cylindrotheca* strains / L. Liang, K. Mai, S. Sun // *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. - 2002. - Vol. 20, iss. 2. - P. 157 - 161.
186. Liang Y. Differences in growth, total lipid content and fatty acid composition among 60 clones of *Cylindrotheca fusiformis* / Y. Liang, K. Mai, S. Sun // *Journal of Applied Phycology*. - 2005. - Vol. 17, iss. 1. - P. 61 - 65.
187. Liefer J.D. Nitrogen starvation induces distinct photosynthetic responses and recovery dynamics in diatoms and prasinophytes / J.D. Liefer, A. Garg, D.A. Campbell, A.J. Irwin, Z.V. Finkel // *PLOS ONE*. - 2018. - Vol. 13, iss. 4.- P. 1 - 24.

188. Lincoln R.A. Biologically active compounds from diatoms / R.A. Lincoln, K. Strupinski, J.M. Walker // *Diatom Research*. - 1990. - Vol. 5, iss. 2. - P. 337 - 349.
189. Liu S. Growth and nutrient utilization of green algae in batch and *Semicontinuous Autotrophic* cultivation under high CO<sub>2</sub> concentration / S. Liu, P. Elvira, Y. Wang, W. Wang // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. - 2019. - Vol. 188, iss. 3. - P. 836 - 853.
190. Lu X. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process for production of fucoxanthin by the marine diatom *Nitzschia laevis* / X. Lu, H. Sun, W. Zhao, K.-W. Cheng, F. Chen, B. Liu // *Marine Drugs*. - 2018. - Vol. 16, iss. 7. - P. 1 - 13.
191. Maeda H. Fucoxanthin from edible sea-weed, *undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues / H. Maeda, M. Hosokawa, T. Sashima, K. Funayama, K. Miyashita // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2005. - Vol. 332, iss. 2. - P. 392 - 397.
192. Mann D.G. Diatoms: organism and image / D.G. Mann // *Automatic diatom. Identification* / Eds: H. du Buf, M.M. Bayer. - World Scientific, New Jersey, London, Singapore, Hong Kong, 2002. - P. 9 - 41.
193. Marañón E. Nutrient limitation suppresses the temperature dependence of phytoplankton metabolic rates / E. Marañón, M.P. Lorenzo, P. Cermeño, B. Mouriño-Carballido // *The ISME Journal*. - 2018. - Vol. 12. - P. 1836 - 1845.
194. Martin W. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus / W. Martin, T. Rujan, E. Richly, A. Hansen, S. Cornelsen, T. Lins, D. Leister, B. Stoebe, M. Hasegawa, D. Penny // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. - 2002. - Vol. 99, iss. 19. - P. 12246 - 12251.
195. Martin-Jézéquel V. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth / V. Martin-Jézéquel, M. Hildebrand, M.A. Brzezinski // *Journal of Phycology*. - 2000. - Vol. 36, iss. 5. - P. 821 - 840.

196. Martins T.G. The contribution of diatoms to bioflocs lipid content and the performance of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a BFT culture system / T.G. Martins, C. Odebrecht, L.V. Jensen, M.G.M. D'Oca, W. Wasielesky // Aquaculture Research. - 2014. - Vol. 47, iss. 4. - P. 1315 - 1326.

197. Masmoudi S. Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms: from heaven to hell - a review / S. Masmoudi, N. Nguyen-Deroche, A. Caruso, H. Ayadi, A. Morant-Manceau, G. Tremblin // Cryptogamie Algologie. - 2013. - Vol. 34, iss. 2. - P. 185 - 225.

198. Matsuda Y. Carbon fixation in diatoms / Y. Matsuda, P.G. Kroth // The structural basis of biological energy generation / Ed. M.F. Hohmann-Marriott. - Dordrecht, Heidelberg: Springer, 2014, pp. 335 - 362.- (Advances in photosynthesis and respiration, Vol. 39).

199. Matsuda Y. Mechanisms of carbon dioxide acquisition and CO<sub>2</sub> sensing in marine diatoms: a gateway to carbon metabolism / Y. Matsuda, B.M. Hopkinson, K. Nakajima, C.L. Dupont, Y. Tsuji // Philosophical Transactions of the Royal Society B. - 2017. - Vol. 372. - P. 1 - 12.

