
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ**

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ *COELASTRELLA MULTISTRIATA* (*SPHAEROPLEALES, CHLOROPHYTA*) В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

© 2022 г. С. Ю. Мальцева^а, М. С. Куликовский^а, Е. И. Мальцев^а, *

^аИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276 Россия

*e-mail: ye.maltsev@gmail.com

Поступила в редакцию 13.04.2022 г.

После доработки 26.04.2022 г.

Принята к публикации 10.05.2022 г.

Исследовано функциональное состояние накопительной культуры зеленой водоросли *Coelastrella multistriata* (Trenkwalder) Kalina et Puncsochánová в течение 60-суточного культивирования. Установлено содержание хлорофиллов *a*, *b* и *c*, суммарных каротиноидов, протеина, витаминов А и Е. Дана оценка интенсивности процессов перекисного окисления липидов в клетках штамма *C. multistriata* MZ–Ch23 по содержанию продуктов перекисной окисляции, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой. Определение этих продуктов проводили в биомассе микроводоросли на 15, 25 и 60 сут культивирования на среде ВВМ, а также после инициации перекисного окисления Fe²⁺. Среди фотосинтетических пигментов максимальное содержание показано для хлорофилла *a* во время экспоненциальной фазы роста – 14.82 мг/г сухой биомассы. Суммарное количество каротиноидов было сопоставимо с другими исследованными штаммами *Coelastrella* – в диапазоне 0.74–4.21% сухой массы. Для штамма MZ–Ch23 отмечена способность накапливать в высоких концентрациях ретинол (170.49–586.09 мкг/л культуры водоросли) и протеин (141.81–212.38 мг/л). Обнаружено, что во время всех фаз культивирования клетки *C. multistriata* характеризуются низкой концентрацией продуктов перекисного окисления липидов (0.005–0.015 нмоль/мг протеина), однако инициация перекисного окисления увеличивает количество ТБК-активных продуктов до 0.187 нмоль/мг протеина на 60 сут. Оптимальной стратегией для получения обогащенной вторичными метаболитами и устойчивой к перекисному окислению биомассы *C. multistriata* является культивирование на среде ВВМ в течении 25 сут. Это позволяет получать достаточное количество биомассы с высоким содержанием каротиноидов, протеина и витамина А.

Ключевые слова: витамины, зеленые водоросли, каротиноиды, протеин, тиобарбитуратактивные продукты, хлорофилл

DOI: 10.31857/S0026365622100299

Активное изучение возможности широкого использования водорослей в разных сферах биотехнологии (косметологии, сельском хозяйстве, производстве биотоплива) предполагает, что их биомасса станет очень ценным сырьем, т.к. водоросли не только способны накапливать значительные количества вторичных метаболитов, но и позволяют снизить площади задействованных сельскохозяйственных земель (Мокросноп, Золотарева, 2014; Maltsev et al., 2017; Jain et al., 2020). При этом разные таксономические группы водорослей могут решать различные биотехнологические задачи. Зеленые одноклеточные микроводоросли могут с успехом использоваться из-за быстрого ро-

ста в фотоавтотрофных условиях, высокого содержания насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, способности продуцировать большое количество триацилглицеринов (Hu et al., 2013; Maltsev et al., 2019, 2021c). Среди зеленых микроводорослей наиболее часто в качестве модельных объектов для определения биохимических характеристик и изучения продуктивности используются представители рода *Coelastrella* Chodat. Виды *Coelastrella* – это преимущественно одиночные, яйцевидной или эллипсоидной формы клетки с относительно толстой клеточной стенкой и многочисленными ребрами на ее поверхности, пристенным дольчатым хлоропластом и одним пиреноидом с крахмальной оберткой (Chodat, 1922). Среди основных биотехнологических преимуществ штаммов *Coelastrella* можно выделить: 1) способность одновременно накапливать большие концентрации липидов и каротиноидов (Abe et al., 2007; Minyuk et al., 2016, 2017); 2) высокое содер-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; Кар – содержание каротиноидов; ТБК-АП – продукты перекисного окисления липидов, которые определяются тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты); Хл *a* – хлорофилл *a*; Хл *b* – хлорофилл *b*; Хл *c* – хлорофилл *c*.

жание витамина Е в биомассе (Mudimu et al., 2017); 3) растительный источник омега-3 полиненасыщенных жирных кислот с концентрацией более 50% (Lang et al., 2011; Maltsev et al., 2021a); 4) применение в очистке сточных вод сельского хозяйства (Li et al., 2018); 5) возможно получение из клеточных липидов высококачественного биодизеля, соответствующего стандарту EN14214 (Minyuk et al., 2017).

Клеточный метаболизм в нормальных и стрессовых условиях в различных клеточных компартаментах производит АФК, которые могут повредить клеточные биомолекулы, включая липиды, белки и ДНК. В первую очередь АФК инициируют перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот с образованием перекисей липидов, которые могут негативно влиять на функциональное состояние клетки и снизить ее продуктивность в целом (Kaur et al., 2006). В связи с этим актуальным вопросом является поиск маркеров, которые позволят проводить оценку возможности длительного культивирования культур микроводорослей без потери целевых метаболитов в их биомассе. К таким маркерам можно отнести состав пигментов и его изменения в процессе выращивания (Pérez-Pérez et al., 2012). Содержание хлорофиллов является важным физиологическим параметром, который определяет активность фотосинтетического аппарата растений и их реакцию на неблагоприятные условия (Li et al., 2018). Каротиноиды, наряду с хлорофиллами, участвуют в фотосинтезе, а также обеспечивают фотозащиту и выступают в качестве низкомолекулярных антиоксидантов (Maltsev et al., 2021b). Индикаторами окислительного повреждения клеток водорослей, как следствия стрессовых условий, могут выступать продукты перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид и другие цитотоксические соединения (ТБК-активные продукты) (Garg, Manchanda, 2009). В связи с этим концентрация ТБКаП используется в качестве одного из наиболее информативных маркеров оценки степени негативного воздействия на водоросли (Rijstenbil, 2002).

Во время изучения разнообразия микроводорослей отвалов гранитных карьеров был выделен и идентифицирован штамм *C. multistriata* MZ–Ch23. С этим штаммом проведен ряд экспериментов для оценки влияния продолжительности культивирования и состава питательной среды на накопление биомассы, содержание липидов и состав жирных кислот (Maltsev et al., 2021a). Установлено, что на стандартной среде ВВМ 25-суточное культивирование, которое соответствует началу стационарной фазы роста, позволяет получить высокие значения сухой биомассы (до 1.3 г/л) с максимальным содержанием полиненасыщенных жирных кислот (66.8% от общего количества жирных кислот) и омега-3 (57.9%), в частности. В спектре жирных кислот доминантными были

18:3n-3 α -линоленовая (38.12%), 16:3n-3 *цис*-7,10,13-гексадекатриеновая (19.61%) и 16:0 пальмитиновая (18.61%) кислоты. В то же время известно, что стационарная фаза роста у большинства микроорганизмов сопровождается снижением интенсивности метаболизма, переключением на катаболизм протеинов, а также экспрессию генов, отвечающих за биосинтез энзимов репарации, метаболизм антиоксидантов и транспорт нутриентов (Hecker, Völker, 2001).

