

BIOLOGICAL SCIENCES

DYNAMICS OF CHANGES IN THE CONCENTRATION OF CAROTENOIDS AND CHLOROPHYLL DURING CULTIVATION OF MICROALGAE *DUNALIELLA SALINA* UNDER VARIOUS CONDITIONS OF LIGHTING AND NaCl CONCENTRATION

Verushkina O.

*PhD, senior researcher, Laboratory of "Environmental Biotechnology",
Microbiology Institute, Tashkent, Uzbekistan*

Tonkikh A.

*PhD, senior researcher, Laboratory of "Environmental Biotechnology",
Microbiology Institute, Tashkent, Uzbekistan*

Baymurzayev E.

*PhD, junior researcher, Laboratory of "Environmental Biotechnology",
Microbiology Institute, Tashkent, Uzbekistan*

Gayibova S.

*PhD, senior researcher, Laboratory of "Plant cytoprotectors",
Institute of Bioorganic chemistry, Tashkent, Uzbekistan*

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ КАРОТИНОИДОВ И ХЛОРОФИЛЛА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ОСВЕЩЁННОСТИ И КОНЦЕНТРАЦИИ NaCl

Верушкина О.А.

*PhD, старший научный сотрудник, Лаборатория "Природоохранных биотехнологий", Институт
микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан*

Тонких А.К.

*PhD, старший научный сотрудник, Лаборатория "Природоохранных биотехнологий", Институт
микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан*

Баймурзаев Е.Н.

*младший научный сотрудник, Лаборатория "Природоохранных биотехнологий",
Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан*

Гайибова С.Н.

*PhD, старший научный сотрудник, Институт Биоорганической химии АН РУз,
Ташкент, Узбекистан*

<https://doi.org/10.5281/zenodo.15102652>

Abstract

The present study is dedicated to how the amounts of carotenoids and chlorophyll changed in the microalga *Dunaliella salina* found that lighting conditions and the amount of NaCl had a big impact on their contents. We observe an increase in carotenoids synthesis at high illumination, which is associated with the photoprotective function. An increase in the concentration of NaCl also stimulates the formation of carotenoids that adapt cells to stress conditions. In contrast, the concentration of chlorophyll decreases at high NaCl concentrations, indicating a decrease in photosynthetic activity. These results emphasize the importance of optimizing cultivation conditions to increase biomass and target metabolites.

Аннотация

Изучение изменений концентрации каротиноидов и хлорофилла в микроводоросли *Dunaliella salina* показало значительное влияние условий освещённости и концентрации NaCl на их содержание. При повышенной освещённости наблюдается увеличение синтеза каротиноидов, что связано с фотозащитной функцией. Увеличение концентрации NaCl также стимулирует образование каротиноидов, адаптирующих клетки к стрессовым условиям. Напротив, концентрация хлорофилла уменьшается при высоких концентрациях NaCl, что указывает на снижение фотосинтетической активности. Эти результаты подчёркивают важность оптимизации условий культивирования для повышения биомассы и целевых метаболитов.

Keywords: biomass, β -carotene, salt tolerance, biotechnology, photosynthetic pigments

Ключевые слова: биомасса, β -каротин, солеустойчивость, биотехнология, фотосинтетические пигменты

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли являются важной группой организмов, играющих ключевую роль в первичном производстве и биогеохимических циклах в водных экосистемах. Среди них особое внимание

привлекает *Dunaliella salina*, обитающая в экстремальных условиях соленых водоемов. Микроводоросль *Dunaliella salina* является объектом многочисленных исследований благодаря своей способности

накапливать значительные количества каротиноидов и хлорофилла в экстремальных условиях. Эти пигменты играют ключевую роль в фотосинтетическом процессе и обеспечивают защиту клеток от окислительного стресса. В последние годы внимание ученых привлекает изучение динамики изменения концентрации этих пигментов при различных условиях освещенности и концентрации NaCl.