200. Matsumoto M. Outdoor cultivation of marine diatoms for year-round production of biofuels / M. Matsumoto, D. Nojima, T. Nonoyama, K. Ikeda, Y. Maeda, T. Yoshino, T. Tanaka // Marine Drugs. - 2017. - Vol. 15, iss. 4. - P. 1 - 12.

201. Maxon W.D. Continuous fermentation. principles and applications / W.D. Maxon // Journal of Applied Microbiology. - 1955. - Vol. 3. - P. 110 - 122.

202. Meiser A. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornerutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor / A. Meiser, U. Schmid-Staiger, W. Trösch // Journal of Applied Phycology. - 2004. - Vol. 16, iss 3. - P. 215 - 225.

203. Methods in microbiology / Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons. - London and New York, 1970. - Vol. 2. - 445 p.

204. Miazek K. Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: a review / K. Miazek, L. Kratky, R. Sulc, T. Jirout,

M. Aguedo, A. Richel, D. Goffin // International Journal of Molecular Sciences. - 2017. - Vol. 18, iss. 1429. - P. 2 - 31.

205. Milligan A.J. Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Pelagophyceae) / A.J. Milligan, P.J. Harrison // Journal of Phycology. - 2000. - Vol. 36, iss. 1. - P. 78 - 86.

206. Minhas A.K. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids / A.K. Minhas, P. Hodgson, C.J. Barrow, A. Adholeya // Frontiers in Microbiology. - 2016. - Vol. 7, iss. 546. - P. 1 - 19.

207. Mitani E. Fatty acid composition profiles of 235 strains of three microalgal divisions within the NIES microbial culture collection / E. Mitani, F. Nakayama, I. Matsuwaki, I. Ichi, A. Kawabata, M. Kawachi, M. Kato // Microbial Antarctic Resource System. - 2017. - Vol. 33, iss. 1. - P. 19 - 29.

208. Mohsenpour S.F. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production / S.F. Mohsenpour, B. Richards, N. Willoughby // Bioresource Technology. - 2012. - Vol. 125. - P. 75 - 81.

209. Montagnes D.J.S. Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: reconsidering some paradigms / D.J.S. Montagnes, D.J. Franklin // Limnology and Oceanography. - 2001. - Vol. 46, iss. 8. - P. 2008 - 2018.

210. Moustafa A. Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms / A. Moustafa, B. Beszteri, U. G. Maier, C. Bowler, K. Valentin, D. Bhattacharya // Science. - 2009. - Vol. 324, iss. 5935. - P. 1724 - 1726.

211. Nagappan S. Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production / S. Nagappan, S. Devendran, P.-C. Tsai, H.-U. Dahms, V.K. Ponnusamy // Fuel. - 2019. - Vol. 252. - P. 339 - 349.

212. Najdek M. The role of the diatom *Cylindrotheca closterium* in a mucilage event in the northern Adriatic Sea: coupling with high salinity water intrusions / M. Najdek, M. Blažina, T. Djakovac, R. Kraus // Journal of Plankton Research. - 2005. - Vol. 27, iss. 9. - P. 851 - 862.

213. Nelson N. The complex architecture of oxygenic photosynthesis / N. Nelson, A. Ben-Shem // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. - 2004. - Vol. 5, iss. 12. - P. 971 - 982.
214. Neumann U. Fucoxanthin, a carotenoid derived from *Phaeodactylum tricornutum* exerts antiproliferative and antioxidant activities *in vitro* / U. Neumann, F. Derwenskus, V. Flaiz Flister, U. Schmid-Staiger, T. Hirth, S.C. Bischoff // *Antioxidants*. - 2019. - Vol. 8, iss. 6. - P. 183 - 194.
215. Nesara K.M. Diatomix: a diatoms enhancer / K.M. Nesara, C.S. Bedi // *Journal of Fisheries Sciences.com*. - 2019. - Vol. 13, iss. 2. - P. 12 - 15.
216. Obata T. The central carbon and energy metabolism of marine diatoms / T. Obata, A.R. Fernie, A. Nunes-Nesi // *Metabolites*. - 2013. - Vol. 3, iss. 2. - P. 325 - 346.
217. Okuzumi J. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis / J. Okuzumi, T. Takahashi, T. Yamane, Y. Kitao, M. Inagake, K. Ohya, H. Nishino, Y. Tanaka // *Cancer Letters*. - 1993. - Vol. 68, iss. 2 - 3. - P. 159 - 168.
218. Orefice I. Role of nutrient concentrations and water movement on diatom's productivity in culture / I. Orefice, M. Musella, A. Smerilli, C. Sansone, R. Chandrasekaran, F. Corato, C. Brunet // *Scientific Reports*. - 2019. - Vol. 9, iss. 1. - P. 1 - 10.
219. Papagiannakis E. Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin-chlorophyll protein of diatoms / E. Papagiannakis, I.H.M. van Stokkum, H. Fey, C. Büchel, R. van Grondelle // *Photosynthesis Research*. - 2005. - Vol. 86, iss. 1 - 2. - P. 241 - 250.
220. Parker M.S. Synergistic effects of light, temperature and nitrogen source on transcription of genes for carbon and nitrogen metabolism in the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) / M.S. Parker, E.V. Armbrust // *Journal of Phycology*. - 2005. - Vol. 41, iss. 6. - P. 1142 - 1153.
221. Pasquet V. Study on the microalgal pigments extraction process: performance of microwave assisted extraction / V. Pasquet, J.-R. Chérouvrier, F. Farhat,

