

УДК 57.04:574.34

ОЦЕНКА АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ВТОРИЧНЫХ КАРОТИНОИДОВ У ЧЕТЫРЁХ ВИДОВ ЗЁЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПОРЯДКА SPHAEROPLEALES В СИСТЕМЕ *IN VITRO**

Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»,

г. Севастополь, Российская Федерация

e-mail: chubchikova@mail.ru, drobotzkaya@mail.ru

Представлены новые данные по ростовым характеристикам, накоплению вторичных каротиноидов и их антирадикальной активности у 4-х видов зелёных микроводорослей порядка Sphaeropleales *Pseudospongiococcum protococcoides*, *Bracteacoccus minor*, *Coelastrella rubescens* и *Cromochloris zofingiensis* в условиях двухстадийной накопительной культуры с использованием мочевины в качестве единственного источника азота. Показано, что все исследуемые виды хорошо растут на среде с мочевиной. На первой стадии их удельные скорости роста (максимальные 0,28–0,37 сут⁻¹ и средние 0,15–0,17 сут⁻¹) и продуктивность по сухой биомассе (0,08–0,09 г·л⁻¹·сут⁻¹) различались незначительно. На второй стадии индукцию биосинтеза вторичных каротиноидов осуществляли при помощи стресс-комплекса, включавшего: 10-кратное уменьшение азота и фосфора в среде, 12-кратное разбавление культур, удвоенное круглосуточное освещение, снабжение CO₂, внесение на 8-е сутки NaCl до концентрации в среде 200 ммоль·л⁻¹. Реакция культур на стресс-индукцию вторичного каротиногенеза была сходной: накопление биомассы, снижение уровня хлорофиллов и накопление вторичных каротиноидов. Продуктивность культур по биомассе за весь эксперимент составила 0,41–0,53 г·л⁻¹·сут⁻¹ при максимальных величинах у *P. protococcoides* и *C. rubescens* с конечным содержанием суммарных каротиноидов в сухой биомассе 2,3–3,9 мг·г⁻¹ при максимальных значениях у *B. minor*. Для всех видов был получен технологически значимый выход вторичных каротиноидов из литра исходной культуры (1,1–1,6 мг·л⁻¹·сут⁻¹). Антирадикальную активность экстрактов каротиноидов исследуемых видов оценивали по реакции со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH[•]) по двум параметрам: «процент ингибирования DPPH[•]» (I%) и «эффективная концентрация» (EC₅₀). Экстракты всех видов продемонстрировали более высокую антирадикальную активность (на 49,30–70,33%), чем синтетический антиоксидант 2,6-бутилгидрокситолуол (ВНТ, или ионол). Показано, что по совокупности продукционных и антирадикальных свойств *C. rubescens* и *P. protococcoides*, эти виды можно рассматривать в качестве наиболее перспективных потенциальных источников вторичных каротиноидов для пищевой и фармацевтической индустрии.

Ключевые слова: *Pseudospongiococcum protococcoides*, *Bracteacoccus minor*, *Coelastrella rubescens*, *Cromochloris zofingiensis*, двухстадийная накопительная культура, DPPH[•], антирадикальная активность, каротиноиды, эффективная концентрация.

Введение

Свободные радикалы (СР) и другие активные формы кислорода (АФК) являются побочными продуктами окислительного метаболизма в растительных и животных организмах (Young, Woodside, 2001; Demidchik, 2015; Sharma et al., 2012). Это гидроксил-радикал (ОН[•]), супероксид-радикал (O₂^{•-}), пероксид-радикалы (ROO[•]), синглетный кислород (¹O₂[•]), радикал оксида азота (II) и др. Из-за наличия на внешнем электронном

* Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского» на 2018–2020 гг. в рамках темы № 0828-2018-0004 «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса», подраздел 2.4 «Экспериментальные исследования морфо-биологических и физиолого-биохимических характеристик зеленых микроводорослей как потенциальных промышленных источников кетокаротиноидов группы астаксантина».

уровне неспаренного электрона эти молекулы обладают исключительной реакционной способностью. В низких концентрациях они играют важную роль в различных физиологических процессах – выработке энергии, фагоцитозе, реакциях микросомального окисления, самообновлении мембранных структур, сигнальной трансдукции, апоптозе и др. (Valko et al., 2007; Zuo et al., 2015). Повышение концентрации этих соединений в клетке и организме в результате воздействия негативных факторов (высокие дозы радиации и ультрафиолетового излучения, интоксикация, действие озона, органических растворителей, поллютантов и др.) приводит к окислительному стрессу, который вызывает повреждения биомолекул – нуклеиновых кислот, липидов, белков и др. (Halliwell, 1996; McCord, 2000; Zuo et al., 2015; Tan et al., 2018; Kalam et al., 2015). Деградация и/или модификация этих молекул под действием СР способна провоцировать ряд патологий у человека и животных (онкологические, сердечно-сосудистые, кожные, воспалительные заболевания, атеросклероз, сахарный диабет, катаракта, возрастная мышечная дистрофия, артриты, неврологические расстройства и др.) (Finkel, Holbrook, 2000; Tan et al., 2018; Zuo et al., 2015; Kalam et al., 2015). Деструктивное влияние окислительного стресса в животных клетках ослабляется с помощью эндогенных (глутатион, убихинол, мочевая кислота) и экзогенных (витамины С и Е, каротиноиды (Кар), липоевая кислота, флавоноиды и др.) антиоксидантов (АО) (Kim et al., 2007; Rahman, 2007; Varela et al., 2015; Kalam et al., 2015). Синтетические АО, например, 2,6-бутилгидрокситолуол (ВНТ, или ионол) и бутилгидроксианизол (ВНА), считаются не вполне безопасными, поскольку их употребление может вызывать токсические, канцерогенные и мутагенные эффекты (Whysner et al., 1994). Поэтому спрос на природные АО, инициированный рекомендациями ВОЗ по полному исключению синтетических биологически активных веществ и красителей из производства продуктов питания и кормов (Carlsson et al., 2007; Varela et al., 2015;), растёт. Особенно эффективными АО в отношении $^1\text{O}_2^{\cdot}$ и ROO^{\cdot} являются Кар, и, в особенности, вторичные каротиноиды (ВКар) (Varela et al., 2015;). Эти биологически активные соединения широко используются в аквакультуре лососёвых рыб и ракообразных, медицине, пищевой и косметической промышленности. Однако до сих пор около 90% всех производимых Кар получают путем химического синтеза и только около 10% – из природного сырья (März, 2008).

