

РОСТ КУЛЬТУРЫ *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) И ПРОДУКЦИЯ В-ФИКОЭРИТРИНА ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

© 2021 г. И. Н. Гудвиллович^{а, *}, А. С. Лелеков^а, Е. И. Мальцев^б,
М. С. Куликовский^б, А. Б. Боровков^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр
“Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Российской академии наук”, Севастополь, Россия

^бИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: gudirina2008@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.04.2020 г.

После доработки 25.04.2020 г.

Принята к публикации 25.04.2020 г.

Красный пигмент В-фикоэритрин (В-ФЭ), относящийся к группе фикобилипротеинов (ФБП), входит в состав светособирающего пигментного комплекса красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, а его количество в клетках определяется уровнем облучённости и обеспеченности азотом. С практической точки зрения, В-ФЭ является ценным природным пигментом, биотехнологический потенциал которого используется в нутрицевтике, фармацевтике, пищевой и косметической промышленности, а также в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике. В экспериментах с *P. purpureum* довольно часто оценивают динамику численности клеток и содержание фотосинтетических пигментов, однако в большинстве экспериментов плотность культуры невысока, хотя известно, что у данного вида она может достигать 10 г/л сухого вещества. В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлось изучение особенностей накопления и продукции ФБП в плотной культуре *P. purpureum* при различной освещенности. Проведенный молекулярно-генетический анализ подтвердил таксономическую принадлежность культуры *P. purpureum*. Водоросли выращивали в фотобиореакторах плоскопараллельного типа при средней освещённости 5, 10 и 15 кЛк. При исследовании микроводоросли *P. purpureum* в качестве показателей использовали динамику плотности культуры, содержание В-ФЭ и продукционные характеристики. Показано, что прирост плотности культуры микроводоросли, соответствующий расчетной концентрации азота в питательной среде, получен только для варианта с освещенностью 5 кЛк. Увеличение освещённости до 10 и 15 кЛк вызывало снижение как максимальной, так и средней продуктивности культуры в 2.5–3.5 раза. Экспериментально установлено, что самое высокое содержание В-ФЭ в клетках и культуре *P. purpureum* (5.5% сухого вещества и 74 мг/л соответственно) наблюдалось при освещённости 5 кЛк. Определен характер изменения содержания В-ФЭ в культуре *P. purpureum* в зависимости от удельной освещенности клеток микроводоросли: концентрация пигмента гиперболически снижалась с ростом удельной освещенности. Таким образом, уровень освещённости клеток микроводоросли *P. purpureum* оказывал значительное влияние на ростовые характеристики культуры (скорость роста, скорость синтеза и выход В-ФЭ): более низкий уровень поверхностной освещённости являлся предпочтительным для выращивания *P. purpureum*. Подход, предложенный в работе, позволяет снизить материальные затраты при культивировании *P. purpureum* с сохранением высокой скорости роста культуры.

Ключевые слова: *Porphyridium purpureum*, фикобилипротеины, освещенность, пигменты, В-фикоэритрин, скорость роста

DOI: 10.31857/S0015330320060056

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия была показана высокая биологическая ценность веществ, синтези-

руемых в клетках микроводорослей, таких как: пигменты, липиды и углеводы [1–3]. Именно благодаря этому биотехнология микроводорос-

Сокращения: АФЦ – пигмент аллофикоцианин; БАД – биологически активные добавки; В-ФЭ – красный пигмент В-фикоэритрин; ССК – светособирающий пигментный комплекс; ФБП – фикобилипротеин; ВІ – Байесовский подход (от Bayesian inference); LB – значение бутстрэп для ML (от likelihood bootstrap); ML – метод максимального правдоподобия (от maximum likelihood); PP – апостериорная вероятность (от posterior probability); R-ФЦ – пигмент R-фикоцианин.

лей получила новое направление развития, когда выращивание осуществляют для получения биологически активных компонентов биомассы. Высокая ценность и востребованность таких пигментов, как хлорофиллы, каротиноиды и фикобилипротеины, позволила поставить вопрос о промышленном получении натуральных пигментов из микроводорослей [4–6].

Одноклеточная красная микроводоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross привлекает внимание исследователей широким спектром синтезируемых веществ различной природы. С прикладной точки зрения эта микроводоросль, в первую очередь, представляет интерес как источник сульфатированных экзополисахаридов, эссенциальных жирных кислот, а также пигментов, относящихся к группе фикобилипротеинов (ФБП), которые у красных водорослей входят в состав фикобилисом [2, 3, 5, 7–9]. Все это, а также отсутствие данных о наличии токсичных веществ в биомассе *P. purpureum*, позволяет использовать продукты синтеза в качестве биологически активных добавок (БАД), а отсутствие целлюлозной клеточной стенки значительно облегчает и удешевляет процесс извлечения ценных компонентов [1, 2, 5, 8, 10, 11].

Использование натуральных природных пигментов приобретает все большее значение для косметологии, фармакологии и производства продуктов питания. Доказано, что пигменты микроводорослей оказывают выраженное положительное влияние на организм человека, обладая антиоксидантным, антиканцерогенным, противовоспалительным действием, а также ангиопротекторным и нейропротекторным эффектами. С практической точки зрения, ФБП являются ценными природными веществами, биотехнологический потенциал которых уже используется или перспективность которого показана при использовании в нутрицевтике, фармацевтике, пищевой и косметической промышленности, а также в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике [1, 3, 4, 8, 9].