V. Thiérya, J.-M. Piot, J.-B. Bérardb, R. Kaasb, B. Seriveb, T. Patricec, J.-P. Cadoret, L. Picot // *Process Biochemistry*. - 2011. - Vol. 46, iss.1. - P. 59 - 67.

222. Patras D. Screening of bioactive compounds synthesized by microalgae: a progress overview on extraction and chemical analysis / D. Patras, C.V. Moraru, C. Socaciu // *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia*. - 2018. - Vol. 63, iss. 1. - P. 21 - 35.

223. Pedersen M. F. Effects of high pH on the growth and survival of six marine heterotrophic protists / M.F. Pedersen, P.J. Hansen // *Marine Ecology Progress Series*. - 2003. - Vol. 260. - P. 33 - 41.

224. Peng J. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health / J. Peng, J.-P. Yuan, C.-F. Wu, J.-H. Wang // *Marine Drugs*. - 2011. - Vol. 9, iss. 10. - P. 1806 - 1828.

225. Pennington F. Carotenoid distribution patterns in bacillariophyceae / F. Pennington, R.L. Guillard, S. Liaaen-Jensen // *Biochemical Systematics and Ecology*. - 1988. - Vol. 16, iss. 7 - 8. - P. 589 - 592.

226. Peraman M. Identification and quantification of fucoxanthin in selected carotenoid-producing marine microalgae and evaluation for their chemotherapeutic potential / M. Peraman, S. Nachimuthu // *Pharmacognosy Magazine*. - 2019. - Vol. 15, iss. 64. - P. 243 - 249.

227. Pereira H. Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications / H. Pereira, L. Barreira, F. Figueiredo, L. Custódio, C. Vizetto-Duarte, C. Polo, E. Rešek, A. Engelen, J. Varela // *Marine Drugs*. - 2012. - Vol. 10, iss. 9. - P. 1920 - 1935.

228. Pratiwi A.R. Fatty acid synthesis by Indonesian marine diatom, *Chaetoceros gracilis* / A.R. Pratiwi, D. Syah, L. Hardjito, L.M.G. Panggabean, M.T. Suhartono // *Hayati Journal of Biosciences*. - 2009. - Vol. 16, iss. 4. - P. 151 - 156.

229. Premvardhan L. Pigment organization in fucoxanthin chlorophyll a/c2 proteins (FCP) based on resonance Raman spectroscopy and sequence analysis / L.

Premvardhan, B. Robert, A. Beer, C. Büchel // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2010. - Vol. 1797, iss. 9. - P. 1647 - 1656.

230. Preston Mason R. New Insights into Mechanisms of Action for Omega-3 Fatty Acids in Atherothrombotic Cardiovascular Disease / R. Preston Mason // *Current Atherosclerosis Reports*. - 2019. - Vol. 21, iss. 2. - P. 1 - 11.

231. Price N.M. Uptake of urea C and urea N by the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* / N.M. Price, P.J. Harrison // *Limnology and Oceanography*. - 1988. - Vol. 33, iss. 4. - P. 528 - 537.

