

DOI: 10.15593/2224-9400/2020.3.02

УДК 576.32/36; 57.03/04

**А.Н. Шлыкова, А.А. Балабаев,
Е.В. Трухина, Ю.Г. Базарнова**

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ КАРОТИНОИДНЫХ ПИГМЕНТОВ ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ CHLORELLA

Ухудшение экологического статуса городских территорий и индустриализация пищевой промышленности приводят к высокой потребности дополнительного обогащения рациона биологически ценными компонентами, имеющими выраженную физиологическую активность и необходимыми для профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. Минорные биологически активные вещества в количестве, не превышающем суточной терапевтической дозы, применяются для поддержки функциональной активности систем органов.

Особый практический интерес представляют каротиноидные пигменты, являющиеся продуктами метаболизма фототрофных организмов. Использование каротиноидов в технологиях продуктов функционального назначения сильно затруднено низкой биодоступностью пигментов в нативной форме. Таким образом, проблема поиска дополнительных источников каротиноидов является актуальной. Перспективными в этом направлении являются инновационные пищевые продукты и добавки, полученные на основе гидробионтов с высоким содержанием каротиноидов.

*Цель работы – разработать режим направленного культивирования микроводорослей *C. sorokiniana* для получения биомассы с высоким содержанием каротиноидов.*

*В данной работе изучено влияние стрессового фактора (перекиси водорода) и стимулятора роста (пиридоксина – витамина B_6) на накопление фотосинтетических пигментов биомассой микроводоросли *C. sorokiniana* в процессе направленного культивирования. Отмечена взаимосвязь между активным накоплением биомассы и защелачиванием среды, и наоборот, закислением среды при переходе роста культуры в фазу стабилизации. Установлено, что в течение первых четырех суток совместное добавление перекиси и пиридоксина значительно не влияет на прирост биомассы, но стимулирует усиленное накопление фотосинтетических пигментов хлореллы. Выявлено, что сочетанное внесение этих добавок в культуральную среду увеличивает содержание каротиноидов и хлорофиллов в биомассе по сравнению с контролем в среднем в 2 раза. Методом экстракции с применением УЗ-дезинтеграции клеточной оболочки микроводорослей выделен пигментный комплекс *C. sorokiniana*, исследованы его спектральные характеристики. Получен концентрат каротиноидов для дальнейшего применения в рецептурах функциональных продуктов питания.*

Ключевые слова: микроводоросли *C. sorokiniana*, направленное культивирование, добавки перекиси и пиридоксина, скорость роста биомассы, каротиноиды.

**A.N. Shlykova, A.A. Balabaev,
E.V. Trukhina, Yu.G. Bazarnova**

Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University,
Saint-Petersburg, Russian Federation

STUDY ON OBTAINING CAROTENOID PIGMENTS FROM MICROALGAE CHLORELLA

Deterioration of average urban ecological status and industrialization of food production entails increased need for additional diet fortification with biologically valuable components conveying profound physiological activity necessary for prevention of alimentary diseases. These minor biologically active substances (BAC) in the amount that does not exceed daily therapeutic dosage are used for maintaining functional stability of organ systems.

Special practical interest is directed to carotenoid pigments that are products of phototropic metabolism. Employment of carotenoids in functional food production is highly hampered by low bioavailability in native form. Thus, is it relevant to search for additional sources of carotenoids. Innovational products and additives, obtained from carotenoid-rich aquacultures, are considered prospective.

*The given work is devoted to developing modes of directed cultivation of *C. sorokiniana* with the purpose of obtaining the biomass with high carotenoid content.*

*During the conducted study influence of a stress factor (hydrogen peroxide) and a growth stimulator (pyridoxine – vitamin B₆) on accumulation of photosynthetic pigments by *C. sorokiniana* microalgae cells was elucidated in the framework of directed cultivation. Relation was revealed between active biomass accumulation and alkalization of the medium, as well as, oppositely, acidification during transition to stabilization growth phase. It was established that during the first 4 days combined treatment with hydrogen peroxide and pyridoxine does not drastically influence the biomass growth rate, but stimulates augmented accumulation of photosynthetic pigments in *C. sorokiniana*. It was identified that combined treatment entails ca. two-fold increase in contents of carotenoids and chlorophyll a and b, as compared to control. Pigment complex was obtained from microalgae biomass by extraction method employing ultrasound disintegration of *C. sorokiniana* cells, extract's spectral characteristics were studied. Carotenoid concentrate was obtained for subsequent use in functional food production.*

Keywords: *microalgae *C. sorokiniana*, directed cultivation, hydrogen peroxide and pyridoxine, biomass growth rate, carotenoids.*

Согласно данным Института питания РАМН, полученным в результате исследований всех возрастных и профессиональных групп населения, дефицит витаминов группы В (В₁, В₂, В₃, В₆, РР) у населения составляет 40–60 %, витамина С (аскорбиновая кислота) – 70–100 %, по витамину А (ретинол) – 10–30 %, витамина Е (токоферол) – 15–35 %. Ухудшение экологического статуса городских территорий, инду-

стриализация пищевой промышленности (в том числе глубокая обработка сырья, длительное хранение, рафинирование, использование сухих заменителей натуральных продуктов и др.) приводят к высокой потребности дополнительного обогащения рациона биологически ценными компонентами, необходимыми для противостояния растущей заболеваемости [1].

Одним из путей решения этой проблемы является расширение ассортимента специализированных продуктов или биологически активных добавок из нетрадиционных видов растительного сырья с высоким содержанием биологически активных веществ (БАВ). Особый практический интерес представляют неотъемлемые компоненты фотосинтезирующих организмов, пигменты желто-красного диапазона – каротиноиды.