Известно, что биохимический состав и скорость роста культур микроводорослей отличается у разных видов и штаммов, при этом на выход ценных компонентов также оказывают влияние множество различных факторов, важнейшие из которых: тип и конструкция фотобиореактора, параметры культивирования (состав питательной среды, освещённость, условия аэрации, pH, температура и др.) [2, 4, 6, 7, 12, 13]. Свет является главным фактором среды, который определяет скорость протекания реакций фотосинтеза, излучение и спектральный состав могут изменить метаболизм и биохимический состав культур микроводорослей. В клетках микроводорослей свет поглощается светособирающими пигментными комплексами (ССК) и далее передается в реакционные центры первой (P_{700}) и второй (P_{680}) фото-

систем. Общая тенденция, представленная в литературе: микроводоросли с фикобилисомами, как правило, предпочитают низкую освещённость (~10–50 моль фотонов/(м² с)), в то время как многие другие виды водорослей, например, большинство динофлагеллят или зеленые, обычно нуждаются в более высокой интенсивности света (~60–100 моль фотонов/(м² с)) [3, 10, 14–17]. ФБП *Porphyridium* (В-фикоэритрин, R-фикоцианин и аллофикоцианин), входящие в состав ФС II, являются пигментами белковой природы, и их количество в клетках, в первую очередь, определяется уровнем облученности и обеспеченности азотом. Одним из наиболее изученных ФБП является В-фикоэритрин (В-ФЭ), входящий в состав ССК *P. purpureum* и придающий красную окраску его культуре [10, 15]. В экспериментах с *P. purpureum* довольно часто оценивают динамику численности клеток и содержание фотосинтетических пигментов [7–9, 11, 12, 18]. Однако в большинстве экспериментов плотность культуры невысока, хотя известно, что у данного вида она может достигать и 10 г/л сухого вещества [10].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлось изучение особенностей накопления и продукции ФБП в плотной культуре *P. purpureum* при различной освещённости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись на базе Отдела биотехнологий и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ (г. Севастополь). Объектом исследования являлся штамм IBSS-70 красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross (Rhodophyta) из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ “Коллекция гидробионтов Мирового океана”.

Выращивание осуществляли на питательной среде для морских красных водорослей [15]: (состав: NaNO_3 – 1.2 г/л, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.45 г/л, EDTA-Na_2 – 0.037 г/л, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.0265 г/л, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.004 г/л, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.0031 г/л, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.0009 г/л, $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.0017 г/л). Среду готовили на стерилизованной морской воде.

Культуру *P. purpureum*, которая была использована в качестве инокулята, предварительно выращивали в фотобиореакторах плоскопараллельного типа при освещённости 5 кЛк. Далее, культивирование продолжили в фотобиореакторах того же типа с рабочим объемом 1 л и толщиной слоя 2 см при круглосуточном искусственном освещении. В качестве осветителя использовали световую решетку из 18 Вт люминесцентных ламп; средняя освещённость на поверхности фотобиореакторов составляла 5, 10 и 15 кЛк. Интенсивность освещения на поверхности фотобиореактора регистри-

ровали при помощи люксметра Ю-116 с погрешностью не более 5% от измеряемой величины. Температуру поддерживали на уровне 26–28°C, pH среды – 8–9. Барботаж культур осуществляли аквариумным компрессором Hailea АСО-308 воздухом без дополнительного введения углекислого газа; скорость подачи воздуха была одинакова для фотобиореакторов и составляла около 0.5 л/л культуры в минуту. Барботаж осуществляли через аквариумный распылитель воздуха, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0.1 мм.

Молекулярно-генетические исследования проводились на базе лаборатории молекулярной систематики водных растений ИФР РАН. ДНК исследуемого штамма IBSS-70 экстрагировали с помощью набора Helix™ (“Bio-Rad Laboratories”, США) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию баркодингового участка V4 ядерного гена 18S рДНК длиной 435 п.н. проводили с помощью пары праймеров D512 и D978 [19]. Условия амплификации: начальная денатурация – 5 мин при 95°C, последующие 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров – 40 с при 52°C, элонгация – 50 с при 72°C; окончательное удлинение – 5 мин при 72°C.

Полученный ПЦР-продукт визуализировали методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (1%) и окрашивали SYBR® Safe (“Life Technologies”, США). Очистку ПЦР-продукта проводили смесью FastAP, 10× FastAP Buffer, Exonuclease I (“Thermo Fisher Scientific”, США) и воды.

Редактирование и сборку полученной консенсусной последовательности осуществляли путем сопоставления прямых и обратных хроматограмм при помощи программ Ridom TraceEdit (ver. 1.1.0) и Mega7. Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы Mafft v7, используя модель E-INS-i. После этого проводили окончательное выравнивание – визуально определяли и удаляли неспаренные участки в начале и в конце полученной матрицы. Общая длина выравнивания составила 464 п.н.

Филогенетические деревья строились методами максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI). Набор молекулярно-генетических данных анализировался с использованием байесовского метода, реализованного в программе Beast ver. 1.10.1. [20]. Для выравненной нуклеотидной матрицы наиболее подходящая модель нуклеотидных замен, параметр формы α и доля неизменных сайтов (pinvar) оценивались с использованием байесовского информационного критерия (BIC) с помощью программы jModelTest 2.1.10 [21]. В качестве модели видообразования использовалось дерево-предшественник типа Yule. Расчет-

ная сходимость параметров, эффективный размер выборки (ESS) и период выгорания проверялись с помощью программы Tracer ver. 1.7.1. [20]. Байесовский анализ проводился со следующими параметрами: случайное начальное дерево, количество запусков – 2, число параллельных цепочек – 4, количество поколений – 1×10^7 , запись параметров каждого поколения и параметр отжига – 25%. Деревья ML строили в онлайн программе RA×ML [22] с проверкой их устойчивости 1000 бутстреп-репликами. Просмотр и редактирование деревьев осуществляли в программах FigTree (ver. 1.4.2) и Adobe Photoshop CC (19.0).