232. Prihoda J. Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms / J. Prihoda, A. Tanaka, W. B. M. de Paula, J. F. Allen, L. la Tirichine, C. Bowler // *Journal of Experimental Botany*. - 2012. - Vol. 63, iss. 4. - P. 1543 - 1557.

233. Ramanna L. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity / L. Ramanna, I. Rawat, F. Bux // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. - 2017. - Vol. 80. - P. 765 - 773.

234. Raven J.A. Iron acquisition and allocation in stramenopile (diatoms) algae / J.A. Raven // *Journal of Experimental Botany*. - 2013. - Vol. 64, iss. 8. - P. 2119 - 2127.

235. Reimann B.E.F. The diatom genus *Cylindrotheca* Rabenhorst (with a reconsideration of *Nitzschia closterium*) / B.E.F. Reimann, J.C. Lewin // *Journal of the Royal Microscopical Society*. - 1964. - Vol. 83, iss. 3. - P. 283 - 296.

236. Renaud S.M. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture / S.M. Renaud, D.L. Parry, L.-V. Thinh, C. Kuo, A. Padovan, N. Sammy // *Journal of Applied Phycology*. - 1991. - Vol. 3. - P. 43 - 53.

237. Roberts K. Carbon acquisition by diatoms / K. Roberts, E. Granum, R.C. Leegood, J.A. Raven // *Photosynthesis Research*. - 2007. - Vol. 93, iss. 1 - 3. - P. 79 - 88.

238. Rockwell N.C. Primary endosymbiosis and the evolution of light and oxygen sensing in photosynthetic eukaryotes / N.C. Rockwell, J.C. Lagarias, D. Bhattacharya // *Frontiers in Ecology and Evolution*. - 2014. - Vol. 2, iss. 66. - P. 1 - 24.

239. Rodríguez-Lagunas M.J. Effect of eicosapentaenoic acid-derived prostaglandin E3 on intestinal epithelial barrier function / M.J. Rodríguez-Lagunas, R. Ferrer, J.J. Moreno // *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*. - 2013. - Vol. 88, iss. 5. - P. 339 - 345.
240. Rogato A. The diatom molecular toolkit to handle nitrogen uptake / A. Rogato, A. Amato, D. Iudicone, M. Chiurazzi, M.I. Ferrante, M. R. d'Alcalà // *Marine Genomics*. - 2015. - Vol. 24, Part 1. - P. 95 - 108.
241. Roleda M.Y. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy / Roleda M.Y., Slocombe S.P., Leakey R.J.G., Day J.G., Bell E.M., Stanley M.S. // *Bioresource Technology*. - 2013. - Vol. 129. - P. 439 - 449.
242. Ryabushko V.I. The medium for intensive culture of the diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (Bacillariophyta) / V.I. Ryabushko, S.N. Zheleznova, R.G. Gevorgiz, N.I. Bobko, A.S. Lelekov // *International Journal on Algae*. - 2016. - Vol. 18, iss. 3. - P. 279 - 286.
243. Ryabushko L.I. Different aspects of studying a diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin 1964 in natural and laboratory conditions / L.I. Ryabushko, D.S. Balycheva, A.V. Bondarenko, S.N. Zheleznova, A.A. Begun, I.V. Stonik // *Marine Biological Journal*. - 2019. - Vol. 4, iss. 2. - P. 52 - 62.
244. Ryckebosch E. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* / E. Ryckebosch, K. Muylaert, M. Eeckhout, T. Ruysen, I. Foubert // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. - 2011. - Vol. 59, iss. 20. - P. 11063 - 11069.
245. Saccà S.C. The eye, oxidative damage and polyunsaturated fatty acids / S.C. Saccà, C.A. Cutolo, D. Ferrari, P. Corazza, C.E. Traverso // *Nutrients*. - 2018. - Vol. 10, iss. 6. - P. 1 - 15.
246. Sathasivam R. Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine / R. Sathasivam, R. Radhakrishnan, A. Hashem, E.F. Abd-Allah // *Saudi Journal of Biological Sciences*. - 2019. - Vol. 26, iss. 4. - P. 709 - 722.