Учитывая перспективные результаты по накоплению биомассы и составу жирных кислот штаммом *C. multistriata* MZ–Ch23 во время стационарной фазы роста, целью работы было проанализировать функциональное состояние клеток микроводоросли в накопительной культуре в течение 60 сут культивирования с помощью физиологических маркеров и определить оптимальное время, во время которого биомасса водоросли имеет наибольшую биотехнологическую ценность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для исследований был использован штамм зеленой водоросли *Coelastrella multistriata* (MZ–Ch23) из Коллекции культур водорослей и цианобактерий лаборатории молекулярной систематики водных растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, выделенный из вскрывной породы молодого отвала на территории гранитного карьера Гурово (Тульская область, Россия).

Зрелые вегетативные клетки штамма имели эллипсоидную (10–12 \times 6–8 мкм), реже шаровидную форму (диаметр 6–14 мкм). Клеточная стенка относительно толстая и бесцветная. Клетки с пристенным дольчатым хлоропластом и одним пиреноидом с крахмальной оберткой. Бесполое размножение осуществляется эллипсоидными или продолговато-яйцевидными автоспорами (6–8 \times 4–6 мкм) (рис. 1).

Нуклеотидные последовательности представлены в GenBank: участок V4 18S рДНК – номер доступа MZ620281, участок ITS1–5.8S рДНК–ITS2 – номер доступа MZ620280 (Maltsev et al., 2021a).

В ходе эксперимента штамм выращивали в колбах объемом 250 мл с 150 мл среды ВВМ (Bischoff, Bold, 1963) и 10 мл инокулята с концентрацией клеток $0.18 \pm 0.01 \times 10^6$ шт./мл. После смешивания инокулята со средой концентрация клеток была $0.012 \pm 0.001 \times 10^6$ шт./мл (рис. 2). Культивирование осуществляли в 15 колбах – 5 повторов для сбора биомассы во время трех фаз роста. Концентрацию клеток измеряли с помощью автоматического счетчика клеток Bio-Rad TC20™ (“Bio-Rad”, США); для каждого измерения отбирали 10 мкл суспензии согласно рекомендациям про-

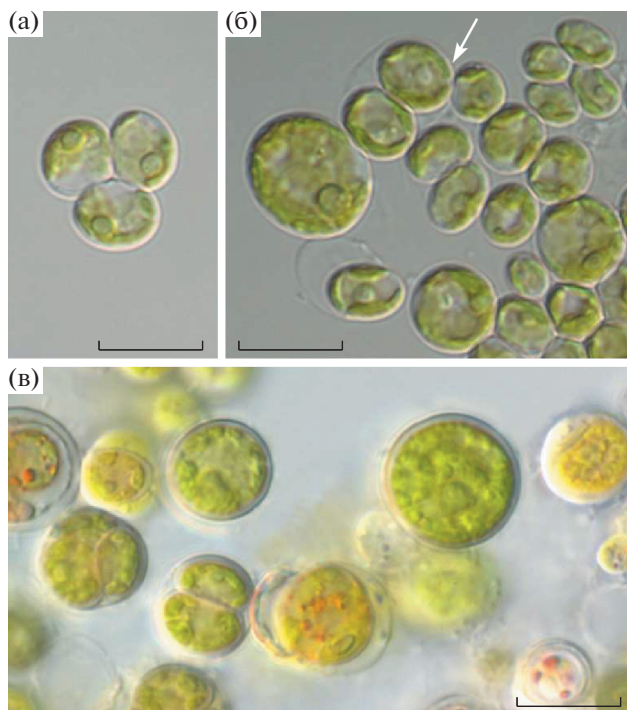


Рис. 1. *Coelastrella multistriata* MZ–Ch23: а – молодые вегетативные клетки; возраст культуры 15 сут; б – зрелая вегетативная клетка в окружении молодых клеток; возраст культуры 25 сут; стрелка указывает на спорангий; в – зрелые вегетативные клетки; возраст культуры 60 сут. Масштабная метка – 10 мкм.

изводителя. Микроводоросли культивировали с помощью орбитальных шейкеров ELMi Sky Line Shaker S-3L (Латвия) с постоянным перемешиванием при 150 об./мин в течение 60 сут; pH суспензии определяли с помощью настольного pH-метра Ohaus a-AV33PH (США). Изучение биохимических показателей проводили во время экспоненциальной фазы роста (15 сут культивирования), в начале стационарной фазы (25 сут) и после длительного выращивания (60 сут) (Maltsev et al., 2021a). Интенсивность света составляла 70 мкмоль фотонов/(м² с) с режимом освещения (ч) 16 : 8 день/ночь. Перед определением биохимических характеристик клетки водорослей отмывали от среды дистиллированной водой, осаждали центрифугированием (4000 об./мин, 10 мин) и удаляли жидкость над осадком. Операцию повторяли три раза.

$$\text{Хл } a = 11.85E_{664} - 1.54E_{647} - 0.08E_{630} \text{ (Jeffrey, Humphrey, 1974);}$$

$$\text{Хл } b = -5.43E_{664} + 21.03E_{647} - 2.66E_{630} \text{ (Jeffrey, Humphrey, 1974);}$$

$$\text{Хл } c1 + c2 = -1.67E_{664} - 7.60E_{647} + 24.52E_{630} \text{ (Jeffrey, Humphrey, 1974).}$$

Содержание каротиноидов определяли экстрактно-фотометрическим методом (Dere et al.,

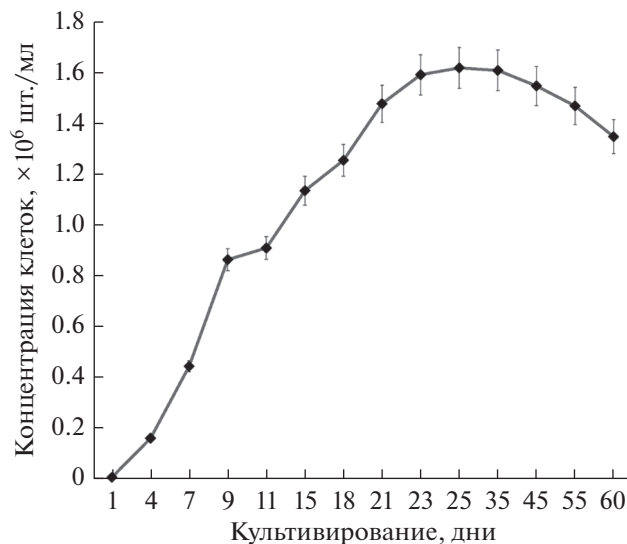


Рис. 2. Кривая роста штамма *Coelastrella multistriata* MZ–Ch23. На панели указана стандартная ошибка среднего.

