

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
Доц. Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № _____ засідання кафедри
від “ _____ ” _____ 20__ р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК ТА РОСТОВИХ
ХАРАКТЕРИСТИК ПРОДУЦЕНТА АСТАКСАНТИНУ
НАЕМАТОСОCCUS LACUSTRIS (GIR.-CHANTR.) ROSTAFINSKI
(*CHLOROPHYTA, CHLAMYDOMONADALES*) У КУЛЬТУРИ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студентки спеціальності

091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

Голуб Еліни

Науковий керівник від кафедри

доцент кафедри молекулярної

біотехнології та біоінформатики

к. б. н. Самофалова Дарія

Робота виконана у відділі фікології, ліхенології та бріології Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України під керівництвом к. б. н. **Борисової О. В.**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Голуб Е. О. Дослідження морфологічних ознак та ростових характеристик продуцента астаксантину *Haematococcus lacustris* (Gir.-Chantr.) Rostafinski (*Chlorophyta, Chlamydomonadales*) у культурі. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Представлено результати дослідження вітчизняного штаму зеленої водорості *Haematococcus lacustris* (Gir.-Chantr.) Rostafinski (*Chlorophyta, Chlamydomonadales*) IBASU-A 462 із колекції культур мікроводоростей Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного України з метою оцінки його біотехнологічного потенціалу як продуцента біомаси для одержання кетокаротиноїду астаксантину – пігменту з високою біологічною цінністю та широким спектром застосування у харчовій промисловості, сільському господарстві, медицині тощо. Проведено визначення активності його росту і кінетичних характеристик (питомої швидкості росту та продуктивності), а також біологічних особливостей (наявність вегетативних монадних, нерухомих пальмелоїдних клітин та апланоспор на різних стадіях росту культури водоростей) у порівнянні зі штамом IBASU-A 464, який є відомим продуцентом біомаси та астаксантину. Отримані результати можуть бути використані для подальших досліджень, спрямованих на розробку найбільш ефективних способів культивування цих водоростей та пошуку інших перспективних для біотехнології штамів продуцентів астаксантину. Проведені експерименти включали такі етапи: культивування водоростей за умов інтенсивного накопичувального режиму, щоденний відбір матеріалу для контролю активності їхнього росту, визначення кінетичних характеристик, а також лінійних розмірів та об'ємів клітин і спостереження за змінами морфологічних ознак в залежності від фази росту культур. Проаналізовано криві росту штамів, їх кінетичні характеристики, об'єми

клітин, характер розподілу вегетативних клітин та апланоспор в залежності від стадії росту культури. Встановлено, що штам IBASU-A 462 за приростом біомаси переважає відомий продуцент астаксантину штам IBASU-A 464 і довше зберігає активну вегетативну форму, продовжуючи накопичувати біомасу. Отже, його можна оцінити як перспективний штам для біотехнологічного застосування і рекомендувати проведення подальших додаткових досліджень з метою визначення оптимального терміну його культивування і забезпечення найбільшого виходу цільового продукту.

Ключові слова: *Haematococcus lacustris*, біомаса, астаксантин, штами, культивування, ростові характеристики, морфологічні ознаки.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1. 1. Астаксантин.....	7
1. 2. <i>Haematococcus lacustris</i> (Gir.-Chantr.) Rostafinski.....	9
1. 3. Культивування.....	10
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	14
2. 1. Характеристика штамів.....	14
2. 2. Умови культивування мікроводоростей.....	15
2. 3. Склад живильних середовищ:.....	15
2. 4. Дослідження морфологічних ознак штамів.....	18
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	19
3.1. Ростові характеристики штамів.....	19
3.2. Морфометричні характеристики клітин.....	22
ВИСНОВКИ.....	27
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	28

ВСТУП

На сьогодні пошук промислово перспективних видів та штамів мікроводоростей – продуцентів біомаси як сировини для одержання біологічно активних речовин є одним із напрямків біотехнології мікроводоростей, який активно розвивається. Прикладом розвитку таких підходів, які присвячені використанню біомаси мікроводоростей як джерела природних пігментів є дослідження продуктів вторинного метаболізму окремих видів зелених водоростей, зокрема кетокаротиноїду астаксантину. Актуальність проблеми обумовлена його високою біологічною активністю та широким спектром використання (аквакультура, харчова промисловість, сільське господарство, медицина, косметика тощо). Незважаючи на активне вивчення ростових та метаболічних характеристик деяких представників *Chlorophyceae*, які проводяться в Іспанії, Ізраїлі, Китаї, Японії та інших країнах світу, попит на астаксантин з природнього матеріалу (*Haematococcus lacustris* та *Xanthophyllomyces dendrorhous*) неухильно зростає, що обумовлено заборонаю ВООЗ використання синтетичних аналогів біологічно активних речовини та пігментів у виробництві харчових продуктів і кормів. За думкою низки дослідників, рішенням проблеми може бути як пошук нових високотехнологічних штамів, так і розробка методів їх культивування.