Исследования показывают, что концентрация каротиноидов и хлорофилла в клетках *Dunaliella salina* значительно варьируется в зависимости от условий культивирования. В работе Боровкова и Гудвиловича [1] было установлено, что максимальное содержание фотосинтетических пигментов в биомассе *D. salina* достигается при удельной скорости протока среды 0,14 сут⁻¹, а с увеличением скорости от 0,14 до 0,42 сут⁻¹ оно снижается на 30%. Это свидетельствует о важности оптимизации условий культивирования для достижения максимальной продуктивности.

Другие исследования также подтверждают значительное влияние условий освещенности и концентрации NaCl на содержание пигментов в клетках *Dunaliella salina*. Например, в работе Лелекова и соавторов [2] было показано, что при изменении условий освещенности и концентрации NaCl наблюдаются значительные изменения в концентрации хлорофилла и каротиноидов. Эти данные подчеркивают важность комплексного подхода к изучению влияния различных факторов на биохимический состав микроводорослей.

Кроме того, исследования показывают, что *Dunaliella salina* обладает высокой адаптивной способностью к изменяющимся условиям окружающей среды. В работе Черновой и соавторов [3] было установлено, что при квазинепрерывном культивировании *D. salina* достигается наибольшая продуктивность по биомассе, пигментам и протеину при удельной скорости протока 0,32 сут⁻¹. Это свидетельствует о возможности регулирования содержания пигментов и протеина с помощью варьирования условий культивирования.

Таким образом, литературные данные подтверждают, что динамика изменения концентрации каротиноидов и хлорофилла в клетках *Dunaliella salina* зависит от условий освещенности и концентрации NaCl. Оптимизация этих условий позволяет достигать максимальной продуктивности и содержания пигментов, что имеет важное значение для биотехнологических приложений.

Целью настоящего исследования является анализ динамики изменения концентрации каротиноидов и хлорофилла при культивировании *Dunaliella salina* в различных условиях освещенности и концентрации NaCl.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение содержания каротиноидов в экстрактах D. salina.

Определение каротиноидов проводили согласно [4]. Для этого, 50 мл суспензии микроводорослей фильтруют через мембранный фильтр Milipore диаметром 5 см и размером пор 3 мкм. Фильтр,

с осевшим водорослями помещали в бюкс и добавляли 5 мл ацетона. Нитроцеллюлозный фильтр и пигменты микроводорослей растворяется в 90% ацетоне. Смесь интенсивно встряхивают до полного растворения содержимого. Затем ацетоновый экстракт профильтровывают на стеклянном фильтре и в нём определяют на спектрофотометре поглощение света при 480 нм, что соответствует максимуму поглощения каротиноидов. Затем измеряют поглощение при длине волны 750 нм. Это нужно для введения поправки на неспецифическое поглощение и рассеяние света экстрактом. Из величины поглощения при 480 нм вычитают поглощение при 750 нм.

Параллельно определяют количество сухой биомассы в объёме 50 мл. это делают, как указано выше, измеряя оптическую плотность суспензии микроводорослей при 550 нм и по калибровочному графику определяют количество биомассы.

Концентрацию суммарных каротиноидов рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{4 \times D \times V}{m},$$

где: D - оптическая плотность при 480 нм с поправкой, V – объем экстракта в мл, m – масса сухой биомассы в этом объёме в граммах, 4 – коэффициент экстинкции для каротиноидов.

Определение концентрации хлорофиллов в экстрактах D. salina.

Данный метод описан в работе [4].

Спиртовый или ацетоновый экстракт из биомассы получали, как описано выше.

Спектрофотометрирование производят в кварцевых кюветах при длинах волн 663, 645 и 630 нм, что соответствует максимуму поглощения света хлорофиллами *a*, *b* и *c*, а также 750 нм. Последний максимум поглощения снимают для введения поправки на неспецифическое поглощение и рассеяние света экстрактом. Его величину отнимают от экстинкций соответствующих пигментов.