Источником промышленного производства природного АО – вторичного каротиноида астаксантина (Аст) – в настоящее время (помимо дрожжей *Xanthophyllomyces dendrorhous*) служит зелёная микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (пор. Chlamydomonadales) – экстремофитный обитатель временных пресноводных водоёмов. Содержание Аст в клетках этой микроводоросли в сухой биомассе (СБ) достигает 3,8% (Wang et al., 2013). Но выращивание *H. pluvialis* осложняется рядом неблагоприятных для массового культивирования биологических особенностей, таких как низкая скорость роста и значительная доля погибших к концу культивирования клеток (Hagen et al., 2001), а содержание Аст в биомассе *X. dendrorhous* невелико (30-800 мг·кг⁻¹) (Dufossé, 2009).

В качестве альтернативы перспективным сырьём для производства природных Кар могут служить аэрофитные и эдафитные хлорококковые микроводоросли, которые, как и *H. pluvialis*, существуют в условиях постоянного абиотического стресса (пересыхание, перегрев или переохлаждение, избыточная инсоляция, недостаток элементов минерального питания и др.) (Чубчикова и др., 2009). При наступлении неблагоприятных условий содержание АФК в клетках микроводорослей увеличивается. Декомпенсированный окислительный стресс может вызывать перекисное окисление липидов мембран, дисфункцию повреждённых молекул протеинов и нуклеиновых кислот (Demidchik, 2015; Sharma et al., 2012), повреждаются хлоропласты, митохондрии, ядро и другие органеллы, что может стать причиной гибели клетки (Pikula et al., 2019).

Система противодействия разрушительному влиянию АФК в клетках микроводорослей (как и других растений) представлена антиоксидантами ферментной (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза и др.) и неферментной (флавоноиды, стероиды, Кар, убихинон, витамины А, Е, С, К и др.) природы (Pikula et al, 2019; Колупаев, Ястреб, 2015; Sharma et al., 2012; Романенко и др., 2015). Наиболее эффективными АО неферментной природы являются Кар. Механизмом защиты от избыточной концентрации АФК, выработанным многими экстремофитными микроводорослями в процессе эволюции, является вторичный каротиногенез (ВКРГ), выражающийся в биосинтезе и накоплении в цитоплазме клеток С40-каротиноидов (вторичных каротиноидов), не участвующих в фотосинтезе, но выполняющих защитную роль. ВКар ингибируют развитие окислительного стресса в клетках и тем самым обеспечивают возможность метаболических перестроек, необходимых для образования стадий покоя, в которых водоросли переживают неблагоприятные периоды. Явление ВКРГ характерно преимущественно для микроводорослей порядков Sphaeropleales и Chlamydomonadales, среди которых насчитывается около 80 каротиногенных видов (Минюк и др., 2010). У зелёных микроводорослей порядка Sphaeropleales в клетках, помимо Аст, синтезируется широкий спектр Кар – его метаболических предшественников. Среди них преобладают кантаксантин, адониксантин и его моно- и диэфиры, адонирубин и его моноэфиры, эхиненон, которые характеризуются сходной с Аст биологической активностью (Чубчикова и др., 2011; Minyuk et al., 2017).

Эти виды отличаются высокой скоростью роста, в том числе и на недорогих органических субстратах. Несмотря на то, что содержание Кар в биомассе этих видов намного ниже, чем у *H. pluvialis*, быстрый рост и удешевление культивирования может компенсировать этот недостаток. Целью настоящей работы было сравнение антиоксидантного потенциала экстрактов биомассы четырёх видов зелёных микроводорослей порядка Sphaeropleales: *Pseudospongiococcum protococcoides*, *Bracteacoccus minor*, *Coelastrella rubescens* и *Chromochloris zofingiensis*, выращиваемых методом двухстадийной накопительной культуры на питательной среде с мочевиной в качестве единственного источника азота.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись четыре вида зелёных микроводорослей порядка Sphaeropleales, предметом исследования – экстракты каротиноидов, полученные из их биомассы.

Pseudospongiococcum protococcoides Gromov (штамм IBSS-10 = CALU-221) и *Chromochloris zofingiensis* (Dönn) Fucíková & Lewis (штамм CALU-190 = ССАР-211/14 = UTEX 32 = SAG 211-14 = АТТС 30412) были получены в 2006 г. из Музея живых культур микроорганизмов Санкт-Петербургского государственного университета), *Bracteacoccus minor* (R. Chodat) Petrová 1931 (штамм IBSS-88 = АСКУ 506-06) был передан в 2009 году из Коллекции культур водорослей Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, а *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová et Eliás (штамм IPPAS H-350 = IBSS-12) – в 2006 г. из коллекции Института физиологии растений РАН.

Микроводоросли выращивали методом двухстадийной накопительной культуры, описанном Минюк (Минюк и др., 2015), на питательной среде ВВМ с заменой нитрата натрия NaNO_3 на мочевины $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$.

На первой («зеленой») стадии концентрация мочевины составляла $3 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Освещённость на наружной поверхности колб обеспечивали люминесцентными лампами «Feron», Россия (DL 28W T4 6400K), плотность потока фотонов – $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), фотопериод – 15 ч свет : 9 ч темнота. Для предотвращения перегрева культур температуру среды ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) поддерживали, охлаждая лампы встречными потоками

воздуха от двух вентиляторов. Объём культур в стеклянных конических колбах составлял 0,4 л. Культуры круглосуточно барботировали атмосферным воздухом со скоростью $0,3 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$. Начальная биомасса составляла для *P. protococcoides*, *B. minor*, *C. rubescens* и *C. zofingiensis* $0,121 \pm 0,003$; $0,134 \pm 0,002$; $0,104 \pm 0,001$ и $0,123 \pm 0,008 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, соответственно. Продолжительность стадии составляла 16 суток.