Система сопряженных двойных связей в молекулах каротиноидов, а также структурное сходство с некоторыми витаминами обуславливает их высокую биологическую ценность в составе растений (антиоксидантная, фотопротекторная, структурообразующая функции) [2, 3] и в рационе питания человека (провитаминная, детоксицирующая активность, укрепление иммунной системы, химиопрофилактика рака, сердечно-сосудистых заболеваний, катаракты и других дегенеративных нарушений) [1, 3, 4]. Вместе с тем использование каротиноидов в технологиях продуктов функционального назначения сильно затруднено низкой биодоступностью пигментов в нативной форме. Среди многочисленных факторов, ограничивающих усвоение каротиноидов в процессе пищеварения, наиболее значимыми являются липофильная природа пигментов, степень дезинтеграции растительных тканей в ходе переработки растительного сырья, высокая подверженность каротиноидов деградации под действием света, температуры, окислению кислородом воздуха.

В качестве промышленного источника каротиноидов перспективными считаются одноклеточные водоросли, содержащие в несколько раз больше пигментов, чем наземные растения. Из всего многообразия микроводорослей *Chlorella* относится к наиболее ценным благодаря высокому содержанию всех незаменимых аминокислот в составе полноценного белка, углеводов, витаминов и липидных соединений, в том числе каротиноидов и других ценных пластидных пигментов [5–7]. Помимо распространенных, водоросли также располагают ксантофиллами уникальной химической структуры, которая зачастую характерна

для отдельных таксонов, так как оксикаротиноиды водорослей – производные не только β -, но и α -, и γ -каротинов. Так, водоросли группы *Chlorophyta* могут содержать такие особые пигменты, как фикоцианин, сифоноксантин, астаксантин, лороксантин, зеиноксантин, неоксантин, а также такие алленовые и ацетиленовые каротиноиды, как диатоксантин и диадиноксантин и др. [8]. В зависимости от условий культивирования нутриентный состав клетки хлореллы может сильно варьировать. С учетом специфики использования пигментов хлореллой и разнообразием техник направленного культивирования существует возможность стимулировать биосинтез вторичных каротиноидов с целью их выделения и использования при создании нутрицевтиков и парафармацевтиков.

Так, Н.П. Дмитриевич и А.С. Крыльчук [8] исследовали влияние состава питательной среды и барботажа на количественное накопление пигментов, в том числе каротиноидов, у микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Благодаря высокой адаптационной активности одноклеточные водоросли способны синтезировать большое количество вторичных каротиноидов (ВКР) в условиях стресса различной природы. Такими источниками стресса могут быть осмотический шок, дефицит азота и/или фосфора, высокая интенсивность поглощаемого света, неоптимальные температуры, активные формы кислорода (АФК) в среде или синтез АФК в клетке. Связь между добавлением АФК в среду и увеличенным синтезом астаксантина гематококками была доказана Лу Фаном в 1998 г.

Пищевые продукты, обогащенные выделенными каротиноидами хлореллы, могут быть показаны группам риска раковых заболеваний, дегенеративных расстройств зрительной системы в качестве сопутствующей лечению фитотерапии, а также вегетарианцам, беременным женщинам, в целях поддержания развития нервной системы детей, профилактики заболеваний, укрепления общей устойчивости организма к заболеваниям.

Цель работы – разработать режим направленного культивирования микроводоросли *C. sorokiniana* для получения биомассы с высоким содержанием каротиноидов.

Экспериментальная часть. Объектами исследования являлись маточная культура одноклеточных водорослей *Chlorella sorokiniana* (штамм 211–8k) из коллекции водорослей университета Геттингена (Culture Collection of Algae at Göttingen University, international acronym

SAG); выделенные из биомассы *C. sorokiniana* экстракты пигментного комплекса; выделенные из биомассы *C. sorokiniana* экстракты суммы каротиноидных пигментов.

Культивирование микроводорослей проводили по методике, описанной авторами [6] в лабораторных биореакторах объемом 500 см³ с использованием питательной среды, содержащей все необходимые макро- и микроэлементы, предложенной авторами [9].

Маточную культуру *C. sorokiniana* разбавляли питательной средой до начальной концентрации 8,20 млн клеток на 1 мл суспензии и вносили в биореактор, заполняли его объем культуральной средой и вносили исследуемые добавки. Перемешивание системы и снабжение ее углекислым газом в ходе культивирования осуществляли барботированием воздухом с помощью компрессора Xilon AP-001, в режиме 1,5 л/мин. Температурный диапазон культивирования составлял 20–23 °С. Режимы освещенности – «день-ночь» (16–8 ч) – поддерживали с использованием светильника светодиодного ТИС-15М1Р со световым потоком 3000 лм.

Изменение концентрации клеток в культуральной жидкости на протяжении культивирования контролировали ежедневным измерением оптической плотности суспензии на спектрофотометре ЮНИКО 1205 при длине волны 750 нм, в качестве раствора сравнения использовали питательную среду. Изменение рН суспензий контролировали ежедневно при помощи экспресс рН-метра HI98103 Checker 1.

Внесение добавок производили после замера оптической плотности и рН каждый день, начиная с первого, по следующей схеме: 1 – не добавляли (контроль); 2 – 0,01 мл 3 % перекись водорода; 3 – 0,01 мл 3 % перекиси водорода и 0,50 мл пиридоксина гидрохлорида с концентрацией 50 мг/мл.

Вышеописанные процедуры проводили в течение 4 сут, после чего завершали цикл культивирования.

Удельную скорость роста биомассы определяли по уравнению

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t, \quad (1)$$

где X_0 и X – это концентрации клеточной биомассы в начальный и конечный момент, соответственно, млн клеток/мл; μ – удельная скорость роста биомассы, сут⁻¹; t – время культивирования, сут.

Выделение биомассы и анализ состава пигментов. Концентрирование биомассы проводили центрифугированием полученной клеточной суспензии при 6000 об/мин в течение 10 мин с последующим де-

кантированием надсадочной жидкости. Обезвоживание полученного концентрата проводили воздушным способом при 20–23 °С в темном месте в течение 5 сут. Содержание влаги в полученных образцах воздушно-сухой биомассы не превышало 2 %.