247. Sayanova O. Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms / O. Sayanova, V. Mimouni, L. Ulmann, A. Morant-Manceau, V. Pasquet, B. Schoefs, J.A. Napier // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. - 2017. - Vol. 372, iss. 1728. - P. 1 - 14.
248. Schumann A. Investigation of the quenching efficiency of diatoxanthin in cells of *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae) with different pool sizes of xanthophyll cycle pigments / A. Schumann, R. Goss, T. Jakob, C. Wilhelm // *Phycologia*. – 2007. – Vol. 46, iss. 1. – P. 113–117.
249. Schröder H.C. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms / H.C. Schröder, X. Wang, W. Tremel, H. Ushijima, W.E.G. Müller // *Natural Product Reports*. - 2008. - Vol. 25, iss. 3. - P. 455 - 474.
250. Serrazanetti G.P. Microalgal lipid markers for paleoclimatic research / G.P. Serrazanetti, A. Folicaldi, F. Guerrini, G. Monti, R. Pistocchi, L. Boni // *Climate Research*. - 2006. - Vol. 31, iss. 2-3. - P. 145 - 150.
251. Silva B.F. Analysis of some chemical elements in marine microalgae for biodiesel production and other uses / B.F. Silva, E.V. Wendt, J.C. Castro, A.E. de Oliveira, A.J. I. Carrim, J.D. Gonçalves Vieira, R. Sassi, C.F. da Costa Sassi, A.L. Vieira da Silva, G.F. de Oliveira Barboza, N.R.A. Filho // *Algal Research*. - 2015. - Vol. 9. - P. 312 - 321.
252. Smerilli A. Photoprotective and antioxidant responses to light spectrum and intensity variations in the coastal diatom *Skeletonema marinoi* / A. Smerilli, I. Orefice, F. Corato, A. Gavalás Olea, A.V. Ruban, C. Brunet // *Environmental Microbiology*. - 2017. - Vol. 19, iss. 2. - P. 611 - 627.
253. Smith W. Synopsis of british diatomaceae / W. Smith. - John Van Voorst, London, 1853. - P. 1 - 31.
254. Smith S.R. Evolution and regulation of nitrogen flux through compartmentalized metabolic networks in a marine diatom / S.R. Smith, C.L. Dupont, J.K. McCarthy, J.T. Broddrick, M. Oborník, A. Horák, Z. Füssy, J. Cihlář, S. Kleessen, H. Zheng, J.P. McCrow, K.K. Hixson, W.L. Araújo, A. Nunes-Nesi, A. Fernie, Z.

Nikoloski, B.O. Palsson, A.E. Allen // Nature Communications. - 2019. - Vol. 10, iss. 1. - P. 1 - 14.

255. Song B. Molecular cloning and characterization of high affinity nitrate transporters in marine phytoplankton / B. Song, B.B. Ward // Journal of Phycology. - 2007. - Vol. 43, iss. 3. - P. 542 - 552.

256. Soon W. Environmental effects of increased atmospheric carbon dioxide / W. Soon, S.L. Baliunas, A.B. Robinson, Z.W. Robinson // Climate Research. - 1999. - Vol. 13. - P. 149 - 164.

257. Staats N. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum* / N. Staats, B. de Winder, L.J. Stal, L.R. Mur. // European Journal of Phycology. - 1999. - Vol. 34, iss. 2. - P. 161 - 169.

258. Staats N. Exopolysaccharide production by the epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions / N. Staats, L.J. Stal, L.R. Mur // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. - 2000. - Vol. 249, iss. 1. - P. 13 - 27.

259. Steinrücken P. Enhancing EPA content in an arctic diatom: a factorial design study to evaluate interactive effects of growth factors / P. Steinrücken, S.A. Mjøs, S.K. Prestegard, S.R. Erga // Frontiers in Plant Science. - 2018. - Vol. 9, iss. 491. - P. 1 - 11.

260. Stella G.R. Light stress and photoprotection in green algae, mosses and diatoms / G.R. Stella // Vegetal Biology. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 2016.

261. Stock W. Thermal niche differentiation in the benthic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) complex / W. Stock, B. Vanellander, F. Rüdiger, K. Sabbe, W. Vyverman, U. Karsten // Frontiers in Microbiology. - 2019. - Vol. 10, iss. 1395. - P. 1 - 12.