Стресс-индукция биосинтеза вторичных каротиноидов заключалась в резком увеличении освещённости (перевод культур на круглосуточное двухстороннее освещение по $120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ с каждой стороны), а также шестикратном вначале (десятикратно редуцированной по мочеvine и фосфатам средой) и двукратном на 8-е сутки (с добавлением NaCl до концентрации $200 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ в качестве ускорителя каротиногенеза) разбавлении культур. К воздуху для барботирования культур добавили CO_2 (0,3 % v/v). Уровень pH, равный $7 \pm 0,5$, поддерживали при помощи pH-контроллера «Aqua Medic». «Красная» стадия длилась также 16 суток.

Содержание сухой биомассы (СБ) в культурах определяли гравиметрически (Vonshak, 1986), концентрацию мочеvine в среде – диацетилмонооксимным методом (Основы клинической..., 2013). Содержание хлорофиллов и суммарных каротиноидов в культуре и биомассе микроводорослей, а также концентрацию DPPH^{*} и Кар в пробах, определяли спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-2000, ОКБ «Спектр», Россия) в диметилсульфоксидных и метанольных экстрактах по методикам, предложенным Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987) и Solovchenko (Solovchenko et al., 2010).

Антирадикальную активность (АРА) каротиноидосодержащих экстрактов биомассы исследуемых микроводорослей определяли экспресс-методом с использованием стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH^{*}), опираясь на методические рекомендации, подробно изложенные в работе Marxen (Marxen et al., 2007).

АРА метанольных экстрактов Кар оценивали спектрофотометрически по обесцвечиванию фиолетового метанольного раствора DPPH^{*} в присутствии восстановителей (в данном случае – Кар) в сравнении с исходной окраской. Из биомассы, соответствующей 20 мл красной культуры, Кар экстрагировали 100% ацетоном, экстракт упаривали и перерастворяли каротиноиды в 2,5–3 мл (в зависимости от содержания Кар в биомассе) 100% метанола. В пробирках с притёртыми пробками готовили два параллельных ряда возрастающих концентраций суммарных Кар в метаноле, каждую в двух повторностях: ряд измерительных проб и ряд проб сравнения. Каждая измерительная проба содержала аликвоту экстракта Кар и 100 мкл метанольного раствора DPPH^{*}. Соответствующая ей по концентрации Кар проба сравнения не содержала DPPH^{*}. Объём каждой пробы составлял 1,5 мл. Объёмы аликвот концентрированного экстракта Кар подбирали в зависимости от содержания в нём суммарных Кар таким образом, чтобы концентрации каротиноидов в пробах не выходили за рамки диапазона $0,5\text{--}8 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$, что обеспечивает линейный характер снижения концентрации DPPH^{*} в присутствии Кар (Gupta, Ghosh, 2013; Marxen et al., 2007). Пробы спектрофотометрировали после 30-минутной экспозиции в темноте при комнатной температуре против чистого метанола на длине волны, равной 515 нм, рекомендуемой для измерения экстинкции растворов DPPH^{*} (Bandoniene et al., 2002; Molyneux, 2004). Одновременно определяли содержание Кар в пробах сравнения методом, предложенным Solovchenko (Solovchenko, 2010). Чтобы исключить влияние абсорбционных свойств экстракта микроводорослей, из значения экстинкции каждой измерительной пробы вычитали значение экстинкции парной ей пробы сравнения. По полученной разнице рассчитывали остаточную концентрацию DPPH^{*} в измерительных пробах по построенной заранее калибровочной кривой, описываемой уравнением:

$$C_{\text{DPPH}^*} (\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}) = 84,046 * A_{515} + 1.892, \quad (1)$$

с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,995$,

где A_{515} – экстинкция раствора DPPH^{*} в метаноле на длине волны 515 нм.

Анализ зависимости между содержанием Кар и остаточной концентрацией DPPH^{*} в измерительных пробах позволил оценить антирадикальную активность экстрактов биомассы исследуемых микроводорослей.

Процент ингибирования свободных радикалов (I%). Долю радикалов DPPH^{*}, инактивированных каротиноидами, (% от начальной концентрации) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100, \quad (2)$$

где A_0 – экстинкция начальной концентрации DPPH^{*}, A_1 – экстинкция измерительной пробы (DPPH^{*}, инактивированный в присутствии Кар) (Evary, Nur, 2018).

Значение углового коэффициента в уравнении регрессии, описывающем рост доли инактивированного DPPH^{*} с увеличением концентрации Кар в пробах, характеризует антирадикальную активность экстракта Кар каждого вида микроводорослей.

Эффективная концентрация (EC₅₀) – это концентрация экстракта Кар, в присутствии которой концентрация активных радикалов DPPH^{*} в пробе снижается на 50% (Marxen et al., 2007). Этот параметр рассчитывали по уравнениям линейной регрессии, описывающим зависимость падения концентрации активных DPPH-радикалов с увеличением содержания присутствующих в пробе Кар. В данном эксперименте для каждого вида рассчитывали значение EC₅₀ для концентрации DPPH^{*}, равной 50 ммоль·л⁻¹. Для сравнения было определено значение EC₅₀ для 2,6-бутилгидрокситолуола (ВНТ, или ионола) – синтетического антиоксиданта, применяющегося в настоящее время в производстве пищевых продуктов.

Все измерения проводили в трёх биологических и трёх аналитических повторностях. На рисунках и в тексте приведены средние значения показателей и их стандартные отклонения. Достоверность различий между средними определяли по t-критерию Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Замена нитрата натрия на мочевины в питательной среде для выращивания сфероплеальных микроводорослей продиктована потребностью в снижении затрат при их массовом культивировании для получения полезного продукта – каротиноидосодержащей биомассы. В литературе приводятся результаты успешного культивирования многих видов зелёных микроводорослей на органических субстратах, в том числе и на мочеvine (Minyuk et al., 2019; Kim et al., 2016; Casal et al., 2011; Hsieh, Wu, 2009; Khalili et al., 2015).

Водоросли хорошо усваивали мочевины. Уже на 8-е сутки её концентрация в культуре *P. protococcoides* снизилась на 98,7%, а в остальных культурах на 85,7–89,6% от начального уровня. На 16-е сутки эксперимента мочевина в среде ни у одного вида уже не регистрировалась (рис. 1А).