Навеску воздушно-сухой биомассы, взвешенную с точностью до 0,0001 г, диспергировали в 96 % этаноле. Дезинтеграцию клеточной оболочки микроводоросли проводили под воздействием ультразвукового поля в УЗ-ванне Wise Clean WUC-A03H при температуре 40 °С в течение 30 мин, после чего экстракт отделяли от шрота путем центрифугирования при 3300 об/мин в течение 5 мин.

При изучении состава экстрактов пигментов, выделенных из полученной биомассы, применяли спектральные методы, описанные авторами [5, 10].

Для идентификации и анализа пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) в экстрактах биомассы использовали полосы поглощения в области 470, 649 и 664 нм и методику авторов [5, 10]. Расчет концентраций хлорофиллов и каротиноидов, содержащихся в биомассах образцов, проводили по спектрам экстрактов в соответствии с формулами (2)–(4) – для пересчета на объем экстракта, с формулой (5) – на навеску:

$$Ch_a = 13.36 \cdot D_{664} - 5.19 \cdot D_{649}; \quad (2)$$

$$Ch_b = 27.43 \cdot D_{649} - 8.12 \cdot D_{664}; \quad (3)$$

$$C_k = (1000 \cdot D_{470} - 2.13 \cdot Ch_a - 97.63 \cdot Ch_b) / 209, \quad (4)$$

где $Ch_{a,b}$ – концентрация хлорофиллов a и b в исследуемом экстракте, мкг/мл; C_k – концентрация каротиноидов в исследуемом экстракте, мкг/мл; $D_{470,649,664}$ – оптическая плотность исследуемого экстракта при длинах волн 470, 649 и 664 нм, соответственно.

$$A = \frac{(C \cdot V)}{m \cdot 1000}, \quad (5)$$

где A – концентрация пигментов в массе исследуемой навески, мг/г; C – концентрация пигментов в экстракте, мкг/мл; V – объем вытяжки, мл; m – масса исследуемой навески, г.

Разделение фракций пигментов и их анализ. Сепарирование суммарных каротиноидов и их отделение от хлорофиллов производили путем омыления хлорофиллиновых кислот щелочью калия в присутст-

вии н-гексана с последующим сбором фракций хлорофиллов и каротиноидов на делительной воронке.

Для этого на 20 мл этанольного экстракта использовали 0,1 г КОН. Колбу энергично встряхивали в течение 5 мин. Затем добавляли 40 мл н-гексана и наблюдали расслоение эмульсии.

Состав выделенных фракций определяли спектрофотометрическим методом. Для этой цели предварительно сгущали экстракт на ротационном испарителе ЭКРОС ПЭ-8920/PENTAIR NOCCHI JENITOX 45/43 при температуре 75 °С, 150–160 об./мин в течение 2 ч. Полученный сухой остаток растворяли в 5 мл подсолнечного рафинированного дезодорированного масла.

Результаты и обсуждение. Кривые роста биомассы микроводоросли *Chlorella sorokiniana* в исследуемых условиях культивирования приведены на рис. 1.

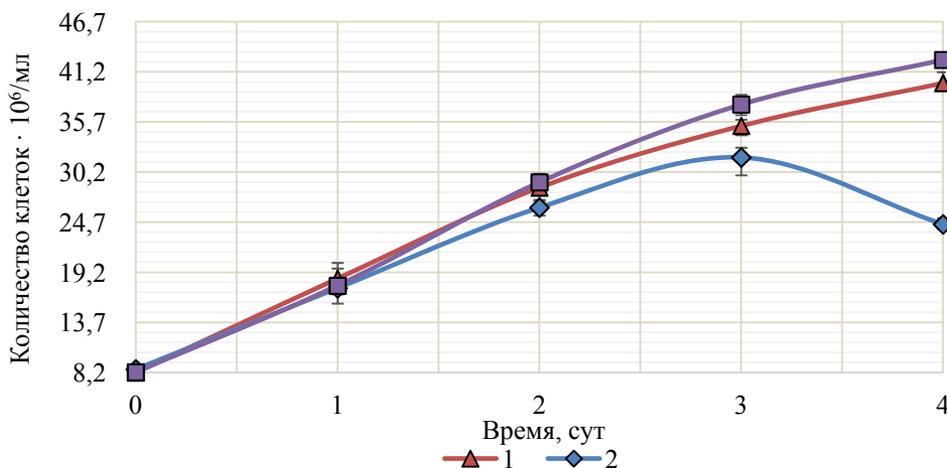


Рис. 1. Кривые культивирования микроводоросли *Chlorella sorokiniana* в средах различного состава: 1 – контроль; 2 – перекись; 3 – перекись и пиридоксин

Установлено, что лаг-фаза на полученных кривых не выражена. для образца 2 экспоненциальная фаза сократилась до 3 сут; отмечено изменение цвета суспензии в фазе стабилизации, она приобрела желтый оттенок. Причиной ускоренного ухудшения физиологических характеристик образца 2 может быть окисление, вызванное добавками стрессового агента (перекиси водорода). Таким образом, в случае использования H_2O_2 в качестве самостоятельного стрессового индуктора каротиногенеза рекомендуется вносить ее в количестве менее 0,01 мл на 500 мл клеточной суспензии.

На рис. 2 представлена экспоненциальная фаза роста биомассы микроводоросли *C. sorokiniana* в полулогарифмических координатах. Экспоненциальная аппроксимация логарифмической фазы роста биомасс на графике с вертикальной осью $\text{Ln}X$ и горизонтальной осью t , сут представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой соответствует значению удельной скорости роста биомассы μ , сут^{-1} .