262. Su Y. Adaptive laboratory evolution for enhanced carotenoid production in microalgae / Y. Su, Z. Yi, S.H. Björnsdóttir, S. Brynjolfsson, W. Fu // Microbial

carotenoids. *Methods in molecular biology* / Eds: C. Barreiro, J.L. Barredo. Humana Press, New York, NY, 2018. - Vol. 1852. - P. 117 - 126.

263. Suman K. Culture medium optimization and lipid of *Cylindrotheca*, a lipid – and polyunsaturated fatty acid – rich pennate diatom and potential source of eicosapentaenoic acid / K. Suman, T. Kiran, U.K. Devi, N.S. Sarma // *Botanica Marina*. - 2012. - Vol. 55, iss. 3. - P. 289 - 299.

264. Sun X.-M. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation / X.-M. Sun, L.-J. Ren, Q.-Y. Zhao, X.-J. Ji, H. Huang // *Biotechnology for Biofuels*. - 2018. - Vol. 11, iss. 1. - P. 1 - 16.

265. Susanto E. Effects of different heat processing on fucoxanthin, antioxidant activity and colour of Indonesian brown seaweeds / E. Susanto, A. S. Fahmi, T.W. Agustini, S. Rosyadi, A.D. Wardani // 2nd International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development 2016, 25 - 27 October 2016, Bali, Indonesia.

266. Swamy U. Structure of spinach nitrite reductase: Implications for multi-electron reactions by the iron-sulfur: siroheme cofactor / U. Swamy, M. Wang, J.N. Tripathy, S.-K. Kim, M. Hirasawa, D.B. Knaff, J.P. Allen // *Biochemistry*. - 2005. - Vol. 44, iss. 49. - P. 16054 - 16063.

267. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions / S. Takaichi // *Marine Drugs*. - 2011. - Vol. 9, iss. 6. - P. 1101 - 1118.

268. Tuchman N.C. Differential heterotrophic utilization of organic compounds by diatoms and bacteria under light and dark conditions / N.C. Tuchman, M.A. Schollett, S.T. Rier, P. Geddes // *Hydrobiologia*. - 2006. - Vol. 561. - P. 167 - 177.

269. Underwood G.J.C. The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms / G.J.C. Underwood, D.M. Paterson // *Advances in Botanical Research*. - 2003. - Vol. 40. - P. 183 - 240.

270. Vanormelingen P. Heterothallic sexual reproduction in the model diatom *Cylindrotheca* / P. Vanormelingen, B. Vanellander, S. Sato, J. Gillard, R. Trobajo, K. Sabbe, W. Vyverman // *European Journal of Phycology*. - 2013. - Vol. 48, iss. 1. - P. 93 - 105.

271. Veith T. The monomeric photosystem I-complex of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* binds specific fucoxanthin chlorophyll proteins (FCPs) as light-harvesting complexes / T. Veith, C. Büchel // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2007. - Vol. 1767, iss. 12. - P. 1428 - 1435.

272. Vrieling E.G. Silicon deposition in diatoms: control by the pH inside the silicon deposition vesicle / E.G. Vrieling, W.W.C. Gieskes, T.P.M. Beelen // *Journal of Phycology*. - 1999, - Vol. 35, iss. 3. – P. 548 - 559.

273. Wang S. Purification of a diatom and its identification to *Cylindrotheca closterium* / S. Wang, L. Zhang, G. Yang, B. Zhu, K. Pan // *Journal of Ocean University of China*. - 2015. - Vol. 14. - P. 357 - 361.

274. Wang S. Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light / S. Wang, S.K. Verma, I.H. Said, L. Thomsen, M.S. Ullrich, N. Kuhnert // *Microbial Cell Factories*. - 2018a. - Vol. 17, iss. 110. - P. 1 - 13.

275. Wang L.-J. A rapid method for the determination of fucoxanthin in diatom / L.-J. Wang, Y. Fan, R.L. Parsons, G.-R. Hu, P.-Y. Zhang, F.-L. Li // *Marine Drugs*. - 2018b. - Vol. 16, iss. 2. - P. 2 - 13.

276. Wang W. Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms / W. Wang, L.J. Yu, C. Xu, T. Tomizaki, S. Zhao, Y. Umena, X. Chen, X. Qin, Y. Xin, M. Suga, G. Han, T. Kuang, J.R. Shen // *Science*. - 2019. - Vol. 363, iss. 6427. - P. 1 - 10.