Таким чином, першочерговим завданням для отримання природньої сировини для виробництва астаксантину залишається пошук вітчизняних конкурентоздатних штамів *Haematococcus lacustris* як основного продуценту цього біологічно цінного кетокаротиноїду.

Мета: Порівняльне дослідження активності росту та біологічних особливостей двох штамів *Haematococcus lacustris* вітчизняного та відомого продуцента біомаси та астаксантину для подальшої розробки підходів їх використання у біотехнології.

Завдання:

1. Провести дослідження інтенсивності росту та біологічних особливостей вітчизняного штаму *Haematococcus lacustris* IBASU-A 462, адаптованого до кліматичних умов помірної зони з метою оцінки його біотехнологічного потенціалу.
2. Визначення кінетичних характеристик росту (питома швидкість росту та продуктивність) .
3. Визначення на основі цих параметрів придатності штаму для біотехнологічного використання у виробництві астаксантину.
4. Визначення біологічних особливостей досліджуваних штамів та їх зміни в культуральних умовах (розвиток вегетативних, утворення пальмелоїдних клітин та апланоспор).

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. 1. Астаксантин

Астаксантин – натуральний жиророзчинний пігмент насиченого червоного кольору, який відноситься до каротиноїдів (кетокаротиноїд, ксантофіл) [1].

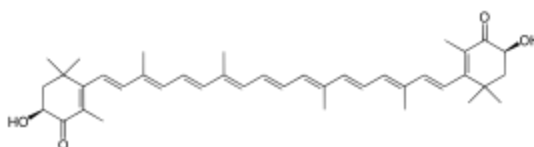


Рис. 1. 1 – Хімічна формула астаксантину.

Він використовується у харчовій промисловості, фармацевтиці і медицині [2]. Астаксантин використовується як добавка для пігментації риб та ракоподібних [3], а також було продемонстровано, що він володіє протираковою та імуномодулюючою дією [4], [5]. Крім того, цей пігмент використовується в сільському господарстві в годівлі свійської птиці для отримання більш насиченого кольору жовтка і зниження смертності курчат [6]. Як дієтична добавка, він має антивіковий, протизапальний, сонцезахисний ефект, а також позитивно впливає на імунну систему тощо [7], [2]. Найбільшою цінністю астаксантину як харчової добавки є те, що він є потужним антиоксидантом [8] [9]. Його антиоксидантна активність приблизно в 100 разів вище α -токоферолу [10]. Як сильний інгібітор перекисного окислення ліпідів він відіграє активну роль у захисті біологічних мембран від окисного пошкодження [11].

На сьогодні астаксантин синтезується хімічно або одержується з природних джерел. Значна частина комерційного астаксантину, має синтетичне походження, проте хімічно синтезований пігмент відрізняється від природного астаксантину значно меншою біологічною активністю [7]

[12]. Їх відрізняє ізомерія та хімічна структура. Синтетичний астаксантин є сумішшю трьох ізомерів, а саме (3S, 3'S), (3R, 3'S) і (3R, 3'R) у співвідношенні 1:2:1 відповідно, і не етерифікується на гідроксильні групи. Астаксантин, отриманий з мікроводоростей, має виключно (3S, 3'S) або (3R, 3'R) ізомери і переважно етерифікується жирними кислотами [1]. Більше того, той факт, що синтетичний астаксантин отримують з нафтохімічних продуктів, піднімає питання безпеки харчових продуктів. Тому дозволяється використовувати його лише в аквакультурі, він заборонений ВООЗ для споживання людиною та в якості корму для тварин, крім аквакультурного застосування. Хоча природні джерела вже давно експлуатуються для виробництва астаксантину, все ще невідомо, чи можна натуральний астаксантин виробляти за менших витрат, ніж синтетичний. Дослідження цього питання має сенс, оскільки природний астаксантин більш ніж у 50 разів сильніше абсорбує синглетний кисень і в 20 разів краще елімінує вільні радикали, ніж синтетичний астаксантин. Зокрема, було доведено, що природний астаксантин безпечний для людини і широко використовується протягом 15 років як харчова добавка, в протиположність цьому – синтетичний астаксантин ніколи не був продемонстрований як безпечний і корисний для здоров'я людини [13]. Хоча хімічний синтез може забезпечити стабільне джерело астаксантину у великих кількостях, його ефективність не така висока через вміст сполук неприродної конфігурації [14]. Крім того, все ще існують побоювання щодо його біологічних функцій та безпеки харчових продуктів [15].

Сьогоднішнім об'єктом досліджень є спроби підтвердити прогноз, що виробництво природного астаксантину може бути менш дорогим, ніж синтетичний астаксантин [16]. Такі дослідження є також інформативними для тих, хто розробляє процеси виробництва біопалива шляхом широкомасштабного культивування мікроводоростей [17].