Количество хлорофиллов рассчитывают по формулам для двухлучевой спектрофотометрии пигментов.

$$Chl_a (мг/л) = 11,6 (E_{665}) - 0,14 (E_{630}) - 1,31 (E_{645}),$$

$$Chl_b (мг/л) = 20,7 (E_{645}) - 4,34 (E_{665}) - 4,42 (E_{630}),$$

$$Chl_c (мг/л) = 55,0 (E_{630}) - 16,3 (E_{645}) - 4,64 (E_{665}).$$

Где Chl_a , Chl_b , Chl_c — концентрации соответствующих хлорофиллов *a*, *b* и *c*.

В плане унификации расчетных формул лучше для этой цели применять формулы, рекомендованные рабочей группой № 17 при ЮНЕСКО:

В тех и других уравнениях E_{663} , E_{665} , E_{645} и E_{630} — экстинкции с поправкой на рассеяние и неспецифическое поглощение света экстрактом.

Первые уравнения основаны на коэффициентах экстинкции для хлорофилла *a*, равных 91,9 л/г • см при 665 нм, для хлорофилла *b* — 52,2 л/г • см при 645 нм и для хлорофилла *c* — 19,5 л/г • см при 630 нм.

Коэффициенты экстинкции, использованные во вторых формулах, равны для хлорофилла **a** 89,31 л/г • см при 663 нм, для хлорофилла **b** — 52,14 л/г • см при 645 нм и для хлорофилла **c** — 19,44 л/г • см при 630 нм. Как видно из приведенных цифр, коэффициенты совпадают. Исходя из этого данные, вычисленные по тем и другим формулам, должны быть вполне сравнимы.

Расчет содержания пигментов в суспензии биомассы или сухой биомассе делают по формулам как указано для каротиноидов:

$$C = Cx \frac{V \times n}{m}$$

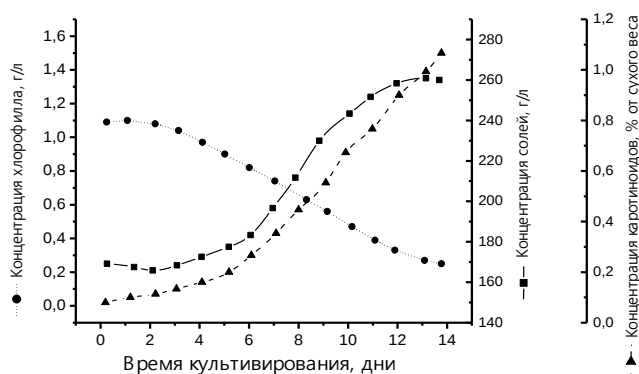


Рис. 1. Динамика изменения концентрации солей (треугольники), каротиноидов (квадраты), и биомассы (кружки) при культивировании микроводоросли *Dunaliella salina* AR-1. при освещении 20000 лк (360 μMol s-1m-2). Температура среды 35°C.

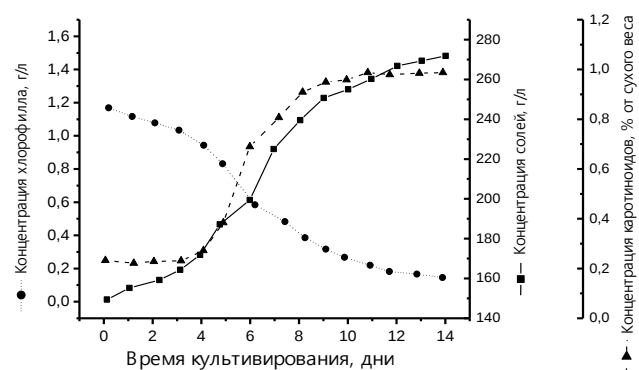


Рис. 2. Динамика изменения концентрации солей (треугольники), каротиноидов (квадраты), и биомассы (кружки) при культивировании микроводоросли *Dunaliella salina* AR-1. при освещении 40000 лк (720 μMol s-1m-2). Температура среды 39°C.