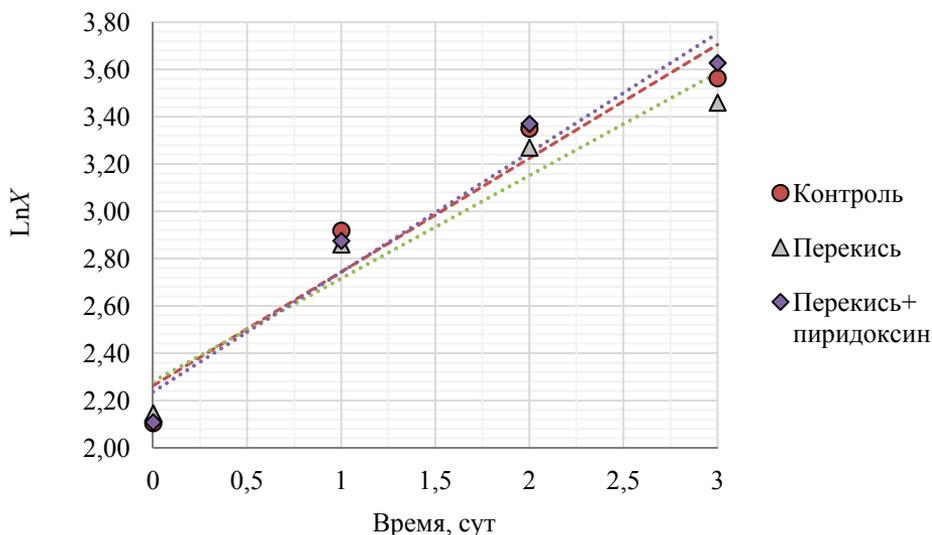


Рис. 2. Экспоненциальная фаза роста биомассы микроводоросли *C. sorokiniana* в полулогарифмических координатах (точки – экспериментальные данные, линии – расчетные зависимости)

Уравнения полученных кинетических зависимостей соответствуют формуле (1), где коэффициент перед аргументом времени представляет собой значение удельной скорости роста образца (таблица).

Кинетические уравнения и удельная скорость роста биомассы микроводоросли *C. sorokiniana*

№ п/п	Вносимые добавки	Кинетические уравнения роста и удельная скорость роста μ , сут^{-1} при достоверности аппроксимации R^2
1	Контроль (без добавок)	$\text{Ln}X = 0,24t + 2,022$ $\mu = 0,24 \pm 0,01$, $R^2 = 0,9266$
2	0,01 мл 3 % перекиси водорода	$\text{Ln}X = 0,21t + 2,0632$ $\mu = 0,22 \pm 0,01$, $R^2 = 0,9320$
3	0,01 мл 3 % перекиси водорода и 0,5 мл пиридоксина гидрохлорида	$\text{Ln}X = 0,25t + 1,9842$ $\mu = 0,25 \pm 0,01$, $R^2 = 0,9515$

На основании полученных результатов установлено, что сочетанное применение перекиси и пиридоксина при культивировании ускоряет прирост биомассы незначительно. Применение перекиси в исследуемом объеме несколько снижает скорость роста биомассы микроводоросли, а постепенное накопление продуктов окисления сокращает длительность жизненного цикла микроводоросли.

Отмечено значительное отличие цвета образца 3 по сравнению с другими: наблюдался более насыщенный темно-зеленый цвет. Это свидетельствует об активном синтезе фотосинтетических пигментов.

На рис. 3 приведено влияние вносимых добавок на динамику рН в процессе культивирования *C. sorokiniana*.

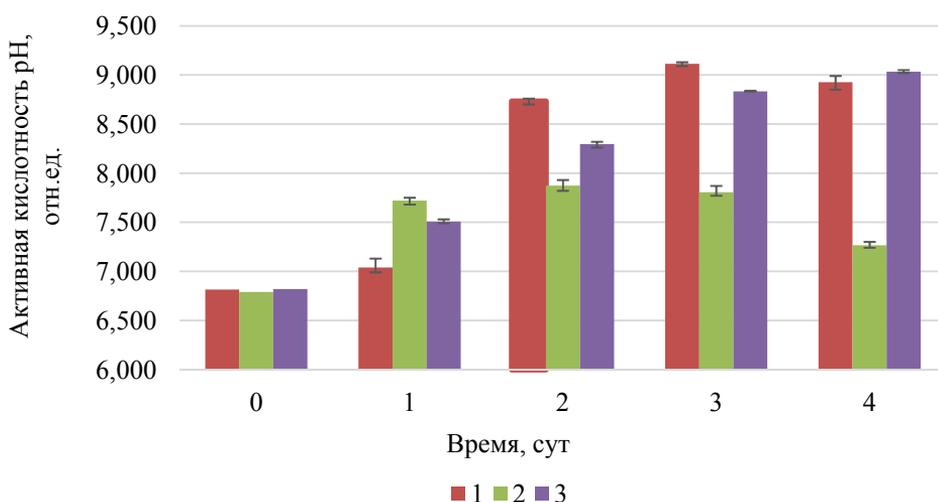


Рис. 3. Влияние вносимых добавок на динамику рН в процессе культивирования *C. sorokiniana*: 1 – контроль; 2 – перекись; 3 – перекись+пиридоксин

Отмечена взаимосвязь между характером кривых культивирования и динамикой рН. После 1 сут культивирования значения рН во всех образцах постепенно увеличиваются. Авторами [11] обозначено, что это связано с началом фотосинтетической активности и деятельности микроводоросли по усвоению нутриентов питательной среды. Известно, что изменение рН культуральной среды во многом зависит от источника азота. В качестве источника азота в данной питательной среде используется нитрат калия. Авторы [12] сообщают, что при поглощении водорослями нитратной формы азота может происходить защелачивание среды за счет экспорта излишков ионов аммония, образовавшихся в процессе фотодыхания и других метаболических процес-

сов. Также жизнедеятельность водорослей сопровождается повышением рН ввиду накопления карбонатных и бикарбонатных электролитов, защелачивающих среду. Следовательно, можно заключить, что индикатором жизнедеятельности и благополучия популяции микроводоросли *C. sorokiniana* является смещение кислотности в щелочную сторону, в то время как смещение рН в кислую сторону свидетельствует об угнетении роста и начинающейся гибели биомассы.