Содержание хлорофиллов *a*, *b* и *c* определяли экстрактно-фотометрическим методом (Jeffrey, Humphrey, 1974). Для этого 5 мг биомассы водорослей подвергали замораживанию-размораживанию для частичного разрушения клеток. Количество используемой в анализе биомассы обусловлено чувствительностью метода Jeffrey, Humphrey (1974), который позволяет достоверно определить концентрацию пигментов от 0.2 мкг/мл. После разрушения клеток биомассу гомогенизировали в 4 мл 90% ацетона (“PanReac AppliChem”, Испания) с кварцевым песком, и оставляли для экстракции на 24 ч в герметичной пробирке без доступа света при температуре 25°C. Далее экстракт отделяли от осадка центрифугированием (6000 об./мин, 10 мин) и проводили измерения на спектрофотометре Ulab 102 (“Ulab”, Китай) относительно ацетона при длинах волн 664, 647 и 630 нм, что соответствует максимуму поглощения для Хл *a*, *b* и *c* соответственно. Измерения выполняли с использованием программного обеспечения MetaSpec Pro v 2.2 в режиме “Multi-wavelength Analysis”. Вычисление содержания хлорофиллов проводили по формулам и выражали в мг/г сухой биомассы:

1998). Для этого 5 мг биомассы подвергали замораживанию-размораживанию, после чего растирали

с кварцевым песком в 4 мл 100% ацетона. Полученный гомогенат оставляли на 24 ч в темном месте в герметично закрытой посуде для полного извлечения каротиноидов. После этого экстракт отделяли от обломков клеток центрифугированием

(6000 об./мин, 10 мин) и проводили измерения на спектрофотометре при длине волны 470 нм, что соответствует максимуму поглощения каротиноидов в 100% ацетоне. Расчет проводили по формуле и выражали в мг/г сухой биомассы:

$$\text{Кар} = 1000A_{470} - 2.270Xla - 81.4Xlb/227 \text{ (Dere et al., 1998).}$$

Содержание витаминов определяли методом тонкослойной хроматографии (Hossu et al., 2006). Предварительно 30 мг биомассы водорослей подвергали омылению в 0.5 н. растворе КОН в этаноле (“Sigma-Aldrich”, США). Для этого биомассу помещали в виалу и добавляли 1 мл спиртового раствора КОН, 10 мг аскорбиновой кислоты (“Диаэм”, Россия) и омыляли при температуре 90°C в течение 30 мин. Далее из полученного гидролизата экстрагировали спиртовые формы ретинола и α -токоферола путем многостадийной экстракции гексаном (“Sigma-Aldrich”, США). Для этого экстракцию проводили 4 раза, добавляя по 1.0, 1.0, 1.0 и 0.5 мл гексана к гидролизату, после чего смесь отстаивали и декантировали гексановый экстракт. Объединенные экстракты промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции по универсальной индикаторной бумаге. Далее экстракт упаривали в вакууме при температуре 55–60°C. Полученный сухой остаток растворяли в 100 мкл бензола (“PanReas AppliChem”, Испания) и наносили в объеме 10 мкл на линию старта пластины для тонкослойной хроматографии (силикагель 60; “Sigma-Aldrich”, США), и хроматографировали. В качестве подвижной фазы использовали хлороформ (“Sigma-Aldrich”, США), дистанция прохода растворителя 8.5 см, для детектирования положения пятен витаминов рядом с исследуемыми образцами наносили раствор стандартных веществ. Для проявления веществ использовали детектирующий 1%-раствор фосфорномолибденовой кислоты (“ЛенРеактив”, Россия) в этаноле, в который погружали пластины на 10 с, после чего просушивали от растворителя и прогревали в термостате 5 мин при 100°C. Витамины проявлялись в виде синих пятен на желтом фоне, обесцвечивание фона проводили путем выдерживания пластины в парах аммиака в течении 20 с. Далее пластины сканировали и измеряли площадь и высоту пиков в программе Sorbfil TLC Videodensitometr v2.3.0. Концентрацию определяли путем сравнения с калибровочным графиком, построенным с использованием стандартных растворов ретинола (“Sigma-Aldrich”, США) и α -токоферола (“Sigma-Aldrich”, США), которые разделяли и детектировали на пластине в аналогичных с исследуемыми пробами условиях.

Определение содержания протеинов проводили бицинхоиновым методом (Jain et al., 2020). Для этого 10 мг биомассы подвергали замораживанию-размораживанию и гомогенизировали с кварцевым песком в среде 1 мл этанола для экстракции и удаления хлорофиллов и липофильных веществ. Далее экстракт отделяли от осадка центрифугированием (6000 об./мин, 10 мин), осадок ресуспендировали в 1 мл экстрагирующего фосфатного буфера (0.1 М, pH 7.5, SDS 0.5%; “Sigma-Aldrich”, США) и оставляли на 12 ч при температуре 25°C. Для построения калибровочного графика использовали стандартный раствор бычьего сывороточного альбумина (“Thermo Scientific”, США).

Содержание ТБК-активных продуктов определяли по их способности образовывать в кислой среде при нагревании окрашенный комплекс с 2-тиобарбитуровой кислотой (Zeb, Ullah, 2016). Экстракцию ТБК-активных продуктов проводили 1.2% раствором хлорида калия (“PanReas AppliChem”, Испания). Для этого к 0.1 г биомассы водорослей добавляли 0.9 мл хлорида калия и гомогенизировали с кварцевым песком. Для отделения супернатанта от осадка гомогенат центрифугировали (9000 об./мин, 15 мин).

Для определения содержания ТБКаП в исходном гомогенате к 0.2 мл экстракта прибавляли 1.6 мл фосфатного буфера (0.5 М, pH 7.35) и 1 мл раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (“Sigma-Aldrich”, США), приготовленной на ледяной уксусной кислоте. После этого смесь нагревали 60 мин при 95°C. Далее реакционную среду охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при 532 нм.