Темпы роста четырёх исследуемых видов на протяжении всей стадии эксперимента были близкими. За 16 суток их биомасса увеличилась на порядок (рис. 1Б). Средние удельные скорости роста ($\mu_{\text{ср.}}$), рассчитанные по содержанию СБ (0,15–0,17 сут⁻¹), были сходными (рис. 2А). Значения максимальной удельной скорости роста ($\mu_{\text{макс.}}$) – параметра, характеризующего потенциальные возможности вида – были наиболее высокими в первые 4 суток и составляли от 0,28 сут⁻¹ у *B. minor* до 0,37 сут⁻¹ у *C. rubescens*. Средняя

продуктивность по СБ (рис. 2В) была самой низкой у *C. zofingiensis*, а самой высокой – у *P. protococcoides* (79,4 и 91,1 мг·мл⁻¹·сут⁻¹, соответственно).

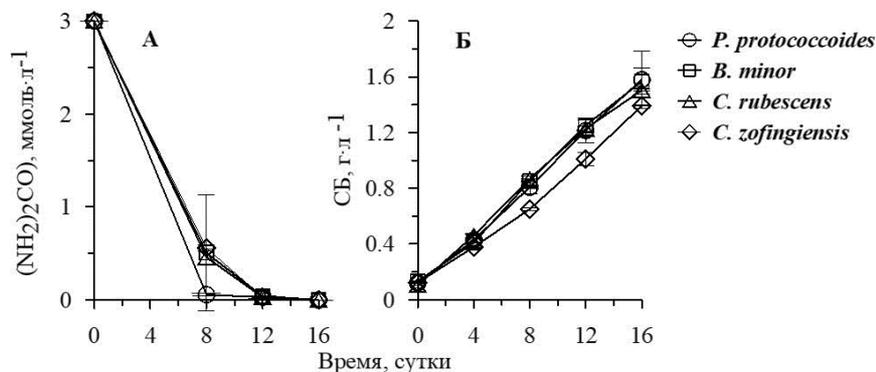


Рис. 1. Динамика убывания мочевины в среде (А) и увеличения биомассы (Б) на "зелёной" стадии эксперимента.

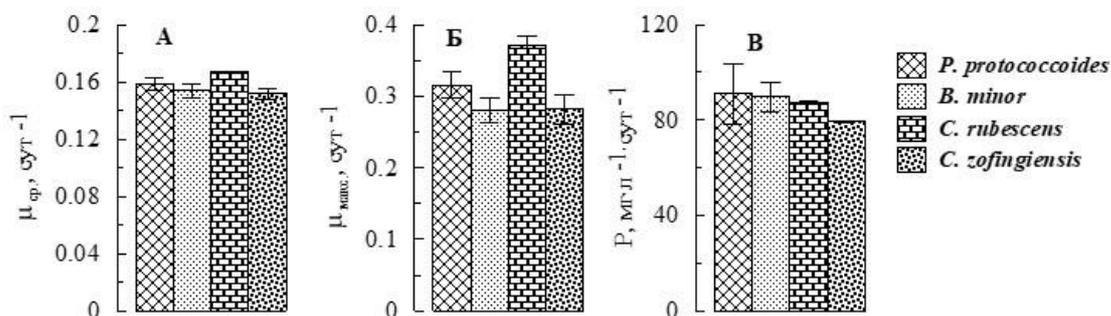


Рис. 2. Максимальная (А) и средняя (Б) удельная скорость роста, а также продуктивность культур по СБ за 16 суток (В) на "зелёной" стадии эксперимента

Близость ростовых характеристик, полученных в данном эксперименте и более ранних исследованиях при выращивании водорослей в аналогичных условиях на нитратах (Minyuk et al., 2019), указывает на возможность удешевления питательных сред (как минимум в 3 раза) для аэрофильных и наземных каротиногенных видов путём использования вместо нитратов более дешёвой и более богатой азотом мочевины.

К концу «зелёной» стадии клетки микроводорослей ещё содержали значительное количество хлорофиллов (33–46 мг·г⁻¹), но массовая доля каротиноидов в СБ достигла 0,72–0,93% (рис. 3А и 3Б). Увеличение значений индекса Кар/Хла с 0,22–0,25 на стадии активного роста культур до 0,25–0,33 в конце «зелёной» стадии может служить оценочным критерием голодания культур и их готовности к переводу на стадию вторичного каротиногенеза (рис. 3В).

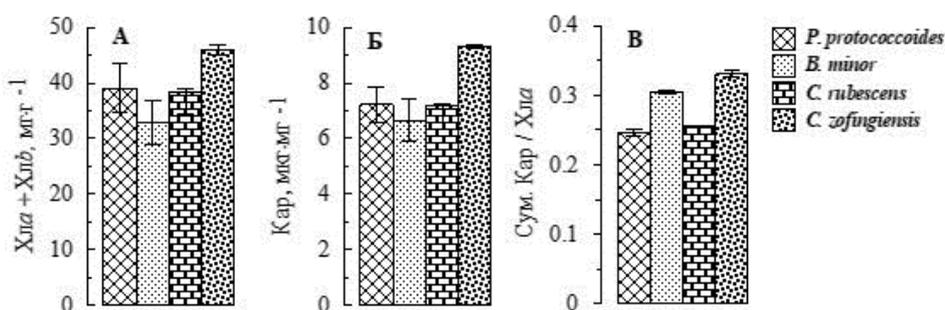


Рис. 3. Содержание хлорофиллов *a* и *b* (А) и суммарных каротиноидов (Б) в биомассе микроводорослей, а также индекс Кар/Хла (В) в конце «зеленой» стадии эксперимента

Реакция культур на стресс-индукцию вторичного каротиногенеза была сходной у всех исследуемых видов. Шестикратное разбавление культур при наличии $0,3 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ мочевины оказалось недостаточным при максимально доступной интенсивности освещения, и рост культур продолжился (рис. 4А). После повторного двукратного разбавления культур и внесения NaCl увеличение плотности культур замедлилось и происходило, как показывают результаты более ранних исследований (Чубчикова и др., 2009), за счёт укрупнения клеток и накопления в них СБ.