Определение выхода воздушно-сухой биомассы. Результаты определения выхода воздушно-сухой биомассы представлены на рис. 4.

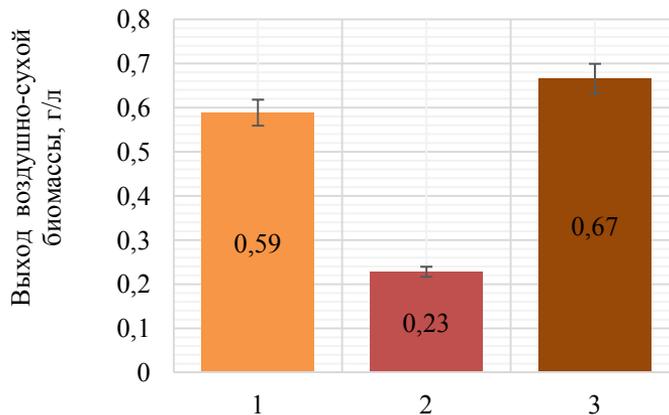


Рис. 4. Выход воздушно-сухой биомассы микроводоросли *C. sorokiniana*, полученной с использованием добавок: 1 – контроль; 2 – перекись; 3 – перекись+пиридоксин

Использование перекиси в количестве 0,01 мл на 500 мл суспензии сократило выход биомассы примерно на 60 % по сравнению с контрольным образцом. Использование добавок перекиси и пиридоксина в описанном соотношении увеличило выход воздушно-сухой биомассы на 12 %.

Исследование спектральных характеристик выделенных пигментов. Влияние вносимых добавок на накопление фотосинтетических пигментов приведено на рис. 5. Получены спектры поглощения экстрактов пигментов биомассы *C. sorokiniana* в 96%-ном этаноле. При анализе спектров поглощения отмечено две полосы поглощения: в сине-фиолетовой области 380–500 нм и в красной области 600–680 нм.

Плечо при 420 нм (1) и пик при 664 нм (4) с сопутствующим ему плечом при 620 нм (5) соответствуют хлорофиллу *a*. Авторами [6] описана полоса поглощения каротиноидов в области 420–480 нм с пиками в 440 (2) и 470 нм (3).

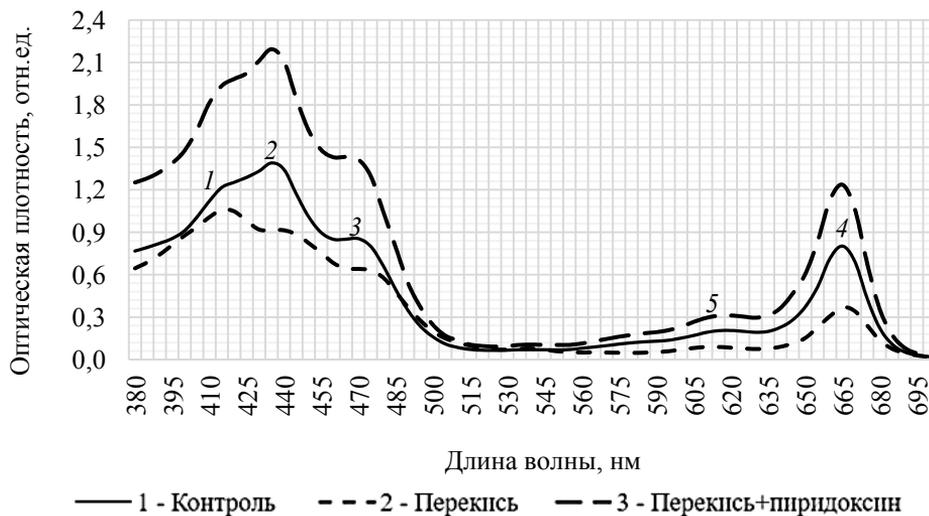


Рис. 5. Спектральные профили этанольных экстрактов пигментов биомассы *C. sorokiniana*, полученной с применением различных добавок (разведение 1:4)

Установлено, что для спектрального профиля образца 2 (перекись) пик хлорофилла *a* в сине-фиолетовой области поглощения сдвинут с 420 на 415 нм. Это может быть вызвано изомеризацией хлорофилла и его высокой подверженности изменениям, особенно в тех стрессовых условиях, в каковых находилась биомасса образца в присутствии перекиси водорода.

Следует отметить, что спектральный профиль образца 2 имеет общие черты с так называемой «коронай» в спектре поглощения каротиноидов, описанной авторами [6]. Это позволяет рассуждать о преобладании каротиноидов в сумме пигментов образца 2. Спектральные профили контроля и образца 3 не имеют качественных различий, но, очевидно, отличаются по концентрации соответствующих веществ, судя по различию в интенсивностях поглощения.

На рис. 6 приведено содержание пигментов в образцах биомассы *C. sorokiniana* и их соотношение.

Установлено, что наибольшее содержание пигментов отмечено в образце с добавками перекиси и пиридоксина: содержание суммы пигментов и каждого их вида в отдельности в среднем практически в 2 раза больше таковых у контроля. Благодаря такому равномерному увеличению всех количеств пигментов доля каротиноидов в сумме пигментов образца, а также соотношение хлорофиллов *a* и *b* значительно не изменилось по сравнению с контролем.