Также определяли содержание ТБКаП при индукции процессов пероксидного окисления липидов (ТБКаП_{ин}). В реакционную среду, которая содержала 0.2 мл гомогената и 1.5 мл фосфатного буфера добавляли 0.1 мл 1% раствора сульфата железа II (“ЛенРеактив”, Россия) и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. Для определения ТБКаП_{ин} проводили аналогичные действия, описанные выше. Для расчета концентрации использовали следующую формулу:

$$C = D \times 28/31.2,$$

где C – концентрация ТБКаП (нмоль/г); D – оптическая плотность; 28 и 31.2 – коэффициенты, учитывающие специфическое молярное погло-

шение триметинового комплекса ТБК с ТБК-активными продуктами и степень разведения (для объема инкубационной среды – 2.8 мл).

Все измерения были проведены в пяти повторностях, числа в табл. 1 и 2 показывают среднюю величину и ошибку средней. Статистические данные получены в программе Microsoft Excel (v. 1903).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хлорофиллы являются важными пигментами поглощения световой энергии для фотосинтеза, высокая интенсивность которого способствует увеличению биомассы клеток при благоприятных условиях роста. В результате исследований установлено, что штамм *C. multistriata* MZ–Ch23 продуцировал максимальное количество хлорофиллов в экспоненциальной (“зеленой”) фазе роста – 2.35% сухой массы (табл. 1), а наибольшая концентрация Хл *a* достигала 14.82 мг/г или 1.48%. После перехода культуры в стационарную (“красную”) фазу количество хлорофиллов снижалось до 1.1%, а к 60 сут опускалось до 0.12%. При этом после длительного культивирования происходило изменение состава хлорофиллов – на первое место по содержанию выходит Хл *b*, а далее с немного меньшим значением следует Хл *c*. Примечательно, что для штаммов *Coelastrella* и ранее было показано значительное снижение содержания Хл *a*, Хл *b* в стационарной фазе роста по сравнению с экспоненциальной (Abe et al., 2007; Minyuk et al., 2016, 2017). В частности, Abe et al. (2007) установили, что для штамма *C. striolata* var. *multistriata* (Trenkwalder) Kalina et Puncochárová в логарифмической фазе роста содержание Хл *a* варьировало от 0.75 до 15–18 мг/г сухой массы, а Хл *b* – до 6.0 мг/г. Отмечено, что кривая изменения концентрации Хл *a* зависела от объема реактора и времени инкубации, и максимальное содержание Хл *a* достигалось через 10–20 сут от начала культивирования. После перехода культуры в стационарную фазу содержание Хл *a* и Хл *b* опускалось до 0.3 мг/г, что по значениям очень близко к полученным нами результатам на 60 сут (табл. 1). В то же время для штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 установлено, что в начале культивирования содержание хлорофиллов находилось на уровне 5.8% сухой массы для Хл *a* и 2.2% для Хл *b* (Minyuk et al., 2016, 2017), а в стационарной фазе отмечено снижение количества пигментов до уровня 0.2–0.5 и 0.2–0.25% в зависимости от условий и времени инкубирования. Следовательно, полученные нами результаты по количеству хлорофилла в конце культивирования сопоставимы с данными по штамму *Coelastrella striolata* var. *multistriata* (Abe et al., 2007). При этом их содержание в экспоненциальной фазе было в 3 и более раз меньше по сравнению с показателями для *C. rubescens* (Vi-

natzer) Kaufnerová et Eliás (Minyuk et al., 2016, 2017). Значительные отличия по содержанию хлорофиллов могут быть связаны с различными условиями выращивания культуры и в первую очередь – с интенсивностью освещения. Abe et al. (2007) показали, что повышение интенсивности освещения с 13 до 40 мкмоль фотонов/(м²с) сопровождалось увеличением количества Хл *a* в 1.8 раз. В нашем исследовании штамм *C. multistriata* MZ–Ch23 культивировали при интенсивности освещения 70 мкмоль фотонов/(м²с), в работе Abe et al. (2007) интенсивность освещения составляла 65 мкмоль фотонов/(м²с), в то время как штамм *C. rubescens* IPPAS H-350 выращивали под воздействием света большей интенсивности: 136–140 мкмоль фотонов/(м²с) (Minyuk et al., 2016, 2017), что может обуславливать описанные отличия в результатах.

Показательной характеристикой культур микроводорослей является количество синтезируемых метаболитов в единице объема культивируемой суспензии. Культура штамма *C. multistriata* MZ–Ch23 содержала от 2.57 до 11.63 мг/л хлорофиллов через 25 сут культивирования (табл. 2). Эти данные значительно превосходят объемную концентрацию Хл *a* у штамма *Coelastrella* sp. после 16 сут выращивания в стрессовых условиях, вызванных введением в питательную среду ADSW ионов Cu²⁺ с концентрацией 1–3 мг/л (Li et al., 2018). Поддержание культур микроводорослей в стационарной фазе роста может оказывать схожее воздействие на физиологические процессы в клетке, как и стрессирование во время экспоненциальной фазы. В данном случае воздействие высоких доз меди частично моделирует процессы, происходящие в “красной” фазе роста, а именно, запуск процессов биосинтеза факторов репарации и метаболизма антиоксидантов, поскольку медь, накапливаясь в клетках, приводит к генерации АФК, которые вызывают антиоксидантный ответ (İşeri et al., 2011).

Так же нами впервые установлено накопление Хл *c* для представителей рода *Coelastrella*, о чем не сообщалось ранее. Хлорофилл *c* является дополнительным пигментом, присутствует у многих фотосинтезирующих организмов (Jeffrey et al., 2011) и выполняет функцию фотоконцентрации и передачи энергии в реакционный центр (Blankenship, 2002). Накопление Хл *c* штаммом *C. multistriata* MZ–Ch23 во время стационарной фазы роста в количестве 0.41–2.74 мг/г на фоне активации синтеза вторичных метаболитов (каротиноидов) может быть компенсаторной реакцией, направленной на поддержание фотосинтетических процессов при снижении содержания Хл *a* и Хл *b* (табл. 1). Поскольку Хл *c* не имеет изопреноидного хвоста (Blankenship, 2002; Jeffrey et al., 2011), его биосинтез, в отличие от Хл *a*, Хл *b* и каротиноид-

Таблица 1. Биохимические показатели сухой биомассы *Coelastrella multistriata* в зависимости от продолжительности культивирования ($M \pm m; n = 5$)