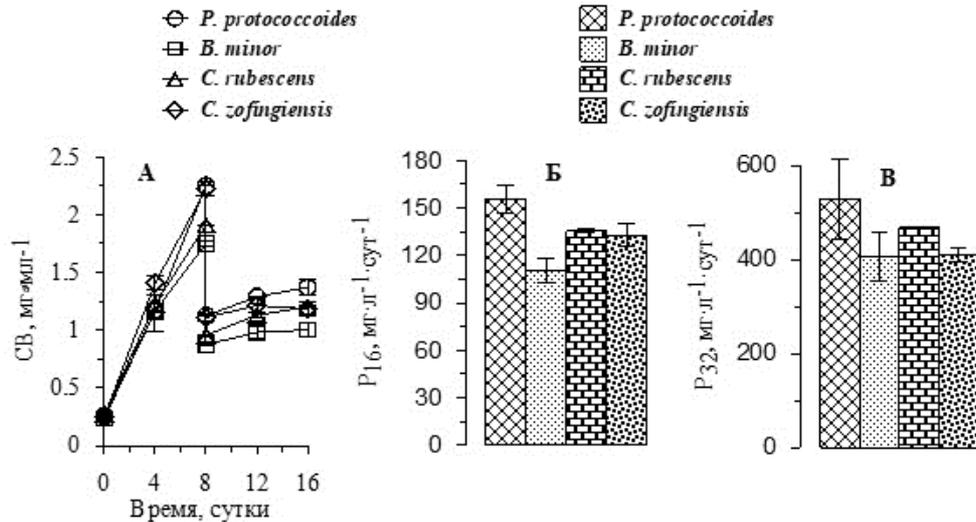


Рис. 4. Динамика изменения биомассы микроводорослей на "красной" стадии эксперимента (А), продуктивность по СВ на стадии ВКРГ (Б) и за весь эксперимент (В)

Продуктивность культур по сухому веществу ($P_{СВ}$) на стадии ВКРГ была максимальной у *P. protococcoides* ($155,63 \pm 8,54 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) и минимальной у *B. minor* ($110,36 \pm 7,57 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$). За весь период наблюдений с учётом разведения культур $P_{СВ}$ достигла наибольших значений у *P. protococcoides* и *C. rubescens* ($528,38 \pm 86,90$ и $467,95 \pm 0,69 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, соответственно).

Перевод культур на «красную» стадию сопровождался характерной для каротиногенных микроводорослей динамикой содержания пигментов: снижением уровня хлорофиллов и фотосинтетических каротиноидов (Минюк и др., 2015; Чубчикова и др., 2009) и накоплением ВКар (с 8-х по 16-е сутки) (рис. 5А, 5Б).

Индекс Кар/Хла в первые 8 суток увеличился 2,5 раза у *C. rubescens* и *C. zofingiensis*, в 4 раза у *P. protococcoides* и в 5,1 раза у *B. minor* практически только за счёт гораздо более медленного падения содержания Кар, чем хлорофиллов, в биомассе микроводорослей (рис. 5А, 5Б). Далее увеличение индекса в 8,9; 3,78; 5,2 и 11,1 раза у *P. protococcoides*, *B. minor*, *C. rubescens* и *C. zofingiensis* происходило за счёт разрушения молекул хлорофиллов и активного синтеза ВКар, препятствующих свободнорадикальному окислению (рис. 5В).

Конечное значение массовой доли Кар в биомассе микроводорослей составило 0,23–0,39% с максимумом у *B. minor*. При учёте выхода биомассы за весь период наблюдений (рис. 4В) это дает выход Кар, равный $1,34 \pm 0,01$; $1,59 \pm 0,13$; $1,06 \pm 0,01$ и $1,32 \pm 0,05 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ для *P. protococcoides*, *B. minor*, *C. rubescens* и *C. zofingiensis*, соответственно.

Экстракты всех исследуемых видов проявили достаточно сильную антирадикальную активность, свойства экстрактов биомассы различались незначительно (рис. 6).

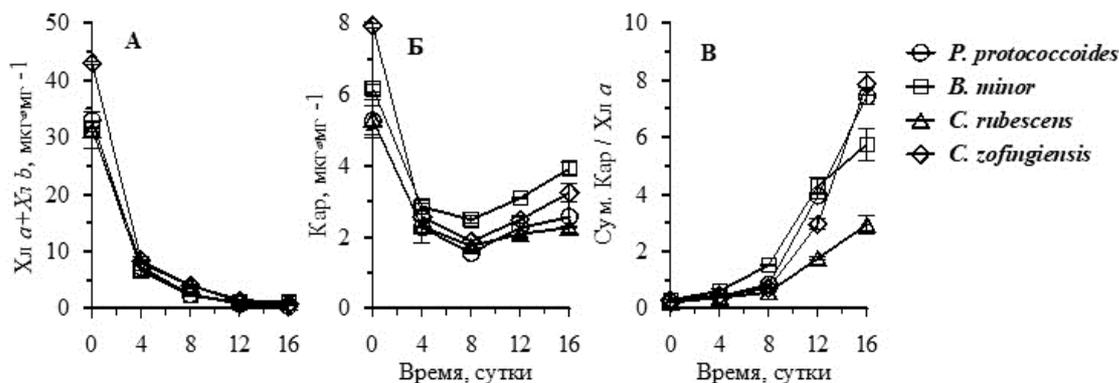


Рис. 5. Динамика содержания хлорофиллов *a* и *b* (А) и суммарных Кар (Б) в биомассе микроводорослей, а также отношения суммарных Кар/Хла в культурах (В) на "красной" стадии эксперимента