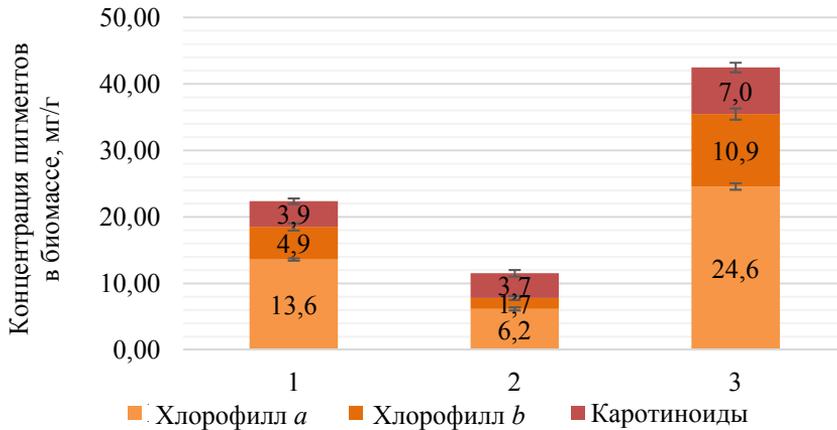


Рис. 6. Влияние добавок на содержание пигментов в образцах биомассы *C. sorokiniana*: 1 – контроль; 2 – перекись; 3 – перекись+пиридоксин

В образце с добавлением H_2O_2 отмечено уменьшение содержания пигментов примерно на 50 %. При этом наиболее существенное снижение отмечено для хлорофилла *b* (на 65 % меньше по сравнению с контролем), количество каротиноидов соотносилось с таковым у контроля в пределах погрешности. В связи с этим доля каротиноидов увеличивалась, а ввиду неравномерного влияния стрессового фактора на разрушение хлорофилла *a* и *b* изменялось и соотношение хлорофиллов.

Негативное влияние добавок H_2O_2 (образец 3) сказывается на содержании хлорофиллов. Хлорофилл обладает высокой реакционной способностью, при этом продукты изомеризации, а затем и распада хлорофилла образуются тогда, когда их молекулы подвергаются воздействию избыточного света, кислорода воздуха, высоких температур, кислот или оснований и других стрессовых условий [8]. Как прекурсор синглетного кислорода и высокореактивного гидроксильного радикала, H_2O_2 может создать такие условия, способствуя распаду хлорофилла. Факт структурных изменений хлорофиллов подкрепляется данными о сдвиге пика в синей области спектра.

Отмечено положительное влияние пиридоксина на содержание пигментов в биомассе хлореллы. Этот эффект, вероятно, заключается в стимулировании синтеза аминокислот, использующихся в том числе и для синтеза светоулавливающих пигментно-белковых комплексов (ПБК). В обзоре структуры ПБК [4] подчеркивается, что хлорофиллы являются их важным кофактором и, нековалентно связываясь с белками, структурно стабилизируют комплекс. Это значит, что для эффек-

тивной работы и стабильности вновь образующихся ПБК требуется иммобилизовать большее количество фотосинтетических пигментов: прежде всего, хлорофиллов, а также их вспомогательных пигментов-антенн – каротиноидов. Существует вероятность, что долю суммарных каротиноидов в образце составляют и вторичные каротиноиды, синтез которых мог индуцироваться добавлением перекиси водорода, что описано авторами [13, 14]. Однако имеющихся данных недостаточно, чтобы достоверно соотнести увеличение содержания каротиноидов с его индукцией перекисью при сочетанном применении с пиридоксином.

Известно, что помимо стимулирования пластических процессов пиридоксин способен частично нивелировать процессы оксидативного стресса. Авторами [15] показано, что пиридоксин значительно повышал активность таких протекторных антиоксидантных ферментов у *Chlorella vulgaris*, как пероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза и аскорбат пероксидаза.

Таким образом, показано, что сочетанное применение перекиси водорода и пиридоксина увеличивает содержание ценных пигментов биомассы микроводоросли *Chlorella sorokiniana*, не вызывая при этом нежелательных эффектов от применения окислительного агента.

Образец с наибольшим содержанием пигментов использовали для дальнейшего разделения фракций хлорофиллов и каротиноидов.

Фракционирование пигментов. С целью проанализировать чистоту полученных фракций получены спектральные профили фракций, представленные на рис. 7.

На рисунке отмечены полосы поглощения в сине-фиолетовой области при 380–490 нм и красной области при 630–680 нм. Представлен спектральный профиль гексанового экстракта солей хлорофиллиновых кислот (сплошная линия), содержащий пик при 420 нм, характерный для хлорофилла *a*, и пик при 649 нм, описанный для хлорофилла *b* [6]. Спектральный профиль каротиноидов водоросли *Chlorella* демонстрирует характерную «корону» с тремя пиками при 420, 445 и 472 нм. Комплекс пиков, близких к полученным, описан автором [16, с. 44] для нейроспорина (414, 439, 467 нм), а авторами [17] – для α -каротина (423, 444, 473 нм) и β -каротина (425, 450, 478 нм).

Полученный экстракт суммарных каротиноидов использован для получения масляного концентрата, имеющего характерный для каротиноидов ярко-оранжевый цвет. Остаточное содержание этанола в полученном сухом остатке массой 0,26 г составило не более 2 %.

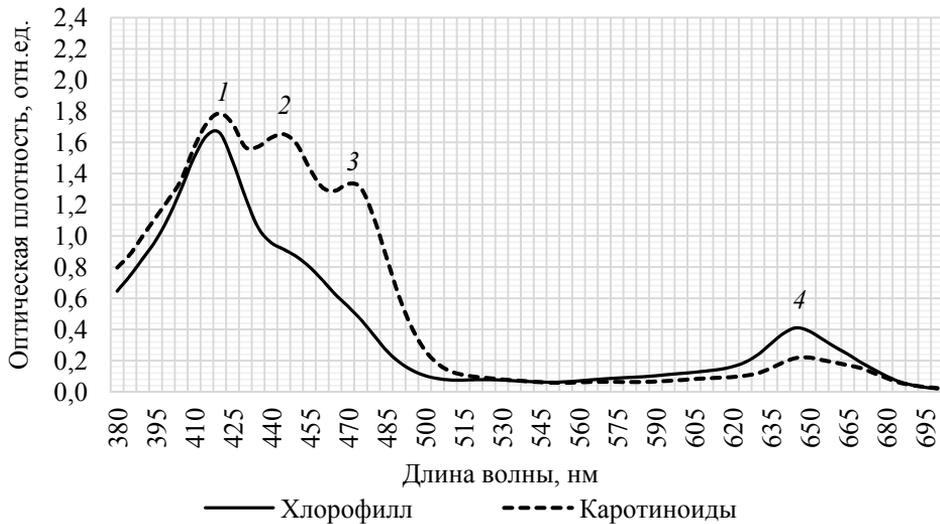


Рис. 7. Спектры поглощения экстрактов из биомассы *Chlorella sorokiniana*, полученной с использованием добавок перекиси водорода и пиридоксина (экстракт хлорофиллов разбавлен этанолом в соотношении 1:9; экстракт каротиноидов – без разбавления)