Содержание сухого вещества в культуре определяли ежедневно весовым, а также фотометрическими методами [23]. Оптическую плотность культуры *P. purpureum* измеряли на фотометре Unicо 2100 в кюветах с рабочей длиной 5 мм. Пробы для определения содержания ФБП отбирали через 2–3 суток на различных фазах роста накопительной культуры после тщательного перемешивания. Суспензию культуры *P. purpureum*, полученную в эксперименте, центрифугировали в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливали, осадённую биомассу использовали для определения ФБП. Количественное содержание ФБП определяли спектрофотометрическим методом [23]. Для этого проводили экстракцию биомассы *P. purpureum* фосфатным буфером (0.05 М; pH = 7–7.5). Спектры экстрактов пигментов проверяли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0.1 нм. Регистрировали оптическую плотность полученных экстрактов в области характеристических максимумов поглощения В-фикоэритрина (545 нм), R-фикоцианина (615 нм) и аллофикоцианина (650 нм), а также при 750 нм (для учета неспецифического поглощения раствора). Концентрацию пигментов в водном экстракте определяли по [15], используя значения оптической плотности для соответствующих длин волн.

Рассчитывали средние арифметические (\bar{x}), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ($\Delta\bar{x}$). Все расчеты проводили в программах Libre Office и Scidavis для уровня значимости $\alpha = 0.05$. В таблицах и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) для трех повторностей. В некоторых случаях, чтобы избежать загромождения рисунков, доверительные интервалы на графиках не обозначены, а ошибка не превышала 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка таксономического статуса исследуемого штамма IBSS-70 проводилась реконструкцией филогенетических связей методами макси-

При освещенности 5 кЛк максимальная и средняя продуктивность культуры *P. purpureum* на линейном участке роста, а также прирост биомассы были значительно выше (в среднем, в 2.5–3.5 раза), чем в вариантах с более высокой освещенностью. Увеличение освещенности вызывало снижение продуктивности культуры, что, в итоге, приводило к существенной потере урожая биомассы *P. purpureum*. В большинстве случаев при интенсивном выращивании микроводорослей факторами, ограничивающими рост культуры, являются освещенность и обеспеченность элементами минерального питания клеток культуры. По литературным данным для выращивания *P. purpureum* предпочтительнее использовать более низкие освещенности [3, 10]. Ранее полученные данные показали возможность получения плотной культуры данного вида с продуктивностью около 0.5 г/(л сут) сухого вещества при поверхностной освещенности 20 кЛк, однако, в этом случае толщина рабочего слоя культуры была в 2.5 раза больше, чем в данном эксперименте [18]. По-видимому, увеличение поверхностной освещенности и, соответственно, удельной освещенности клеток, вызвало фотоингибирование роста культуры *P. purpureum*, даже при условии оптимальности прочих условий выращивания [10]. Кроме того, была отмечена коричневая окраска клеток культуры, наиболее интенсивная для варианта с максимальной освещенностью что, как правило, свидетельствует о нарушении процессов синтеза пигментов группы ФБП вследствие воздействия стрессовых условий.

Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии повышенного уровня облученности, нарушающего процессы биосинтеза ФБП в клетках культуры *P. purpureum*, несмотря на достаточное обеспечение элементами минерального питания (табл. 1).

В проведенном эксперименте некоторое лимитирование процессов роста и биосинтеза культуры *P. purpureum* начальной концентрацией азота в среде могло наблюдаться только для варианта с максимальной продукцией биомассы (5 кЛк) (табл. 1). О дефиците азота в среде в этом варианте также свидетельствовало наблюдаемое снижение содержания В-ФЭ в биомассе и в культуре *P. purpureum*

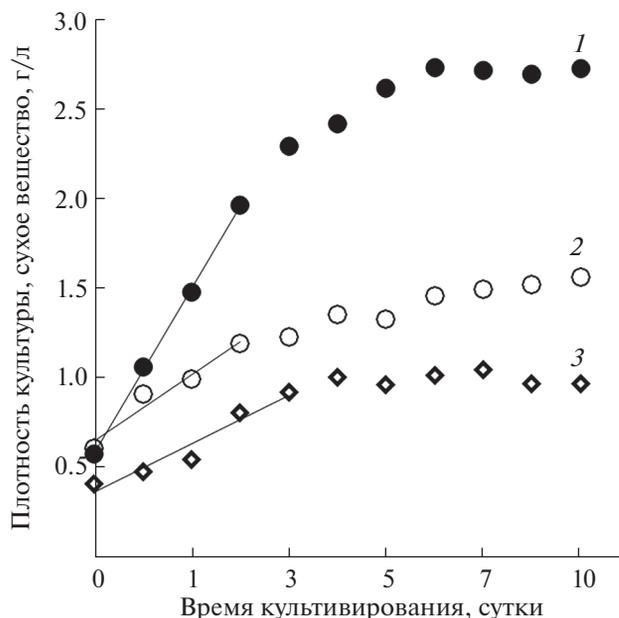


Рис. 2. Динамика плотности культуры *Porphyridium purpureum* при различной освещенности: (1) 5 кЛк; (2) 10 кЛк; (3) 15 кЛк.

reum (рис. 3) после 6-х суток и завершения стадии активного роста [3, 10].