Параметр	Экспоненциальная фаза (15 сут)		Стационарная фаза (25 сут)		Длительное выращивание (60 сут)	
	масса	%	масса	%	масса	%
Хлорофилл <i>a</i>	14.82 ± 0.74 мг/г	1.48	6.83 ± 0.34 мг/г	0.68	0.32 ± 0.14 мг/г	0.03
Хлорофилл <i>b</i>	7.05 ± 0.34 мг/г	0.71	1.52 ± 0.08 мг/г	0.15	0.50 ± 0.16 мг/г	0.05
Хлорофилл $c_1 + c_2$	1.59 ± 0.07 мг/г	0.16	2.74 ± 0.14 мг/г	0.27	0.41 ± 0.15 мг/г	0.04
Каротиноиды	7.42 ± 0.37 мг/г	0.74	11.34 ± 3.26 мг/г	1.14	42.11 ± 2.11 мг/г	4.21
Ретинол	167.15 ± 8.34 мкг/г	—	342.74 ± мкг/г	—	219.82 ± 5.74 мкг/г	—
α -Токоферол	15.81 ± 0.78 мкг/г	—	22.70 ± 4.10 мкг/г	—	58.36 ± 2.92 мкг/г	—
Протеин	198.91 ± 9.93 мг/г	19.89	122.20 ± 3.91 мг/г	12.42	97.76 ± 4.89 мг/г	9.78
ТБКаП	0.91 ± 0.04 нмоль/г 0.005 нмоль/мг протеина	—	1.27 ± 0.06 нмоль/г 0.011 нмоль/мг протеина	—	1.45 ± 0.63 нмоль/г 0.015 нмоль/мг протеина	—
ТБКаП _{ин}	1.32 ± 0.07 нмоль/г 0.007 нмоль/мг протеина	—	2.56 ± 0.12 нмоль/г 0.021 нмоль/мг протеина	—	18.28 ± 3.95 нмоль/г 0.187 нмоль/мг протеина	—

Таблица 2. Биохимические показатели суспензии *Coelastrella multistriata* в зависимости от продолжительности культивирования ($M \pm m$; $n = 5$)

Параметр	Экспоненциальная фаза (15 сут)	Стационарная фаза (25 сут)	Длительное выращивание (60 сут)
Биомасса, г/л	1.02 ± 0.05	1.71 ± 0.06	1.45 ± 0.06
Количество клеток, ×10 ⁶ шт./мл	11.31 ± 0.45	16.15 ± 0.47	13.44 ± 0.57
pH	8.55 ± 0.45	9.22 ± 0.46	9.41 ± 0.57
Хлорофилл <i>a</i> , мг/л	15.1 ± 0.77	11.63 ± 0.58	0.44 ± 0.03
Хлорофилл <i>b</i> , мг/л	7.24 ± 0.36	2.57 ± 0.13	0.73 ± 0.04
Хлорофилл <i>c</i> ₁ + <i>c</i> ₂ , мг/л	1.63 ± 0.08	4.62 ± 0.23	0.58 ± 0.03
Каротиноиды, мг/л	7.55 ± 0.38	19.49 ± 0.96	61.05 ± 3.05
Ретинол, мкг/л	170.49 ± 8.53	586.09 ± 29.31	318.74 ± 15.98
α-Токоферол, мкг/л	16.13 ± 0.82	38.82 ± 1.94	84.62 ± 4.25
Протеин, мг/л	202.88 ± 10.15	212.38 ± 10.62	141.81 ± 7.12
ТБКаП, нмоль/л	0.93 ± 0.05	2.17 ± 0.11	2.48 ± 0.12
ТБКаП _{ин} , нмоль/л	1.35 ± 0.07	4.38 ± 0.22	31.30 ± 1.57

дов, не требует вовлечения изопреноидных фрагментов. Соответственно, переключение на синтез Хл *c* при активации каротиногенеза может быть одним из механизмов адаптации к неблагоприятным условиям, которыми характеризуется стационарная фаза роста, поскольку наступает в результате нехватки питательных веществ или других стресс-факторов (Necker, Völker, 2001).

Накопление каротиноидов является результатом активации метаболизма антиоксидантов (Necker, Völker, 2001) и направлено на снижение негативного воздействия стрессорных факторов, поскольку каротиноиды обладают более сильными антиоксидантными свойствами, нежели другие внутриклеточные антиоксиданты, например, α-токоферол и витамин С (Sies et al., 1992; Del Mondo et al., 2020). В частности, β-каротин играет важную роль в виолоксантиновом цикле светозащиты, является антиоксидантом, обеспечивающим нейтрализацию АФК и триплетного хлорофилла (Smerilli et al., 2016; Toti et al., 2018). Причем для некоторых высших растений установлен механизм прямого преобразования β-каротина в зеаксантин, который позволяет избежать фотоингибирования (Wright et al., 2011). Зачастую ответом на излишнее образование АФК, которое наблюдается в стационарной фазе роста, является снижение содержания ненасыщенных жирных кислот в клетке (Pamplona, 2008). Поскольку ранее в биомассе *C. multistriata* MZ–Ch23 было установлено высокое содержание ненасыщенных жирных кислот (78.84% от их общего количества; Maltsev et al., 2021a), можно предположить, что исследованный штамм имеет другой механизм повышения устойчивости к действию свободных радикалов, на-

пример, за счет накопления большого количества низкомолекулярных антиоксидантов (в том числе каротиноидов). В целом для штамма *C. multistriata* MZ–Ch23 установлено общее содержание каротиноидов на уровне 7.42–42.11 мг/г (0.74–4.21% сухой массы) и увеличение их содержания с возрастом культуры. Подобная тенденция установлена для штамма *Coelastrella* sp. F50, который показал возможность накопления каротиноидов до 4.08% сухой биомассы (Hu et al., 2013). Abe et al. (2007) сообщают, что штамм *C. striolata* var. *multistriata* характеризовался суммарным содержанием β-каротина, кантаксантина и астаксантина в количестве 0.84% сухой биомассы во время “зеленой” фазы роста и увеличением этого значения до 5.6% во время “красной”, что незначительно превышает полученный нами результат. При этом такие высокие результаты для *C. striolata* var. *multistriata* по накоплению каротиноидов удалось получить при освещении 65 мкмоль фотонов/(м² с) и увеличении в 2 раза (до 500 мг/л) концентрации NaNO₃ в среде BBM (Abe et al., 2007). В тоже время для штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 отмечена противоположная тенденция, а именно уменьшение количества каротиноидов с возрастом культуры – с 1.8% во время экспоненциальной фазы и до 0.6% во время “красной” (Minyuk et al., 2016, 2017).