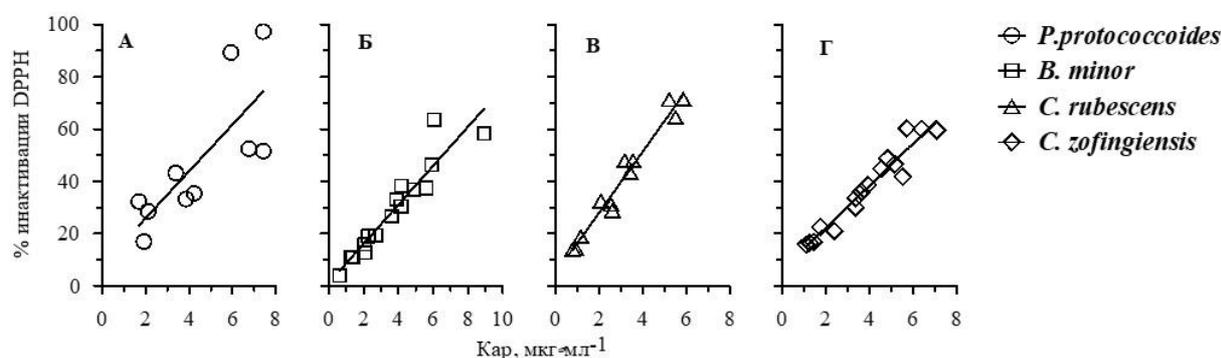


Рис. 6. Зависимость между содержанием суммарных Кар в пробе и долей инактивированного DPPH*

Зависимость восстановления DPPH-радикалов от содержания каротиноидов в реакционной смеси (% ингибирования, или *I* %) описывалась уравнениями линейной регрессии для *P. protococcoides*, *B. minor*, *C. rubescens* и *C. zofingiensis*, соответственно:

$$Y = 8,96 * X + 7,99 \quad (R^2 = 0,60), \quad (3)$$

$$Y = 7,46 * X + 1,17 \quad (R^2 = 0,89), \quad (4)$$

$$Y = 11,67 * X + 4,68 \quad (R^2 = 0,97), \quad (5)$$

$$Y = 8,03 * X + 6,22 \quad (R^2 = 0,94), \quad (6)$$

где *X* – содержание суммарных Кар, *Y* – % ингибирования DPPH* в пробах.

Тангенс угла наклона результирующей к оси *X* численно представлен угловым коэффициентом в уравнении регрессии. Его величина является критерием антиоксидантного потенциала вида: у более сильного антиоксиданта она больше. По этому параметру экстракты *C. rubescens* (11,67) и *P. protococcoides* (8,96) характеризуются более высокой АРА.

Существенная вариабельность коэффициентов детерминации в уравнениях может объясняться видовыми различиями состава ВКар, и в частности, долей неэтерифицированных Кар, а также возможным присутствием в экстрактах антиоксидантов некаротиноидной природы (например, флавоноидов).

Эффективную концентрацию (*EC*₅₀) для отдельных экстрактов рассчитывали по уравнениям линейной регрессии, отражающим степень снижения концентрации DPPH* вдвое (с 50 до 25 мкмоль·л⁻¹) в зависимости от содержания суммарных каротиноидов в пробе (рис. 7).

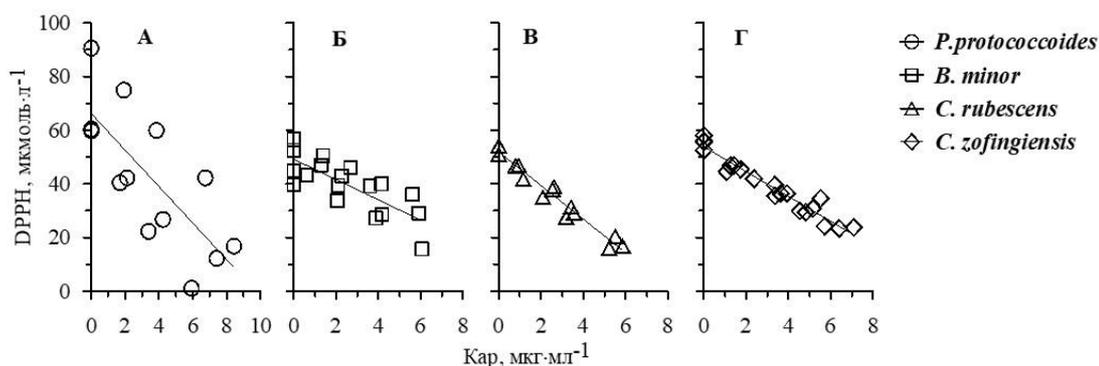


Рис. 7. Снижение концентрации DPPH* в зависимости от содержания присутствующих в пробе суммарных Кар.

Уравнения регрессии, отражающие эту зависимость, имели следующий вид:

$$P. \textit{protococcoides} \quad Y = -6,80 * X + 66,19 \quad (R^2 = 0,57), \quad (7)$$

$$B. \textit{minor} \quad Y = -3,79 * X + 49,22 \quad (R^2 = 0,61), \quad (8)$$

$$C. \textit{rubescens} \quad Y = -6,27 * X + 51,94 \quad (R^2 = 0,96), \quad (9)$$

$$C. \textit{zofingiensis} \quad Y = -4,63 * X + 53,80 \quad (R^2 = 0,94), \quad (10),$$

где X – содержание Кар, $\mu\text{кг}\cdot\text{мл}^{-1}$, Y – остаточная концентрация DPPH*, $\mu\text{кмоль}\cdot\text{л}^{-1}$.

Значения (EC_{50}), рассчитанные по уравнениям (7–10) для каждого вида микроводорослей при начальной концентрации DPPH* в пробах $50 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$ и выраженные в количестве Кар ($\mu\text{кг}\cdot\text{мл}^{-1}$), представлены в таблице 1. В качестве стандарта приведено значение EC_{50} для синтетического пищевого антиоксиданта 2,6-бутилгидрокситолуола (ВНТ, или ионола) при той же ($50 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$) начальной концентрации DPPH*.

Таблица 1.
Сравнение EC_{50} экстрактов биомассы исследуемых видов микроводорослей и синтетического антиоксиданта ВНТ

Вид	EC_{50}	
	Сум. Кар, $\mu\text{кг}\cdot\text{мл}^{-1}$	ВНТ (ионол), $\mu\text{кг}\cdot\text{мл}^{-1}$
<i>P. protococcoides</i>	$3,37 \pm 0,48$	–
<i>B. minor</i>	$6,48 \pm 0,20$	–
<i>C. rubescens</i>	$3,95 \pm 0,23$	–
<i>C. zofingiensis</i>	$5,23 \pm 0,25$	–
Ионол	–	$12,78 \pm 0,73$

Тот факт, что значение EC_{50} , выраженное в концентрации суммарных Кар, у всех видов была ниже, чем для стандарта, свидетельствует о более высоком антирадикальном потенциале исследуемых видов в сравнении с ионолом. Наиболее сильными антиоксидантами оказались экстракты суммарных Кар из биомассы *P. protococcoides* и *C. rubescens*. Количество суммарных Кар, необходимое для снижения вдвое начальной концентрации ($50 \text{ мкмоль}\cdot\text{л}^{-1}$) молекул DPPH* в реакционной смеси, у этих видов было минимальным.