За 3 суток накопительного культивирования изменение содержания В-ФЭ в клетках *P. purpureum* для всех вариантов эксперимента имело разнонаправленный характер: при освещенности 5 кЛк оно увеличилось в 1.9 раза, при 10 кЛк — существенно не изменилось, а при 15 кЛк — снизилось в 3.4 раза по сравнению с первоначальными значениями (рис. 3а). При дальнейшем выращивании содержание В-ФЭ в клетках *P. purpureum* продолжало повышаться только в условиях минимальной освещенности (5 кЛк); таким образом, за 6 суток концентрация пигмента выросла в 2.6 раза (рис. 3а). Последующее снижение содержания В-ФЭ в клетках *P. purpureum* для этого варианта после 6-х суток культивирования совпадает с переходом культуры на стадию замедления роста и стационарную (рис. 3). В соответствии с приведенными выше расчетами, концентрация азота в питательной среде, по-видимому, была исчерпа-

Таблица 1. Продукционные характеристики накопительной культуры *P. purpureum* при различной освещенности

Освещенность, кЛк	Количество азота в среде, мг/л	Прирост биомассы сухого вещества, г/л		Продуктивность, г/(л сут)	
		расчет	реальный	макс	средн. за 5 сут
5	150	2.4	2.1	0.46	0.37
10			0.9	0.18	0.15
15			0.6	0.13	0.12

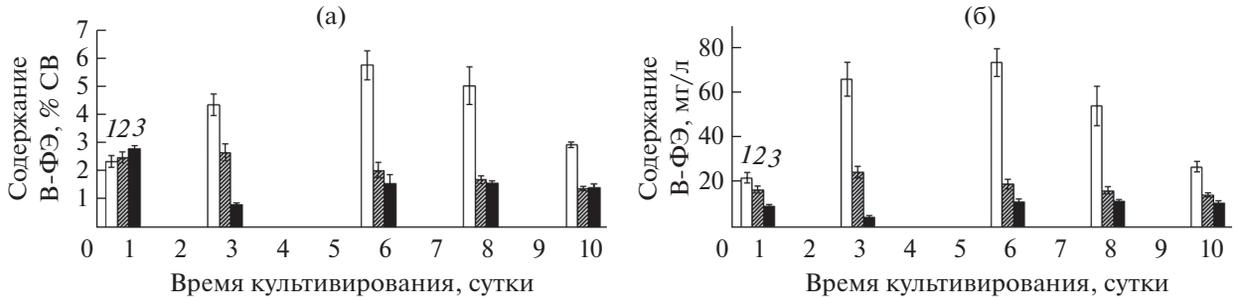


Рис. 3. Содержание В-фикоэритрина в клетках (а) и в культуре *P. purpureum* (б) при различной освещённости. (1) 5 кЛк; (2) 10 кЛк; (3) 15 кЛк.

на, что вызвало как остановку роста культуры, так и процессов синтеза ФБП.

После 3 суток выращивания *P. purpureum* содержание В-ФЭ (в клетках и в культуре) при 10 кЛк несколько снизилось и далее до окончания эксперимента оставалось стабильным. При освещённости 15 кЛк после значительного снижения содержания В-ФЭ к 3-м суткам наблюдалось его повышение в 2 раза с последующей стабилизацией до окончания эксперимента.

Динамика изменения В-ФЭ в культуре *P. purpureum*, в основном, совпадала с направленностью изменения содержания данного пигмента в биомассе микроводоросли. Наибольший рост концентрации пигмента также был зарегистрирован для варианта с освещённостью 5 кЛк: содержание В-ФЭ увеличилось в 3.3 раза с 1 по 6 сутки культивирования, достигнув 74 мг/л, что являлось максимальным для условий данного эксперимента (рис. 3б). Снижение В-ФЭ после перехода культуры *P. purpureum* на стадию замедления роста и стационарную отмечено многими исследователями и связано с исчерпанием азота в среде и наблюдающейся на этом фоне деградацией ФБП, представляющих собой белковые комплексы [3, 6, 27]. Следует отметить, что снижение содержания В-ФЭ, обусловленное азотным лимитированием, наблюдалось только для варианта с минимальной освещённостью. Для двух других вариантов, учитывая, что прирост биомассы составил 25 и 38% от расчетного (для вариантов 15 и 10 кЛк соответственно), характер изменения содержания данного пигмента, по-видимому, определялся не концентрацией элементов минерального питания в среде, а уровнем освещённости клеток культуры. Заданный в эксперименте уровень освещённости 10 и 15 кЛк, по-видимому, являлся завышенным и ингибировал как ростовые процессы, так и процессы синтеза ФБП. Признано, что содержание в клетках *P. purpureum* фотосинтетических пигментов, особенно В-ФЭ, ввиду его локализации в антеннах, может являться чувствительным индикатором уровня освещённости клеток [12, 16]. Снижение содержания В-ФЭ, входящего в светособираю-

щие комплексы ФС II, в клетках *P. purpureum* к 6-м суткам в вариантах эксперимента с повышенной освещённостью до крайне низких величин на фоне остановки роста культуры, указывает на серьезные нарушения процессов биосинтеза в клетках, что может приводить даже к гибели культуры [10].