Заключение. Исследован процесс направленного культивирования микроводорослей *C. sorokiniana* с целью получения биомассы с повышенным содержанием каротиноидов. Предложено сочетанное использование добавок перекиси водорода и стимулятора роста биомассы (пиридоксина, витамина В₆) в культуральные среды, при котором содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в биомассе увеличивается по сравнению с контрольным образцом в среднем в 2 раза.

Из образца биомассы, культивированного с применением комбинированной добавки (перекиси водорода и пиридоксина), получен масляный экстракт каротиноидов с содержанием основного вещества 52 мг/мл.

Список литературы

1. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Каротиноиды как основа для создания лечебно-профилактических средств // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 4. – С. 91–98.

2. Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей / Ин-т фундамент. проблем биологии. – Пущино, 2015. – 87 с.

3. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health / Glenn E. Bartley, Pablo A. Scolnik // The Plant Cell. – 1995. – Vol. 7. – P. 1027–1038. DOI:10.1105/tpc.7.7.1027

4. Дымова О.В., Головкин Т.К. Фотосинтетические пигменты: функционирование, экология, биологическая активность // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2018. – № 3. – С. 5–16.

5. Пат. 2695879 Рос. Федерация Способ получения пигментного комплекса из биомассы одноклеточных водорослей рода *Chlorella* / Ю.Г. Базарнова, Т.А. Кузнецова, Ю.А. Смятская. – № 2018142406; заявл. 01.12.2018; опубл. 29.07.2019. Бюл. №22. – 11 с.

6. Кузнецова Т.А., Никитина М.С., Севастьянова А.Д. Направленное культивирование *Chlorella sorokiniana* с целью увеличения синтеза каротиноидов // Вестник ВГУИТ. Пищевая биотехнология. – 2019. – № 4. – С. 34–39. DOI: 10.20914/2310-1202-2019-4-34-39

7. A method for obtaining plastid pigments from the biomass of *Chlorella microalgae* / J. Bazarnova, T. Kuznetsova, E. Aronova, L. Popova, E. Pochkaeva // Agronomy Research. – 2020. – № 7. – 11 p. – URL: https://agronomy.emu.ee/wp-content/uploads/2020/07/AR2020_118_Bazarnova_V_doi_175.pdf#abstract-7807 (accessed 28 February 2020).

8. Дмитриевич Н.П., Крыльчук А.С., Симончик Н.А. Влияние питательной среды и интенсивности барботаж на динамику физиологических параметров роста хлореллы // Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук. – 2016. – № 2. – С. 13–18.

9. Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO₂ mitigation / C. Crofcheck, A. Shea [et al.] // J. Biochem. Tech. – 2012. – Vol. 4, no. 2. – P. 589–594. DOI: 10.13031/2013.41734

10. Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents / S. Nayek, S.I. Haque, J. Nishika, R. Suprakash // Research Journal of Chemical Sciences. – 2014. – Vol. 4, no. 9. – P. 63–69. DOI: 10.1055/s-0033-1340072

11. Шавырина О.Б. Токсичность меди для культуры зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* при флуктуациях уровня активной реакции среды (рН) // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 4. – С. 741–743.

12. Галицкая А.А. Эколого-биохимическая адаптация *WOLFFIA ARRHIZA* (L.) к абиотическим и биотическим факторам среды: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2012. – 20 с.

13. Физиолого-биохимические характеристики микроводоросли *Ettlia Carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) в условиях экспериментального стресса / Э.С. Челебиева, Г.С. Минюк, И.В. Дробецкая, И.Н. Чубчикова. – 2-е изд. – Севастополь: Морской Экологический журнал, 2013. – С. 78–87.

14. Solovchenko A.E. Physiology and Adaptive Significance of Secondary Carotenogenesis in Green Microalga // Russian Journal of Plant Physiology: Biology, Moscow. – 2013. – Vol. 60, no. 1. – P. 1–13. DOI: 10.1134/S1021443713010081

15. Farghl A.A., Thiamine and Pyridoxine Alleviate Oxidative Damage by Copper Stress in Green Alga *Chlorella vulgaris* // Egypt. J. Microbiol. – 2012. – No. 47. – P. 97–110.
16. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
17. Курегян А.Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2(23). – С. 5166–5172.