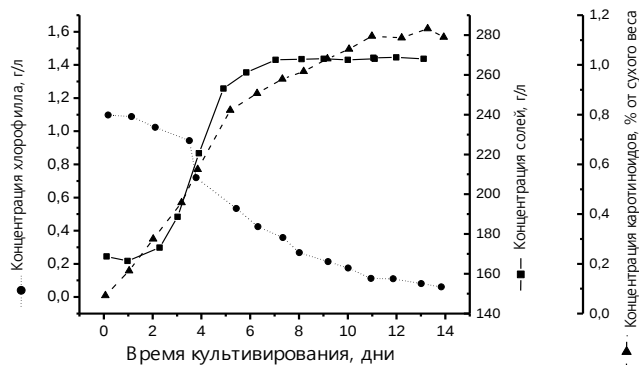


Рис. 3. Динамика изменения концентрации солей (треугольники), каротиноидов, и биомассы (кружки) при культивировании микроводоросли *Dunaliella salina* AR-1. при освещении 60000 лк (1080 μMol s-1m-2). Температура среды 43°C.

Как видно из рисунков, увеличение интенсивности освещения приводит к увеличению температуры среды и более высокой скорости увеличения

Porra [5] проанализировал большое количество уравнений по определению хлорофиллов и предложил своё уравнение для экстрактов биомассы в 80% ацетоне.

$$Chl_a (nmol/ml) = 13,7 E_{663,6} - 2,8 E_{646,6},$$

$$Chl_b (nmol/ml) = 22,4 E_{646,6} - 5,4 E_{663,6}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На рисунках 1, 2 и 3 представлена динамика изменения содержания каротиноидов при различных освещённостях и концентрации NaCl.

концентрации солей в среде. Прямо пропорционально увеличению концентрации солей увеличи-

вается и содержание каротиноидов. Если при освещении 20000 лк ($360 \mu\text{Mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) максимальное содержание каротиноидов наступает на 12 – 13 день инкубации, то при освещении 40000 лк ($720 \mu\text{Mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) – уже на 9 день. А при освещении 60000 лк ($1080 \mu\text{Mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) максимальная концентрация каротина получается на 6 -7 день.

Из проведенных данных эксперимента выявляется закономерность, что чем выше освещение и температура, тем быстрее происходит биосинтез каротина.

Кроме того, по мере увеличения концентрации соли уменьшается концентрация клеток в среде за счёт концентрации их на дне (флокуляция). Причём, клетки собираются в круг, на дне, где наиболее большая освещённость. Это явление можно будет использовать на практике при сборе биомассы.

Так же по литературным источникам известно, что для увеличения накопления каротина используют облучение коротковолновыми участками спектра солнечного света. Показано [6], что накопление каротина у *Dunaliella bardawil* происходит как защитная реакция против облучения коротковолновыми участками спектра солнечного света, так как наиболее высокие уровни накопления каротина наблюдаются при облучении синим светом.

Средние уровни накопления β -каротина наблюдаются при белом свете, а самое низкое накопление характерно для красного света. Усиленное накопление β -каротина защищает клетку от высокой радиации через адсорбцию синего света, поскольку при высокой концентрации синего света

происходит фото деструкция хлорофилла и наступает смерть клеток.

Также было показано, что синий и присутствующий в спектре Солнца ультрафиолетовый А (320-400 нм) свет инициируют синтез каротиноидов через активирование рецепторов синего света: криптохромов и фототропинов [7].

Относительно более короткой области ультрафиолетового света (УФ В 280-320 нм) данные в литературе противоречивы. Большинство авторов указывает на ингибирующее действие УФ В на накопление каротиноидов. С другой стороны, каротиноиды поглощают ультрафиолет и в области УФ В, тем самым защищая водоросли от вредного действия ультрафиолета. Вопрос изучения действия УФ А и УФ В усложняется, отсутствием источников излучения только УФ А или УФ В. Существуют источники суммарного света УФ А + УФ В, и даже УФ А + УФ В + УФ С, поэтому экспериментаторам приходится подбирать дополнительные светофильтры [7].