277. Wilhelm C. The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae / C. Wilhelm, C. Büchel, J. Fisahn, R. Goss, T. Jakob, J. LaRoche, J. Lavaud, M. Lohr, U. Riebesell, K. Stehfest, K. Valentin, P. G. Kroth // *Protist*, Elsevier. - 2006. - Vol. 157, iss. 2. - P. 91 - 124.

278. Wilhelm C. Light acclimation in diatoms: from phenomenology to mechanisms / C. Wilhelm, A. Jungandreas, T. Jakob, R. Goss // *Marine Genomics*. – 2014. - Vol. 16. – P. 5–15.

279. Williams S.K. Transport of urea at low concentrations in *Chlamydomonas reinhardtii* / S.K. Williams, R.C. Hodson // *Journal of Bacteriology*. - 1977. - Vol. 130, iss. 1. - P. 266 - 273.
280. Xia S. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita* / S. Xia, K. Wang, L. Wan, A. Li, Q. Hu, C. Zhang // *Marine Drugs*. - 2013. - Vol. 11, iss. 7. - P. 2667 - 2681.
281. Yamanaka S. Optical properties of diatom silica frustule with special reference to blue light / S. Yamanaka, R. Yano, H. Usami, N. Hayashida, M. Ohguchi, H. Takeda, K. Yoshino // *Journal of Applied Physics*. - 2008. - Vol. 103, iss. 7. - P. 1 - 5.
282. Yi Z. Exploring Valuable Lipids in Diatoms / Z. Yi, M. Xu, X. Di, S. Brynjolfsson, W. Fu // *Frontiers in Marine Science*. - 2017. - Vol. 4, iss. 17. - P. 1 - 10.
283. Yoshiko S. Fucoxanthin, a natural carotenoid, induces G1 arrest and GADD45 gene expression in human cancer cells / S. Yoshiko, N. Hoyoku // *In Vivo*. - 2007. - Vol. 21, iss. 2. - P. 305 - 309.
284. Yuan L. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1 / L. Yuan, D. Loqué, F. Ye, W.B. Frommer, N. Von Wirén // *Plant Physiology*. - 2007a. - Vol. 143, iss. 2. - P. 732 - 744.
285. Zhang H. Fucoxanthin: A promising medicinal and nutritional ingredient / H. Zhang, Y. Tang, Y. Zhang, S. Zhang, J. Qu, X. Wang, R. Kong, C. Han, Z. Liu // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. - 2015. - P. 1 - 10.
286. Zhang Y. The species-specific responses of freshwater diatoms to elevated temperatures are affected by interspecific interactions / Y. Zhang, C. Peng, Z. Wang, J. Zhang, L. Li, S. Huang, D. Li // *Microorganisms*. - 2018. - Vol. 6, iss. 3. - P. 1 - 16.
287. Zhang X. Influence of photoperiods on microalgae biofilm: photosynthetic performance, biomass yield, and cellular composition / X. Zhang, H. Yuan, L. Guan, X. Wang, Y. Wang, Z. Jiang, L. Cao, X. Zhang // *Energies*. - 2019. - Vol. 12, iss. 3724. - P. 1 - 10.

288. Zhao D. Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil / D. Zhao, S.-M. Kim, C.-H. Pan, D. Chung // *Food Chemistry*. - 2014. - Vol. 145. - P. 505 - 513.

289. Zheng W. Effects of potassium iodide on the growth and metabolite accumulation of two planktonic diatoms / W. Zheng, C. Chen, Y. Wang, K. Bao, X. Wang, C. Chu // *Journal of Applied Phycology*. - 2005. - Vol. 17, iss. 4. - P. 355 - 362.

290. Zhu S.-H. Light-Harvesting and Photoprotection in Diatoms: Identification and Expression of L818-Like Proteins / S.-H. Zhu, B.R. Green // *Photosynthesis. Energy from the Sun* / Eds.: J.F. Allen, E. Gantt, J.H. Golbeck, B. Osmond. - Photosynthesis. Energy from the Sun. Springer, Dordrecht, 2008. - P. 261 - 264.

291. Zuccaro G. Microalgae Cultivation Systems / G. Zuccaro, A. Yousuf, A. Pollio, J.-P. Steyer // *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* / Ed. A. Yousuf. - Elsevier Science & Technology, 2019. - P. 11 - 29.