Витамин А (ретинол) является продуктом вторичного метаболизма микроводорослей, прекурсором которого выступают каротиноиды (Toti et al., 2018). Ретинол и его окисленные формы обеспечивают важные функции в организме человека и животных: способствуют дифференциации и росту тканей, выполняют репродуктивную, иммунную и рецепторную функцию, проявляют антиокси-

дантные свойства (Imdad et al., 2017). Для зеленых водорослей установлена способность синтезировать витамин А в широком диапазоне от 10 до 4280 мкг/г сухой биомассы (Santiago-Morales et al., 2018; Del Mondo et al., 2020). При этом исследованный штамм *C. multistriata* характеризовался способностью к накоплению витамина А в пределах 167.15–342.74 мкг/г с максимальным значением на 25 сут культивирования. Анализ объемного содержания, которое является более показательным выражением продуктивности штамма, показывает возможность получения ретинола до 586.09 мкг/л культуры водоросли после 25 сут культивирования (табл. 2).

Витамин Е (α -токоферол) играет очень важную функцию в клетках микроводорослей – является антиоксидантом и, наряду с β -каротином, препятствует возникновению фотоокислительного стресса (Del Mondo et al., 2020). Как и витамин А, α -токоферол в клетках зеленых водорослей продуцируется в разном количестве: известна способность некоторых видов *Chlorophyta* накапливать витамин Е до 785 мкг/г (Mudimu et al., 2017). В биомассе штамма MZ–Ch23 обнаружено небольшое количество α -токоферола: 15.81–58.36 мкг/г сухой массы. Данный показатель сопоставим с результатами, полученными для штаммов *Enallax costatus* SAG 46.88 (19.22 мкг/г), *Scenedesmus vacuolatus* SAG 211-11 m (43.65 мкг/г) и *Tetradesmus obliquus* SAG 276–1 (50.82 мкг/г) во время стационарной фазы при выращивании на среде BBM с утроенной концентрацией нитратов (Mudimu et al., 2017). При этом другие штаммы рода *Coelastrella* продуцируют значительно больше α -токоферола: 424.35 мкг/г (*C. terrestris* SAG 477a), 508.28 мкг/г (*C. oocystiformis* SAG 277–1) и 509.11 мкг/г (*C. rubescens* SAG 475a) (Mudimu et al., 2017). В целом отмечено, что значительное накопление α -токоферола чаще наблюдается во время стационарной фазы роста по сравнению с логарифмической, что обуславливается активацией вторичного метаболизма антиоксидантных веществ в более стрессовых условиях “красной” фазы (Hecker, Völker, 2001; Mudimu et al., 2017). В то же время относительно низкое содержание α -токоферола у штамма MZ–Ch23 может быть связано с активацией биосинтеза каротиноидов, для образования которых используются изопреноидные фрагменты (DellaPenna, Rogson, 2006). Установлено, что изопреноидные фрагменты расходуются в первую очередь на биосинтез продуктов с большей антиоксидантной активностью – в данном случае это будут каротиноиды, а не витамин Е (Sies et al., 1992; Del Mondo et al., 2020). С другой стороны, как указано выше, у штамма MZ–Ch23 стационарная фаза роста характеризуется низким содержанием хлорофилла, что приводит к снижению интенсивности фотосинтетических процессов, и, соответственно, биосинтеза α -токоферола, поскольку

он может синтезироваться только в условиях активного фотосинтеза (Мокросноп, Золотарева, 2014).

Ранее для штаммов *Coelastrella* было установлено содержание протеина в сухой биомассе на уровне 317.7 мг/г во время экспоненциальной фазы и снижение до 104.9 мг/г в стационарной (Minyuk et al., 2017). Считается, что такое снижение является типичным для стрессированных каротиногенных клеток микроводорослей, а в конкретном случае у штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 вызвано 10-кратным уменьшением концентрации азота и фосфора в стандартной среде BBM. В таких условиях падение количества белка в клетке может быть связано с нехваткой азота и его перераспределением путем аутофагии, вызванной стрессом (Pérez-Pérez et al., 2012; Minyuk et al., 2017). Также для штамма *Coelastrella* sp. известно объемное содержание белка равное 180 мг/л во время стационарной фазы роста на среде ADSW (Li et al., 2018). Показатели, полученные нами для штамма MZ–Ch23 (табл. 1, 2), характеризуют его как более продуктивный в контексте накопления белка в стационарной фазе по сравнению со штаммом IPPAS H-350 (Minyuk et al., 2017). Исследуемый штамм *C. multistriata* имел более высокие показатели как в количестве белка в сухой биомассе (122.2 мг/г по сравнению с 104.9 у штамма *C. rubescens*), так и в объемном отношении (212.39 мг/л по сравнению с 83.4 в стационарной фазе, 202.88 и 54.8 мг/л в экспоненциальной фазе у штамма *C. rubescens*).

Содержание ТБК-активных продуктов может косвенно отражать интенсивность пероксидных процессов в клетке, а также указывать на состояние системы антиоксидантной защиты, поскольку генерируемые АФК атакуют жирные кислоты липидов и приводят к накоплению ТБК-активных продуктов и пероксидов липидов (Wang et al., 2017; Li et al., 2018). Исследуемый штамм *C. multistriata* MZ–Ch23 на всех фазах роста характеризовался низким исходным содержанием ТБКаП – 0.005–0.015 нмоль/мг протеина с наивысшим значением на 60-е сутки. Индукция пероксидного окисления липидов ионами Fe^{2+} привела к увеличению количества ТБКаП_{инн} в 1.4–12.5 раз (табл. 1). Небольшая разница между ТБКаП и ТБКаП_{инн} во время экспоненциальной и стационарной фаз указывает на функциональную стабильность клеток и устойчивость к стрессу. Наибольший эффект оказывает стимулирование пероксидного окисления в конце культивирования – ТБКаП_{инн} возросло до 0.187 нмоль/мг протеина. Такого рода изменения показывают низкую устойчивость штамма к оксидативному стрессу в это время, что может быть связано со значительным содержанием ненасыщенных жирных кислот в клетках (до 78.84%), которые, как известно, являются основным субстратом липопероксидации (Gamliel et al.,

2008; Galván, 2017). В данном случае длительное воздействие факторов, запускающих процессы липопероксидации, постепенно приведут к истощению внутримолекулярных антиоксидантов, а в последствии и к гибели клетки. В то же время, если сравнить содержание ТБКаП в клетках других штаммов *Coelastrella*, то результат покажет перспективность использования в биотехнологии штамма MZ—Ch23. Так, концентрация ТБКаП в интактных клетках штамма *Coelastrella* sp. составила 0.705 нмоль/мг протеина, что более чем в 30 раз выше полученных нами результатов (Li et al., 2018). Последующее 16-сут инкубирование данного штамма в среде ADSW с добавлением Cu^{2+} приводило к значительному повышению концентрации ТБКаП до 3.3—6.5 нмоль/мг протеина, что свидетельствует о накоплении в клетках меди и, соответственно, активации пероксидных процессов. Результатом угнетения процессов антиоксидантной защиты стало значительное снижение содержания ненасыщенных жирных кислот в составе липидов клеток (Li et al., 2018).