Для исследования вопроса: можно ли для увеличения содержания каротиноидов при инкубации дуналиеллы добавлять свет из доступных источников ультрафиолета, мы в дополнение источника белого света в 20000 лк ($360 \mu\text{Mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) обрабатывали инкубационную среду мягким ультрафиолетом УФ А и УФ В, с интенсивностью 2000 лк ($36 \mu\text{Mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) от светолечебного облучателя УФО-ИК-250 «Солис». Результаты представлены на рис. 4.

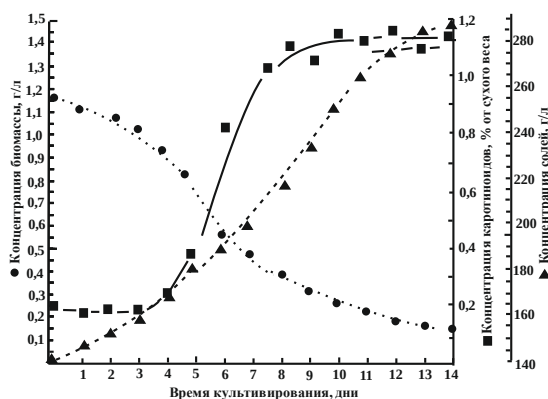


Рис. 4. Динамика изменения концентрации солей (треугольники), каротиноидов (квадраты), и биомассы (кружки) при культивировании микроводоросли *Dunaliella salina* AR-1. при освещении 20000 лк ($360 \mu\text{Mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) и добавлении ультрафиолетового света диапазона УФ А + УФ В.

Из рисунка видно, что когда добавляли слабое ультрафиолетовое облучение 2 000 лк, скорость накопления каротиноидов в микроводоросли увеличивается почти в 2 раза, по сравнению только с облучением белым светом 20 000 лк. Этот факт даёт основание предположить, что слабой ультрафиолетовой подсветкой можно увеличивать скорость каротиногенеза и при промышленном производстве каротиноидов из дуналиеллы.

Список литературы:

1. Боровков А. Б., Гудвилович И. Н. Ростовые и биохимические показатели квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* // *Biotechnol. acta*. 2012. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rostovye-i-biohimicheskie-pokazateli-kvazinepreryvnoy-kultury-dunaliella-salina> (дата обращения: 14.03.2025).

2. А. С. Лелеков, А. Б. Боровков, Т. М. Новикова, И. Н. Гудвилович, А. Л. Авсян, О. А. Меметшаева, “Моделирование динамики содержания пигментов в клетках одноклеточной водоросли *Dunaliella salina* Teod. на стадии каротиногенеза”, *Матем. биология и биоинформ.*, 14:1 (2019), 279–289

3. Чернова Л.А., Горбань В.Г., Антоненко С.П., Гудвилович И.Н., & Боровков А.Б. (2013). Получение масляного экстракта каротиноидов из микроводоросли *dunaliella salina* Teod. Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада, (108), 63-69.

4. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев. Наукова Думка. 1975. 247 с.

5. Porra, R.J. Spectrophotometric assays for plant,

algal and bacterial chlorophylls. In Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. B.Grimm, R.J. Porra, W. Rüdiger and H. Scheer (eds).// Springer, Dordrecht, Netherlands. 2006. . P. 95-107.

6. Ben-Amonz A., Shaish A., Avron M. Mode of Action of the Massively Accumulated beta-Carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the Alga against

Damage by Excess Irradiation // Plant Physiol. – 1989. – 91. - P. 1040 – 1043.

7. Jahnke L.S., White A.L. and Wiley P.S. The Effects of Ultraviolet Radiation on *Dunaliella*: Growth, Development and Metabolism In Chlorophytes In: The Alga *Dunaliella*. Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology. Eds. Ami Ben-Amotz, Jürgen E.W. Polle, D.V. Subba Rao. Science Publishers. Enfield, New Hampshire USA. 2009. P. 231-272.