Относительное содержание пигментов в клетках или биомассе микроводорослей является не только непостоянной величиной и может изменяться в десятки раз, но и характеризуется значительной нелинейностью в процессе роста культуры [28]. Ранее была предложена модель, которая позволяет прогнозировать динамику содержания пигментов, в том числе фикобилиновой природы, при культивировании микроводорослей с заданной внешней освещённостью [28]. Модель основана на предположении, что наблюдаемая скорость изменения концентрации пигмента является алгебраической суммой скоростей синтеза, фотодеградации и восстановления части фотоокисленных пигментов:

$$\beta = \beta_{st} + (\beta_0 - \beta_{st}) \times e^{-\mu_m t} (c \sin \sqrt{\mu_\pi \mu_i} t + \cos \sqrt{\mu_\pi \mu_i} t) \quad (1)$$

где β_{st} – стационарное значение относительного содержания пигмента, β_0 – начальное содержание пигмента в клетках культуры микроводорослей, μ_m – максимальная удельная скорость роста культуры микроводорослей, μ_π – константа деградации или константа перехода пигмента в окисленное состояние, μ_i – константа возбуждения или константа перехода пигмента из основного в возбужденное состояние, определяемая внешней освещённостью, c – константа, определяемая значениями μ_π , μ_i , μ_m , а также t_{ext} – временем, соответствующим экстремуму функции.

Предлагаемая модель позволяет описать явление “ложного старта”, наблюдаемое при резком повышении освещённости клеток микроводорослей. В этом случае функция имеет явно выраженный минимум, который характеризуется параметрами β_{ext} и t_{ext} и совпадает с полученными экспериментальными данными (рис. 4).

Анализируя характер кривой, следует отметить, что на начальном этапе фотодеструктивное окисление В-ФЭ преобладает над его синтезом, поэтому величина β уменьшается. Момент запуска накопительной культуры *P. purpureum* сопровождается резким увеличением облученности, приходящейся на единицу биомассы. В таких условиях помимо изменения содержания пигментов происходит перестройка всего фотосинтетического аппарата клеток [13]. Высокое соответствие теоретических и экспериментальных данных ($R^2 = 0.95$) позволяет сделать вывод о том, что именно при учете процессов фотодеструктивного окисления пигментов с возможностью их последующего восстановления можно объяснить явление так называемого “ложного старта” динамики относительного содержания В-ФЭ при резком изменении облученности клеток *P. purpureum*. Таким образом, предлагаемая модель может быть использована для прогнозирования динамики содержания пигментов при культивировании *P. purpureum* с заданной внешней освещенностью.

Известно, что продукция ФБП зависит как от скорости роста культуры, так и от содержания данных пигментов в клетках микроводоросли [7, 18]. Наибольшая продуктивность по В-ФЭ накопительной культуры *P. purpureum* зарегистрирована для варианта эксперимента с поверхностной освещенностью 5 кЛк (табл. 2).

Поскольку повышение поверхностной освещенности в 3 раза (от 5 до 15 кЛк) приводит к уменьшению как содержания В-ФЭ в клетках *P. purpureum*, так и скорости роста культуры в 3 раза, то и продуктивность по данному пигменту снижается более чем в 6 раз, что также свидетельствует об угнетении биосинтеза ФБП. В общем, характер изменения продуктивности культуры *P. purpureum* по В-ФЭ совпадал с таковым у ранее рассчитанных ростовых параметров: средняя наблюдаемая скорость синтеза В-ФЭ и суммарный выход данного пигмента при освещенности 5 кЛк значительно превышают значения аналогичных характеристик культуры при повышенной освещенности (табл. 2).

На основании экспериментальных данных была получена классическая зависимость содержания В-ФЭ от удельной облученности: концентрация пигмента гиперболически снижалась с ростом удельной освещенности клеток *P. purpureum* (рис. 5). При малых интенсивностях света содержания пигмента (β) достигало максимального значения β_{\max} . С увеличением интенсивности света значения β снижались и в пределе достигали некоторого минимального значения β_{\min} . При удельной облученности около 10 Вт/(м² г) наблюдался “компенсационный пункт” фотосинтеза: дальнейшее снижение облученности приводило к “выцветанию” пигмента [29]. Отметим, что каж-

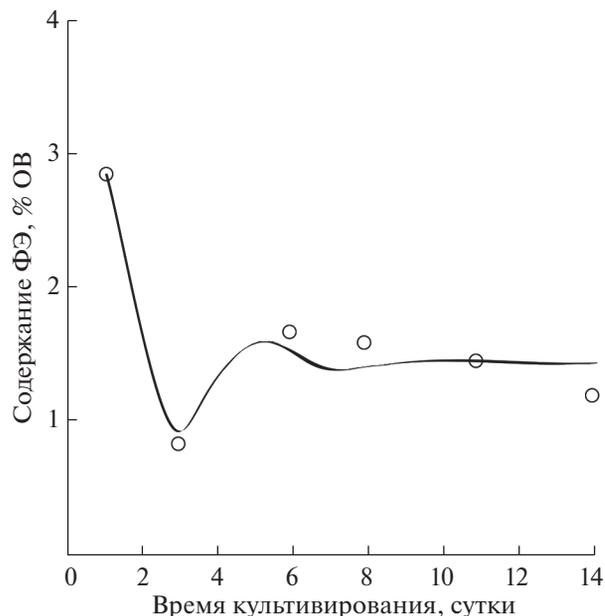


Рис. 4. Динамика содержания В-фикоэритрина в клетках *P. purpureum* при 15 кЛк. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1).

дая точка такой кривой является квазистационарным состоянием, которое определяется уровнем внешней освещенности и плотности культуры. Однако это состояние достигается в течение некоторого времени, при этом динамика переходного процесса во времени носит сложный нелинейный характер согласно (1).