Известно, что представители рода *Coelastrella* относятся к стенобионтным микроводорослям по отношению к кислотности среды при культивировании (Minyuk et al., 2016). На примере штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 показано, что оптимум рН среды находится в диапазоне 6.0—7.0. В этих условиях скорость роста, содержание Хл *a*, суммарных каротиноидов и полиненасыщенных жирных кислот были самыми высокими (Minyuk et al., 2016). При выполнении эксперимента в накопительной культуре штамма MZ—Ch23 нами было отмечено быстрое защелачивание суспензии до рН 9.22 уже на 25 сут культивирования (табл. 2), в то время как в начале выращивания значение рН было 6.90. На 60 сут культивирования отмечено наибольшее смещение рН в сторону высоких значений (рН 9.41) Следует отметить, что культура *C. multistriata* показала меньшую способность к защелачиванию среды, чем с *C. rubescens*, в суспензии которой значение рН достигало 10.5 во время выращивания без обогащения культуры CO_2 (Minyuk et al., 2016). В дальнейшем будет продолжена работа по изучению влияния изменения рН среды на функциональное состояние клеток *C. multistriata*.

В целом, предыдущие наши отчеты и настоящее исследование показывают, что биохимические характеристики биомассы штамма *C. multistriata* MZ—Ch23 являются ценными с точки зрения биотехнологического использования. Перспективным представляется его культивирование на стандартной среде ВВМ в течение ранней стационарной фазы. Именно 25-сут культивирование позволяет получить биомассу, с одной стороны, богатую биологически активными веществами (в первую очередь омега-3 жирными кислотами, ка-

ротиноидами, витамином А и протеином), а с другой — устойчивую к пероксидному окислению липидов. На основании вышеизложенного можно сделать общий вывод, что для штаммов *Coelastrella* стрессирование условий культивирования изменением состава питательной среды или добавлением тяжелых металлов является нерациональным подходом, поскольку приводит к ухудшению качества культуры, расходованию антиоксидантных субстратов на подавление усиливающихся процессов пероксидного окисления липидов, и как следствие — к перестройке метаболизма липидов на снижение количества ненасыщенных жирных кислот.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Биохимические исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-10076). Поддержание культуры микроводоросли осуществлялось в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700045-3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мокросноп В.М., Золотарева Е.К. Микроводоросли как продуценты токоферолов // *Biotechnol. Acta.* 2014. V. 7. P. 26—33.
- Abe K., Hattori H., Hirano M. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* // *Food Chem.* 2007. V. 100. P. 656—661.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.026>
- Bischoff H.W., Bold H.C. Phycological studies IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species. University of Texas Publication 6318, 1963. 95 p.
- Blankenship R.E. Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Hoboken: Wiley Blackwell, 2002. 321 p.
- Chodat R. Matériaux pour l'histoire des algues de la Suisse // *Bulletin de la Société Botanique de Geneve, série 2.* 1922. V. 13. P. 66—114.
- Del Mondo A., Smerilli A., Sané E., Sansone C., Brunet C. Challenging microalgal vitamins for human health // *Microb. Cell Fact.* 2020. V. 19. 201.
<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01459-1>
- DellaPenna D., Pogson B.J. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids // *Annu. Rev. Pl. Biol.* 2006. V. 57. P. 711—738.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301>

- Dere Ş., Güneş T., Sivaci R. Spectrophotometric determination of chlorophyll – A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents // Tr. J. Botany. 1998. V. 22. P. 13–17.
- Hecker M., Völker U. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria // Adv. Microbial Physiol. 2001. V. 44. P. 35–91.
https://doi.org/10.1016/S0065-2911(01)44011-2
- Hossu A.-M., Rădulescu C., Ilie M., Bălălaşu D., Magearu V. Qualitative and semiquantitative TLC analysis of vitamins A, D and E // Revista de Chimie. 2006. V. 57. P. 1188–1189.
- Hu C.-W., Chuang L.-T., Yu P.C., Chen C.-N.N. Pigment production by a new thermotolerant microalga *Coelastrrella* sp. F50 // Food Chem. 2013. V. 138. P. 2071–2078.
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.133
- Galván I. Evidence of evolutionary optimization of fatty acid length and unsaturation // J. Evol. Biol. 2017. V. 31. P. 172–176.
https://doi.org/10.1111/jeb.13198
- Gamliel A., Afri M., Frimer A.A. Determining radical penetration of lipid bilayers with new lipophilic spin traps // Free Rad. Biol. Med. 2008. V. 44. P. 1394–1405.
https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.028
- Garg N., Manchanda G. ROS generation in plants: boon or bane? // Plant Biosyst. 2009. V. 143. P. 81–96.
https://doi.org/10.1080/11263500802633626
- Imdad A., Mayo-Wilson E., Herzer K., Bhutta Z.A. Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from six months to five years of age // Cochrane Database Syst. Rev. 2017. CD008524.
https://doi.org/10.1002/14651858.cd008524.pub3
- İşeri Ö.D., Körpe D.A., Yurtcu E., Sahin F.I., Haberal M. Copper-induced oxidative damage, antioxidant response and genotoxicity in *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Cucumis sativus* L. // Plant. Cell. Rep. 2011. V. 30. P. 1713.
https://doi.org/10.1007/s00299-011-1079-x
- Jain A., Jain R., Jain S. Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology. N.Y.: Springer, 2020. 282 p.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1974. V. 167. P. 191–194.
https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3
- Jeffrey S., Wright S., Zapata M. Microalgal classes and their signature pigments // Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography (Cambridge Environmental Chemistry Series) / Eds. Roy S., Llewellyn C., Egeland E., Johnsen G. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. P. 3.
- Kaur G., Alam M.S., Jabbar Z., Javed K., Athar M. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers // J. Ethnopharmacol. 2006. V. 108. P. 340–348.
https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.021
- Lang I., Hodac L., Friedl T., Feussner I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection // BMC Pl. Biol. 2011. V. 11. P. 124.
https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-124
- Li X., Yang W.L., He H., Wu S., Zhou Q., Yang C., Zeng G., Lou L., Lou W. Responses of microalgae *Coelastrrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater // Bioresour. Technol. 2018. V. 251. P. 274–279.
https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.058
- Maltsev Y.I., Konovalenko T.V., Barantsova I.A., Maltseva I.A., Maltseva K.I. Prospects of using algae in biofuel production // Regul. Mech. Biosyst. 2017. V. 8. P. 455–460.
https://doi.org/10.15421/021770
- Maltsev Y., Krivova Z., Maltseva S., Maltseva K., Gorshkova E., Kulikovskiy M. Lipid accumulation by *Coelastrrella multistriata* (*Scenedesmaceae*, *Sphaeropleales*) during nitrogen and phosphorus starvation // Sci. Rep. 2021a. V. 11. P. 19818.
https://doi.org/10.1038/s41598-021-99376-9
- Maltsev Y., Maltseva K., Kulikovskiy M., Maltseva S. Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids and fatty acid composition // Biology. 2021b. V. 10. P. 1060.
https://doi.org/10.3390/biology10101060
- Maltsev Y.I., Maltseva I.A., Kulikovskiy M.S., Maltseva S.Yu., Sidorov R.A. Analysis of a new strain of *Pseudomuriella en-gadinensis* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyta*) for possible use in biotechnology // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 609–617.
https://doi.org/10.1134/S1021443719040083
- Maltsev Y., Maltseva I., Maltseva S., Kocielek J.P., Kulikovskiy M. A new species of freshwater algae *Nephrochlamys yushanlensis* sp. nov. (*Selenastraceae*, *Sphaeropleales*) and its lipid accumulation during nitrogen and phosphorus starvation // J. Phycol. 2021c. V. 57. P. 606–618.
https://doi.org/10.1111/jpy.13116
- Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrrella rubescens* (*Scenedesmaceae*, *Chlorophyta*), a producer of value-added keto-carotenoids // Algae. 2017. V. 32. P. 245–259.
https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6
- Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chivkunova O., Chekanov K., Lobakova E., Sidorov R., Solovchenko A. pH and CO₂ effects on *Coelastrrella* (*Scotiellopsis*) *rubescens* growth and metabolism // Russ. J. Plant Physiol. 2016. V. 63. P. 566–574.
https://doi.org/10.1134/S1021443716040105
- Mudimu O., Koopmann I.K., Rybalka N., Friedl T., Schulz R., Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α-tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α-tocopherol production // J. Appl. Phycol. 2017. V. 29. P. 2867–2875.
https://doi.org/10.1007/s10811-017-1188-1
- Novakovskaya I.V., Egorova I.N., Kulakova N.V., Patova E.N., Shadrin D.M., Anissimova O.V. Morphological and phylogenetic relations of members of the genus *Coelastrrella* (*Scenedesmaceae*, *Chlorophyta*) from the Ural and Khentii Mountains (Russia, Mongolia) // Phytotaxa. 2021. V. 527. P. 1–20.
https://doi.org/10.11646/phytotaxa.527.1.1
- Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity // Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics. 2008. V. 1777. P. 1249–1262.
https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.07.003