Выводы

Для всех исследуемых видов мочевины может служить адекватной заменой более дорогому нитрату натрия, что удешевит питательную среду примерно в 3 раза. При этом сохраняются достаточно высокие значения продуктивности культур по СБ.

Снижения содержания биомассы в культурах не наблюдалась. Продуктивность культур (за весь эксперимент) по СБ составила 407,35–528,38 мг·л·сут⁻¹), при максимальных величинах у *P. protococcoides*, при конечном содержании суммарных каротиноидов в сухой биомассе 2,53–3,91 мг·г⁻¹ с максимальными значениями у *B. minor* и *C. zofingiensis*. При этом конечный выход суммарных Кар из литра исходной культуры всех видов (1,1–1,6 мг·л⁻¹·сут⁻¹) является коммерчески значимым.

Каротиноидосодержащие метанольные экстракты всех исследуемых видов проявили высокую антирадикальную активность. По критериям I% и ЕС₅₀ все полученные экстракты существенно (на 25,5–64,8%) превосходили синтетический антиоксидант ионол, служащий одним из стандартов для сравнения активности различных антиоксидантов. Наиболее сильными антиоксидантами оказались экстракты Кар из биомассы *P. protococcoides* и *C. rubescens*.

В целом, все четыре вида являются быстро растущими и устойчивыми к абиотическому стрессу. Коммерчески значимая продуктивность культур по сухой биомассе и способность активно усваивать амидный азот из более дешёвой, чем нитраты, мочевины, а также значительный антиоксидантный потенциал компенсируют относительно невысокое содержание вторичных каротиноидов в их биомассе. Наиболее перспективными для дальнейших исследований в качестве потенциальных объектов массового культивирования являются *C. rubescens* и *P. protococcoides*.

Список литературы

1. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О. Физиологические функции неэнзиматических антиоксидантов растений // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2015. Вип. 2 (35). С. 6–25.
2. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований // Экология моря. 2010. Спец. вып. 80. С. 67–78.
3. Минюк Г.С., Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н. Особенности вторичного каротиногенеза у *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) в условиях двухстадийной культуры // Альгология. 2015. Т. 25. № 1. С. 21–34.
4. Основы клинической биохимии: пособие для студентов медико-диагностического факультета / С.В. Лелевич, И.А. Курстак, Т.Н. Гриневич и др. – Гродно: ГрГМУ, 2013. 184 с.
5. Романенко Е.А., Косаковская И.В., Романенко П.А. Фитогормоны микроводорослей: биологическая роль и участие в регуляции физиологических процессов. Ч. I. Ауксины, абсцизовая кислота, этилен // Альгология. 2015. Т. 25. № 3. С. 330–351.
6. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Минюк Г.С., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) // Морск. экол. журн. 2011. Т. 10. № 1. С. 91–97.
7. Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Терентьева Н.В. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов // Экология моря. 2009. Вып. 77. С. 77–83.
8. Bandoniene D., Murkovic M., Pfannhauser W., Venskutonis P.R., Gruzdiene D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and online HPLC-DPPH methods // Eur. Food Res. Technol. 2002. V. 214. pp. 143–147.

9. Carlsson A.S., van Beilen J.B., Moller R., Clayton D. Micro- and macro-algae: Utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project. – Chippenham: CPL Press, 2007. 86 p.
10. Casal C., Cuaresma M., Vega J.M., Vilchez C. Enhanced Productivity of a Lutein-Enriched Novel Acidophile Microalga Grown on Urea // Mar. Drugs. 2011. V. 9. № 1. pp. 29–42.
11. Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology // Environ. Exp. Bot. 2015. V. 109. pp. 212–228.
12. Dufossé L. Microbial and Microalgal Carotenoids as Colourants and Supplements // Carotenoids. – V. 5: Nutrition and Health. – Basel: Birkhauser Verlag, 2009. pp. 67–82.
13. Evary Y.M., Nur A.M. Antioxidant and Antidiabetes Capacity of Hexane, Ethylacetate and Ethanol Extracts of *Durio zibethinus* Murr. Root // Pharmacogn J. 2018. V. 10. pp. 937–940.
14. Finkel T., Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // Nature. 2000. V. 408. pp. 239–247.
15. Gupta S., Ghosh M. In vitro antioxidative evaluation of α - and β -carotene, isolated from crude palm oil // J. Anal. Methods Chem. 2013. V. 2013. Article ID 351671. 10p.
16. Hagen C., Grünewald K., Xyländer M., Rothe E. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* // J. Appl. Phycol. 2001. V. 13. pp. 79–87.
17. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans // Free Radical Res. 1996. V. 25. pp. 57–74.
18. Hsieh C.H., Wu W.T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. № 17. pp. 3921–3926.
19. Kalam S., Gul M.Z., Singh R., Ankati S. Free radicals: Implications in etiology of chronic diseases and their amelioration through nutraceuticals // Pharmacologia. 2015. V. 6. pp. 11–20.
20. Khalili A., Najafpour G.D., Amini G., Samkhaniyani F. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris* // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2015. V. 20. pp. 284–290.
21. Kim G., Mujtaba G., Lee K. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis sp.* for lipid production // Algae. 2016. V. 31. № 3. pp. 257–266.
22. Kim Y., Lian F., Yeum K.-J., Chongviriyaphan N., Choi S.-W., Russell R.M., Wang X.-D. The effects of combined antioxidant (beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid) supplementation on antioxidant capacity, DNA single-strand breaks and levels of insulin-like growth factor-1/IGF-binding protein 3 in the ferret model of lung cancer // Int. J Cancer. 2007. V. 120. № 9. pp. 1847–1854.
23. Lichtenthaler H. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Method. Enzymol. 1987. V. 148. pp. 350–382.
24. Marxen K., Vanselow K.H., Lippemeier S., Hintze R., Ruser A., Hansen U.-P. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements // Sensors. 2007. V. 7. pp. 2080–2095.
25. März U. The global market for carotenoids. – Business report FOD925C. 2008. [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.bccresearch.com.
26. McCord J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress // Am. J Med. 2000. V. 108. № 8. pp. 652–659.
27. Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrrella rubescens*, a producer of value-added keto-carotenoids // Algae. 2017. V. 32. № 3. pp. 245–259.
28. Minyuk G.S., Dantsyuk N.V., Chubchikova I.N., Chelebieva E.S., Drobetskaya I.V., Solovchenko A.E. The effect of diverse nitrogen sources in the nutrient medium on the