Ранее была предложена модель, которая позволяет прогнозировать содержание пигментов при культивировании микроводорослей с заданной внешней освещенностью [30]. В стационарном процессе (непрерывная культура) величина относительного содержания пигмента в биомассе водоросли определяется отношением установившихся концентраций пигмента и биомассы. Отношение содержания пигмента к максимально возможному (без процесса деструкции) определяется отношением концентраций пигментов: наблюдаемых и максимальных. Наблюдаемая концентрация определяется балансом синтезированных и разрушенных пигментов. Сведение математиче-

Таблица 2. Скорость синтеза В-ФЭ и его содержание в культуре *P. purpureum* при различной освещенности

Освещенность, кЛк	Скорость синтеза В-ФЭ, мг/(л сут)	Выход В-ФЭ за 6 сут, мг/л
5	10.3	74
10	1.4	20
15	0.4	12

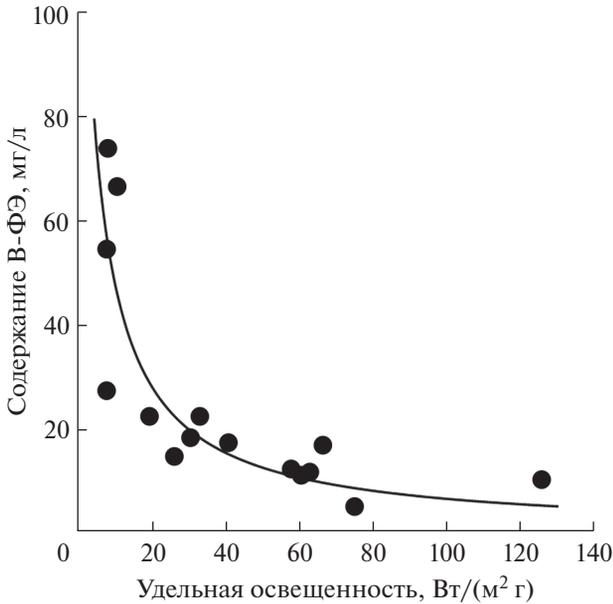


Рис. 5. Зависимость содержания В-фикоэритрина в культуре *P. purpureum* от удельной облученности. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (2).

ских форм записи происходящих процессов в единое целое приводит к следующей математической модели светозависимого содержания пигментов в клетках микроводорослей с учетом скорости роста:

$$\beta = \beta_{\max} \frac{\mu F_d}{\mu F_d + I_a}, \quad (2)$$

где β – относительное содержание пигмента в биомассе (%), β_{\max} – коэффициент, максимальное содержание пигмента в биомассе (%), μ – удельная скорость роста/сут, F_d – коэффициент, деструктивная доза световой энергии для пигмента, I_a – интенсивность освещения ($\text{Вт}/\text{м}^2$).

Среда обитания водорослей характеризуется неоднородностью и постоянно изменяющимися

световыми условиями. В результате адаптации к свету происходит структурно-функциональная перестройка фотосинтетического аппарата, направленная на более эффективное использование энергии светового потока. Концентрация пигментов в клетках является важнейшим показателем, который характеризует способность растительных клеток поглощать световую энергию. Модель (2) позволяет прогнозировать содержание В-ФЭ при различной освещенности и демонстрирует, что максимальное накопление пигментов будет в диапазоне освещенности 7–10 $\text{Вт}/(\text{м}^2 \text{ г})$. Продуктивность культуры была также значительно выше при освещенности 10–20 $\text{Вт}/(\text{м}^2 \text{ г})$ (в среднем, в 3–5 раз), чем в вариантах с более высокой освещенностью. Таким образом, при низкой освещенности клеток микроводоросли *P. purpureum*, незначительно превышающей компенсационный пункт фотосинтеза, наблюдается как рост продуктивности культуры, так и рост содержания В-ФЭ, что предопределяет высокую продукцию пигментов культурой, а низкий уровень поверхностной освещенности является предпочтительным для выращивания *P. purpureum*.

Существенные различия по условиям освещенности клеток отражались не только на содержании ФБП в культуре *P. purpureum*, но и на их соотношениях. При этом значения соотношений В-ФЭ/Р-ФЦ и ВВ-ФЭ/АФЦ при 5 кЛк были значительно выше (в среднем, в 2–3 раза) на всем протяжении эксперимента, по сравнению с вариантами с более высоким уровнем освещенности, что свидетельствует о более высокой доле В-ФЭ при низкой освещенности (рис. 6).

Следует отметить, что изменение содержания ФБП *P. purpureum* происходило неравномерно. Значения соотношения В-ФЭ/Р-ФЦ на протяжении эксперимента снижались для вариантов эксперимента 10 и 15 кЛк, причем максимальное снижение (на 60%) и минимальные значения данного соотношения (2.5) зарегистрированы для освещенности 15 кЛк (рис. 6а). Соотношение В-ФЭ/АФЦ