- Pérez-Pérez M.E., Lemaire S.D., Crespo J.L. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae // *Plant Physiol.* 2012. V. 160. P. 156–164. <https://doi.org/10.1104/pp.112.199992>
- Rijstenbil J.W. Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation // *J. Plankton Res.* 2002. V. 24. P. 1277–1288.
- Santiago-Morales I.S., Trujillo-Valle L., Márquez-Rocha F.J., Hernández J.F.L. Tocopherols, phycocyanin and superoxide dismutase from microalgae: as potential food antioxidants // *Appl. Food Biotechnol.* 2018. V. 5. P. 19–27. <https://doi.org/10.22037/afb.v5i1.17884>
- Sies H., Stahl W., Sundquist A.R. Antioxidant functions of vitamins // *Ann. New York Acad. Sci.* 1992. V. 669. P. 7–20. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb17085.x>
- Smerilli A., Orefice I., Corato F., Olea A.G., Ruban A.V., Brunet C. Photoprotective and antioxidant responses to light spectrum and intensity variations in the coastal diatom *Skeletonema marinoi* // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 19. P. 611–627. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13545>
- Toti E., Chen C.-Y.O., Palmery M., Valencia D.V., Peluso I. Non-provitamin a and provitamin a carotenoids as immunomodulators: recommended dietary allowance, therapeutic index, or personalized nutrition? // *Oxidat. Med. Cell. Longevity.* 2018. 4637861. <https://doi.org/10.1155/2018/4637861>
- Wright A.H., DeLong J.M., Gunawardena A.H.L.A.N., Prange R.K. The interrelationship between the lower oxygen limit, chlorophyll fluorescence and the xanthophyll cycle in plants // *Photosynth. Res.* 2011. V. 107. P. 223–235. <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9621-9>
- Wang T.-Y., Libardo M.D.J., Angeles-Boza A.M., Pellois J.-P. Membrane oxidation in cell delivery and cell killing applications // *ACS Chem. Biol.* 2017. V. 12. P. 1170–1182. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00237>
- Zeb A., Ullah F. A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods // *J. Anal. Meth. Chem.* 2016. 9412767. <https://doi.org/10.1155/2016/9412767>

Functional State of *Coelastrella multistriata* (*Sphaeropleales*, *Chlorophyta*) in an Enrichment Culture

S. Yu. Maltseva¹, M. S. Kulikovskiy¹, and Y. I. Maltsev^{1,*}

¹ Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

*e-mail: ye.maltsev@gmail.com

Received April 13, 2022; revised April 26, 2022; accepted May 10, 2022

Abstract—The functional state of an enrichment culture of a green alga *Coelastrella multistriata* (Trenkwalder) Kalina et Puncová in the course of 60-day cultivation was studied. The concentrations of chlorophylls *a*, *b*, and *c*, total carotenoids, protein, and vitamins A and E was determined. The rates of lipid peroxide oxidation in the cells of *C. multistriata* strain MZ–Ch23 were determined using the concentrations of peroxidation products reacting with 2-thiobarbituric acid. The concentrations of these products were determined in the algal biomass on days 15, 25, and 60 of cultivation in the BBM medium, as well as after initiation of peroxide oxidation with Fe²⁺. Among the photosynthetic pigments, the highest content (14.82 mg/g dry biomass) was shown for chlorophyll *a* during the exponential growth phase. The total amount of carotenoids was comparable to the values for other studied *Coelastrella* strains, 0.74–4.21% of the dry biomass. Strain MZ–Ch23 was shown to accumulate high concentrations of retinol (170.49–586.09 µg/L of the algal culture) and protein (141.81–212.38 mg/L). While during all phases of the cultivation *C. multistriata* cells exhibited low concentrations of the products of lipid peroxide oxidation (0.005–0.015 nmol/mg protein), initiation of peroxide oxidation increased the concentration of TBA-active products up to 0.187 nmol/mg protein on day 60. Cultivation in BBM medium for 25 days proved to be the optimal strategy for obtaining *C. multistriata* biomass enriched with secondary metabolites and resistant to peroxide oxidation. This resulted in significant amounts of the biomass with high levels of carotenoids, protein, and vitamin A.

Keywords: vitamins, green algae, carotenoids, protein, thiobarbiturate-active products, chlorophyll