- growth of the green microalgae *Chromochloris zofingiensis* in the batch culture // Marine Biological Journal. 2019. V. 4. № 4. pp. 41–52.
29. *Molyneux P.* The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity // Songklanakarin J. Sci. Technol. 2004. V. 26. pp. 211–219.
 30. *Pikula K.S., Zakharenko A.M., Aruoja V., Golokhvast K.S., Tsatsakis A.M.* Oxidative stress and its biomarkers in microalgal ecotoxicology // Curr. Opin. Toxicol. 2019. V. 13. pp. 8–15.
 31. *Rahman K.* Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors // Clin. Interv. Aging. 2007. V. 2. № 2. pp. 219–236.
 32. *Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M.* Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions // J. Bot. 2012. V. 2012. Article ID 217037. 26 p.
 33. *Solovchenko A., Merzlyak M., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S.* Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in $\Delta 5$ desaturase by nitrogen starvation and high light // J. Phycol. 2010. V. 46. pp. 763–772.
 34. *Tan B. L., Norhaizan M. E., Liew W. P., Rahman H. S.* Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. // Front. Pharmacol 2018. V. 9. Article 1162. 28p.
 35. *Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2007. V. 39. № 1. pp. 44–84.
 36. *Varela J.C., Pereira H., Vila M., León R.* Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges // Photosynth. Res. 2015. V. 125. № 3. pp. 423–436.
 37. *Vonshak A.* Microalgae: Laboratory growth techniques and outdoor biomass production. In: Coombs J, Hall D, Long S, Scurlock J (eds) Techniques in Bioproduktivity and Photosynthesis. Pergamon Press, Oxford, 1985. pp. 188–203.
 38. *Wang J.F., Sommerfeld M.R., Lu C.M., Hu Q.* Combined effect of initial biomass density and nitrogen concentration on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) in outdoor cultivation // Algae. 2013. V. 28. pp. 193–202.
 39. *Whysner J., Wang C.X., Zang E., Iatropoulos M.J., Williams G.M.* Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumours of the rat forestomach // Food Chem. Toxicol. 1994. V. 32. № 3. pp. 215–222.
 40. *Young I.S., Woodside J.V.* Antioxidants in health and disease // J. Clin. Pathol. 2001. V. 54. № 3. pp. 176–186.
 41. *Zuo L., Zhou T., Pannell B. K., Ziegler A., Best T. M.* Biological and physiological role of reactive oxygen species – the good, the bad and the ugly. // Acta Physiol. 2015. V. 214. pp. 329–348.

**ANTIRADICAL ACTIVITY ESTIMATION OF SECONDARY CAROTENOIDS OF
FOUR GREEN MICROALGAE SPECIES FROM ORDER SPHAEROPLEALES
IN VITRO**

Chubchikova I.N., Drobetskaya I.V.

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS,
Sevastopol, Russian Federation*

e-mail: chubchikova@mail.ru, drobetzkaya@mail.ru

New data on growth characteristics, accumulation of secondary carotenoids and their antiradical activity in 4 species of green microalgae (order Sphaeropleales) *Pseudospongiococcum protococcoides*, *Bracteacoccus minor*, *Coelastrella rubescens* and *Cromochloris zofingiensis* in a two-stage batch culture using urea as the sole source of nitrogen are presented. It was shown that all the studied species

grow well on the urea medium. At the first stage, their specific growth rates (maximum $0.28\text{--}0.37\text{ day}^{-1}$ and average $0.15\text{--}0.17\text{ day}^{-1}$) and dry biomass productivity ($0.08\text{--}0.09\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) did not differ significantly. At the second stage, the biosynthesis of secondary carotenoids was induced using a stress complex, including: 10-fold decrease in nitrogen and phosphorus in the medium, 12-fold culture dilution, doubled round-the-clock lighting, CO₂ supply, NaCl addition on the 8th day to a concentration of $200\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ in the medium. The response of the cultures to the stress-induction of secondary carotenogenesis was similar: the accumulation of biomass, the decrease in chlorophyll levels and the accumulation of secondary carotenoids. Biomass crop productivity calculated for the entire experiment was $0.41\text{--}0.53\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ at maximum values for *P. protocooides* and *C. rubescens* with a final total carotenoid content in dry biomass of $2.3\text{--}3.9\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ at maximum values in *B. minor*. For all species, a technologically significant yield of secondary carotenoids from a liter of the initial culture was obtained ($1.1\text{--}1.6\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$). The antiradical activity of carotenoid extracts of the investigated species was evaluated by the reaction with the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) in two parameters: “percent inhibition of DPPH[•]” (I%) and “effective concentration” (EC₅₀). Extracts of all species showed a higher antiradical activity (at 49.30–70.33%) than the synthetic antioxidant 2,6-butylhydroxytoluene (BHT, or ionol). It was shown that, according to the combination of production and antiradical properties of *C. rubescens* and *P. protocooides*, this species can be considered as the most promising potential sources of secondary carotenoids for the food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Pseudosporangium protocooides*; *Bracteacoccus minor*; *Coelastrella rubescens*; *Cromochloris zofingiensis*; two-stage batch culture; DPPH[•]; antiradical activity; carotenoids; effective concentration.

Чубчикова
Ирина
Николаевна

младший научный сотрудник отдела физиологии животных и биохимии, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», e-mail: chubchikova@mail.ru

Дробецкая
Ирина
Викторовна

Кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела физиологии животных и биохимии, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», e-mail: drobetzkaya@mail.ru

Поступила в редакцию 13.03.2020 г.