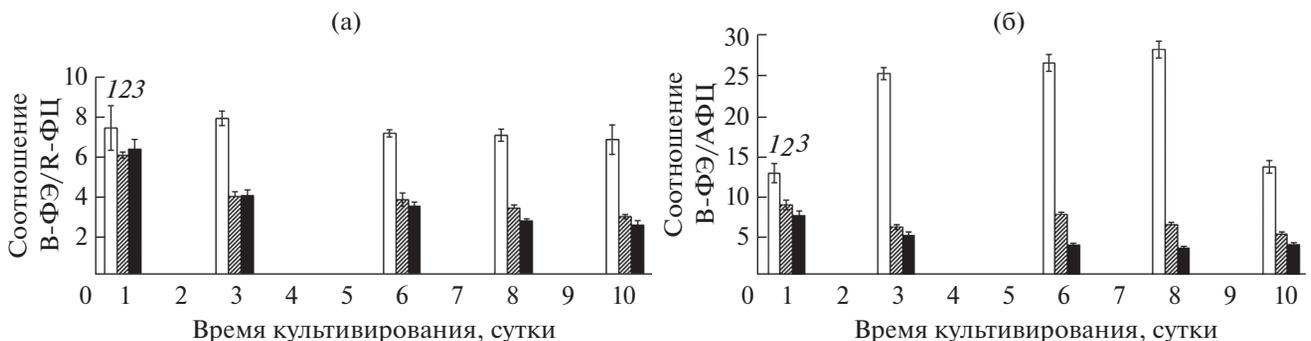


Рис. 6. Соотношение В-ФЭ/Р-ФЦ (а) и В-ФЭ/АФЦ (б) в культуре *P. purpureum* при различной освещенности. (1) 5 кЛк; (2) 10 кЛк; (3) 15 кЛк.

для вариантов эксперимента 10 и 15 кЛк также имело тенденцию к снижению на протяжении всего периода культивирования, причем минимальное значение (3.5) также зарегистрировано для варианта с максимальной освещенностью (рис. 6б). При освещенности 5 кЛк соотношение В-ФЭ/Р-ФЦ оставалось достаточно стабильным на протяжении всего эксперимента, несмотря на значительные изменения содержания В-ФЭ как в культуре, так и в клетках *P. purpureum*, что свидетельствует об отсутствии выраженного влияния световых условий на соотношение этих пигментов. В целом, культура *P. purpureum* при низкой освещенности (5 кЛк) характеризовалась значительно более высокой долей В-ФЭ по отношению к Р-ФЦ и АФЦ по сравнению с другими вариантами эксперимента, что соответствует современным представлениям о влиянии освещенности на количественные соотношения ФБП. Повышенная освещенность в эксперименте вызвала уменьшение значений соотношений В-ФЭ/Р-ФЦ и В-ФЭ/АФЦ в культуре *P. purpureum* до крайне низких значений (рис. 6). Уменьшение значения соотношения В-ФЭ/АФЦ для варианта с освещенностью 5 кЛк отмечено после 8-х суток эксперимента, что совпадало с переходом культуры на стационарную фазу роста и вероятным истощением элементов минерального питания в среде. Уменьшение индекса В-ФЭ/АФЦ в 2–4 раза, наблюдаемое при развитии азотного дефицита у *P. purpureum* (рис. 6б, 5 кЛк), свидетельствует о преимущественной деградации В-ФЭ по сравнению с АФЦ, находящимся в сердцевине антенных структур, что согласуется с литературными данными о большей лабильности фикоэритрина как светособирающего пигмента [16, 18].

Ранее было показано, что продуктивность *P. purpureum* по биомассе может достигать 0.5 г/(л сут), а по В-ФЭ – 30–50 мг/(л сут) [7, 18, 27]. Следует отметить, что продуктивность *P. purpureum* в проведенном эксперименте при 5 кЛк достигала 0.4 г/(л сут) и получена при освещенности в 4 раза ниже, чем в указанном выше опыте [18], а также без дополнительного введения CO₂ в газоздушную смесь. Полученные результаты демонстрируют возможность значительно уменьшить затраты на энергетическую составляющую при выращивании *P. purpureum* с сохранением высокой скорости роста культуры. Успешное решение задачи повышения скорости синтеза В-ФЭ позволит повысить рентабельность выращивания *P. purpureum* как источника этого ценного природного пигмента.

В заключении, следует отметить, что проведенный молекулярно-генетический анализ подтвердил таксономическую принадлежность штамма IBSS-70 к *P. purpureum*. Определены продукционные характеристики накопительной культуры *P. purpureum* в диапазоне поверхностной освещенности 5–15 кЛк. Прирост плотности культуры

микроводоросли, соответствующий расчетной концентрации азота в питательной среде, получен только для варианта эксперимента с освещенностью 5 кЛк. Самое высокое содержание В-ФЭ как в клетках, так и в культуре *P. purpureum* (5.5% сухого вещества и 74 мг/л) также наблюдалось при минимальной освещенности (5 кЛк). Определён характер изменения содержания В-ФЭ в культуре *P. purpureum* в зависимости от удельной освещенности клеток микроводоросли: максимальное содержание пигмента наблюдалось при освещенности порядка 10 Вт/(м² г). Предложена модель, позволяющая прогнозировать содержание В-ФЭ при различной освещенности. Показано, что световой параметр культивирования оказывал значительное влияние на скорость роста микроводоросли *P. purpureum*, скорость синтеза и выход В-ФЭ: более низкий уровень поверхностной освещенности являлся предпочтительным для выращивания *P. purpureum*. Предложенный подход позволяет получать 0.4 г/(л сут) биомассы *P. purpureum*, содержащей значительные количества В-ФЭ. Таким образом, в условиях эксперимента важнейшим фактором, определяющим продукционные характеристики культуры *P. purpureum*, являлся световой, что нужно учитывать при его культивировании.