References

1. Shashkina M.Y., Shashkin P.N., Sergeev A.V. Karotinoidy kak osnova dlia sozdaniia lechebno-profilakticheskikh sredstv [Carotenoids as the basis for creating therapeutic treatments]. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2009, vol. 8, no. 4, pp. 91-98.
2. Ladigin V.G. Puti biosinteza, lokalizatsiia, metabolism i funktsii karotinoidov v khloroplastakh razlichnykh vidov vodoroslei [Biosynthetic pathways, localization, metabolism and function of carotenoids in chloroplasts in various algae species]. *Federal'noe gosudarstvennoe biudzhethoe uchrezhdenie nauki, Institut fundamental'nykh problem biologii, Rossiiskoi akademii nauk, Voprosy sovremennoi al'gologii*, 2015, 87 p.
3. Glenn E. Bartley, Pablo A. Scolnik. Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *The Plant Cell*, 1995, vol. 7, pp. 1027-1038. DOI:10.1105/tpc.7.7.1027
4. Dimova O.V, Golovko T.K. Fotosinteticheskie pigmenty: funktsionirovanie, ekologiia, biologicheskaiia aktivnost' [Photosynthetic pigments: functioning, ecology, biological activity]. *Izvestiia ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*, 2018, no. 3, pp. 5–16.
5. Bazarnova J.G., Kuznetsova T.A., Smyatskaya J.A. Sposob polucheniiia pigmentnogo kompleksa iz biomassy odnokletochnykh vodoroslei roda *Chlorella* [Way to obtain pigment complex from biomass of single-cell algae *Chlorella*]. Patent Rossiiskaia Federatsiia no. 2695879 (2019).
6. Kuznetsova T.A., Nikitina M.S., Sevastyanova A.D. Directed cultivation of *Chlorella sorokiniana* to increase carotenoid synthesis. *Vestnik VGUIT*. 2019, vol.81, no. 4, pp. 34-39. DOI: 10.20914/2310-1202-2019-4-34-39
7. Bazarnova J., Kuznetsova T., Aronova E., Popova L., Pochkaeva E. A method for obtaining plastid pigments from the biomass of *Chlorella* microalgae. *Agronomy Research*, 2020, 11 p., available at: https://agronomy.emu.ee/wp-content/uploads/2020/07/AR2020_118_Bazarnova_V_doi_175.pdf#abstract-7807 (accessed 28 July 2020).
8. Dmitrovich N.P., Krilchuk A.C., Simonchik N.A. Vliianie pitatel'noi sredy i intensivnosti barbotazha na dinamiku fiziologicheskikh parametrov rosta khlorelly [Influence of medium and aeration intensity on dynamic of *Chlorella* physiological growth parameters]. *Vestnik Poleskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskikh nauk*, 2016, no. 2, pp. 13-18.

9. Crofcheck C., Shea A. et. al. Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO₂ mitigation. *J Biochem Tech*, 2012, vol. 4, no. 2, pp. 589-594. DOI: 10.13031/2013.41734

10. Nayek S., Haque C.I., Nishika J., Suprakash R. Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences*, 2014, vol. 4, no. 9, pp. 63–69. DOI: 10.1055/s-0033-1340072

11. Shavirina O.B. Toksichnost' medi dlia kul'tury zelenoi vodorosli *Scenedesmus quadricauda* pri fluktuatsiiakh urovnia aktivnoi reaktсии sredy (pH) [Toxicity of copper for green algae culture *Scenedesmus quadricauda* during pH fluctuations]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*, 2016, no. 4, pp. 741-743.

12. Galitskaya, A.A. Ekologo-biokhimicheskaia adaptatsiia WOLFFIA ARRHIZA (L.) k abioticheskim i bioticheskim faktoram sredy [Ecological and biochemical adaptation WOLFFIA ARRHIZA (L.) to abiotic and biotic environmental factors]. Abstract of Ph. D. thesis. Saratov, 2012, 20 p.

13. Chelebieva Elina, Minyuk G.S., Drobetskaya I.V, Chubchikova I.N. Physiological and biochemical characteristics of *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) under experimental stress condition. 2nd ed. Sevastopol, *Marine Ecological journal*, 2013, pp. 78-87.

14. Solovchenko, A.E. Physiology and Adaptive Significance of Secondary Carotenogenesis in Green Microalga. *Russian Journal of Plant Physiology*, Moscow, 2013, vol. 60, no. 1, pp. 1-13. DOI:10.1134/S1021443713010081

15. Farghl, A. A., Thiamine and Pyridoxine Alleviate Oxidative Damage by Copper Stress in Green Alga *Chlorella vulgaris*. *Egypt. J. Microbiol*, 2012, no. 47, pp. 97-110.

16. Britton G. Biokhimiia prirodnykh pigmentov [Biochemistry of natural pigments]. Moscow, Mir, 1986, 422 p.

17. Kuregyan, A.G. Spektrofotometriia v analize karotinoïdov [Spectrophotometry in carotenoid analysis]. *Pyatigorsk, Fundamental'nye issledovaniia*, 2015, no. 2, part 23, pp. 5166-5172.

Получено 01.08.2020

Об авторах

Шлыкова Антонина Николаевна (Санкт-Петербург, Россия) – бакалавр Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (195251, С.-Петербург, ул. Политехническая, 29; e-mail: shantonina@inbox.ru).

Балабаев Алексей Александрович (Санкт-Петербург, Россия) – магистрант Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (195251, С.-Петербург, ул. Политехническая, 29; e-mail: lesha.all@mail.ru).

Трухина Елена Владимировна (Санкт-Петербург, Россия) – аспирант Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (195251, С.-Петербург, ул. Политехническая, 29; e-mail: trukhina_ev@spbstu.ru).

Базарнова Юлия Генриховна (Санкт-Петербург, Россия) – д-р техн. наук, профессор, директор Высшей школы биотехнологий и пищевых производств Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, (195251, С.-Петербург, ул. Политехническая, 29; e-mail: jbazarnova@yandex.ru).

About the authors

Antonina N. Shlykova (Saint-Petersburg, Russian Federation) – Bachelor at Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University (29, Polytechnicheskaya str., Saint-Petersburg, 195251, e-mail: shantonina@inbox.ru).

Aleksei A. Balabaev (Saint-Petersburg, Russian Federation) – Undergraduate Student, Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University (29, Polytechnicheskaya str., Saint-Petersburg, 195251, e-mail: lesha.all@mail.ru).

Elena V. Trukhina (Saint-Petersburg, Russian Federation) – Postgraduate Student, Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University (29, Polytechnicheskaya str., Saint-Petersburg, 195251, e-mail: trukhina_ev@spbstu.ru).

Julia G. Bazarnova (Saint-Petersburg, Russian Federation) – Doctor of Technical Sciences, Professor, director of Graduate School of Biotechnology and food industries at Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University (29, Polytechnicheskaya str., Saint-Petersburg, 195251, e-mail: jbazarnova@yandex.ru).