Работа выполнена в рамках темы Госзадания Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского Российской академии наук” № АААА-А18-118021350003-6, а также при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00095).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borowitzka M.A. Microalgae as source of pharmaceutical and other biologically active compounds // J. Appl. Phycol. 1995. V. 7. P. 3. <https://doi.org/10.1007/BF00003544>
2. Razaghi A., Godhe A., Albers E. Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum* // Cent. Eur. J. Biol. 2014. V. 9. P. 156. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0248-z>
3. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jinget K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent // Biochem. Eng. J. 2016. V. 109. P. 282. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>
4. Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Биотехнология микроводорослей. М.: Научный мир, 2013. 184 с.
5. Asgharpour M., Rodgers B., Hestekin J.A. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium cruentum*: increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceu-

- tical products // *Energies*. 2015. V. 8. P. 10487. <https://doi.org/10.3390/en80910487>
6. Fuentes-Grunewald C., Bayliss C., Zanain M., Pooley C., Scolamacchia M., Silkina A. Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 189. P. 357. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.042>
 7. Fabregas J., Garcia D., Morales E., Dominguez A., Otero A. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity // *J. Ferment. Bioeng.* 1998. V. 86. P. 477. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80155-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80155-4)
 8. Kathiresan S., Sarada R., Bhattacharya S., Ravishankar A. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum* // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. V. 96. P. 456. <https://doi.org/10.1002/bit.21138>
 9. Sosa-Hernández J.E., Rodas-Zuluaga L.I., Castillo-Zacarias C., Rostro-Alanis M., Cruz R.; Carrillo-Nieves D., Salinas-Salazar C., Grunewald C.F., Llewellyn C.A., Olguin E.J., Lovitt R.W., Iqbal H.M.N., Parra-Saldívar R. Light intensity and nitrogen concentration impact on the biomass and phycoerythrin production by *Porphyridium purpureum* // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 460. <https://doi.org/10.3390/md17080460>
 10. Унитис В.В., Пакалне Д.С., Шульце И.Ф. Оптимизация минерального питания красной морской водоросли *Porphyridium cruentum* // *Известия АН Латвийской ССР*. 1989. Т. 505. С. 95.
 11. Судьїна О.Г., Шнюкова Э.І., Мушак П.О., Лось С.І., Фомішина Р.М., Тупік Н.Д., Лозова Г.І., Золотарьова О. К. Біохімія червоних водоростей. Київ: Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, 2007. 320 с.
 12. Velea S., Ilie L., Filipescu L. Optimization of *Porphyridium purpureum* culture growth using two variables experimental design: light and sodium bicarbonate // *Sci. Bull. – Univ. “Politeh.” Bucharest, Ser. B*. 2011. V. 73. P. 81.
 13. Тренкеншу Р.П. Влияние света на рост микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности // *Вопросы современной альгологии*. 2019. № 1 (19). С. 1. [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2019-1\(19\)-1-7](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2019-1(19)-1-7)
 14. Jahn W., Steinbiss J., Zetsche K. Light intensity adaptation of the phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium* // *Planta*. 1984. V. 16. P. 536. <https://doi.org/10.1007/BF00407086>
 15. Стадничук И.Н. Фикобилипротеины. Биологическая химия. М.: Мир, 1990. 196 с.
 16. Algarra P., Ruediger W. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability // *Plant Cell Environ.* 1993. V. 16. P. 149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00856.x>
 17. Sánchez-Saavedra M. del P., Castro-Ochoa F.Y., Nava-Ruiz V.M., Ruiz-Güereca D.A., Villagómez-Aranda A.L., Siqueiros-Vargas F., Molina-Cárdenas C.A. Effects of nitrogen source and irradiance on *Porphyridium cruentum* // *J. Appl. Phycol.* 2018. V. 30. P. 783. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1284-2>
 18. Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. Production characteristics of the microalga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew Ross (Rhodophyta) in batch and quasi-continuous culture // *Int. J. Algae*. 2014. V. 16. P. 271. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v16.i3.70>
 19. Zimmermann J., Jahn R., Gemeinholzer B. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols // *Org. Divers. Evol.* 2011. V. 11. P. 173.
 20. Drummond A.J., Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees // *BMC Evol. Biol.* 2007. V. 7. P. 214.
 21. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. P. 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
 22. Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers // *Syst. Biol.* 2008. V. 75. P. 758. <https://doi.org/10.1080/10635150802429642>
 23. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. думка, 1975. 247 с.
 24. Hara Y., Yokoyama A., Kim J.H. Systematic relationship of unicellular red algae: from phenetics to the phylogeny // *Algae*. 2000. V. 15. P. 7.
 25. Yokoyama A., Scott J.L., Zuccarello G.C., Kajikawa M., Hara Y., West J.A. *Corynoplatis japonica* gen. et sp. nov. and Dixonellales ord. nov. (Rhodellophyceae, Rhodophyta) based on morphological and molecular evidence // *Phycol. Res.* 2009. V. 57. P. 278. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2009.00547>
 26. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей // *Известия СО АН СССР. Серия биологических наук*. 1981. Т. 1. С. 75.
 27. Li T., Xu J., Wu H., Jiang P., Chen Z., Xiang W. Growth and Biochemical Composition of *Porphyridium purpureum* SCS-02 under Different Nitrogen Concentrations // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. P. 124. <https://doi.org/10.3390/md17020124>
 28. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование роста микроводорослей в культуре. Севастополь: ООО “Константа”, 2017. 152 с.
 29. Falkowski P.G., Owens T.G. Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. // *Plant Phycol.* 1980. V. 66. P. 592. <https://doi.org/10.1104/pp.66.4.592>
 30. Тренкеншу Р.П., Боровков А.Б., Ширяев А.В. Математическая модель светозависимого содержания пигментов в клетках морских микроводорослей в хемостате // *Экология моря*. 2005. Т. 69. С. 58.