1. 2. *Haematococcus lacustris* (Gir.-Chantr.) Rostafinski

Мікрводорості *Haematococcus lacustris* вважаються найкращим джерелом природного астаксантину [18]. За даними деяких авторів, концентрація астаксантину в біомасі *H. lacustris* перевищує значення концентрації цього пігменту в більшості досліджених мікроорганізмів, що продукують цей пігмент, наприклад у водоростях *Chlorococcum* [19] *Chlorella vulgaris* [20] та дріжджах *Xanthophylomyces dendrorhous* (anamorph: *Phaffia rhodozyma*) [21][22]. Вміст астаксантину в *H. lacustris*, який може перевищувати 4% сухої маси, є безумовно найвищим показником серед інших організмів [23].

Зелена прісноводна дводжгутикова водорість *Haematococcus lacustris* (Gir.-Chantr.) Rostafinski (= *H. pluviialis* Flotow emend. Wille) є представником родини *Haematococcaceae* (Trevis.) Marchand (відділ *Chlorophyta*, клас *Chlorophyceae*, порядок *Chlamydomonadales*). Родина *Haematococcaceae* включає одноклітинні та ценобіальні дводжгутикові водорості, які відносяться до шести родів. З них види двох родів *Haematococcus* C. Agardh emend. Flotow (одноклітинні водорості) та *Stephanosphaera* Cohn (колоніальні водорості) здатні накопичувати гематоксром червоного кольору. В Україні рід *Haematococcus* представлено двома видами: рідкісним (єдине місцезнаходження в Харківській області) *Haematococcus buetschlii* Blochm. та широко поширеним *H. lacustris*.

Морфологічні ознаки. H. lacustris. Клітини широко-еліпсоїдні, широко-яйцеподібні або кулясті. Папіла відсутня. Протопласт з численними радіальними прямими нитками, які малопомітно розгалужені на дистальному кінці. Хлоропласт чашоподібний, товстостінний, зовні гладенький з кількома латеральними піреноїдами. Стигма зазвичай бліда, еліптична, у передній півклітині. Ядро центральне. Джгутики майже рівні довжині клітини. Скоротливі вакуолі численні дифузно розсіяні. Гіпноспори кулясті, гладенькі. Нестатеве розмноження 2-4-8 зооспорами та апланоспорами.

Статевий процес ізогамний. Гамети маленькі по 16-32 у гаметангії. Зиготи товстостінні, гладенькі. Монадні клітини легко переходять у нерухомий стан. Розміри клітини – 63 мкм завдовжки та 51 мкм завширшки, апланоспори – 30-50 мкм діаметром [24].

Місцезростання. Зростає у планктоні та бентосі, зазвичай у дощових ефемерних водоймах, де викликає червоне «цвітіння» води, рідше в інших водоймах (ставках, невеликих стоячих водоймах, болотах); іноді в ґрунтах [25].

Поширення. В Україні *H. lacustris* відомий з Київської, Чернігівської, Тернопільської, Харківської, Дніпропетровської та Миколаївської областей. Субкосмополіт, але зустрічається нечасто [24].

1. 3. Культивування

У промислових масштабах мікродорості культивуються в умовах відкритих водойм або замкнутих систем (фотобіореакторах).

Однак через повільний ріст, схильність до забруднення та перевагу низькій температурі [26], вирощування *H. lacustris* у відкритому ґрунті загалом виявилось невдалим. Це призводить до необхідності культивування в біореакторах, що дає ряд переваг: кращий контроль середовища, захист від зовнішнього забруднення та досягнення високої щільності клітин. Численні дослідження були проведені з метою вивчення культивування *H. lacustris* в колбах у контрольованому середовищі [27] [28] [29] [30].

В оптимальних умовах вегетативні клітини *H. lacustris* мають зелене забарвлення. У стресових станах, які перешкоджають поділу клітин мікродоростей, накопичують вторинні каротиноїди (в основному атаксантин та його ефіри) [31]. Ці сполуки, що існують у низькій концентрації в клітинах, що ростуть у сприятливих умовах, необхідні для

протидії або пристосування до біотичних або абіотичних стресів навколишнього середовища, таких як солоність, нестача поживних речовин, вплив надмірної інтенсивності освітлення, посуха тощо [23]. При культивуванні для продукції астаксантину забезпечують умови дефіциту азоту в поєднанні з впливом інтенсивного освітлення. [32]. Астаксантин накопичується поза хлоропластом у ліпідних вакуолях в процесі трансформації зелених рухливих вегетативних клітин на стадії апланоспори [33]. Одна з основних проблем, яка постала перед науковцями для масового виробництва астаксантину з *H. lacustris*, було створення умов стійкого виробництва вегетативних клітин. Була проведена розробка відповідного середовища для культивації для досягнення високої кількості вегетативних клітин, оскільки зі стандартними середовищами для прісноводних мікроводоростей або ціанобактерій такого ефекту досягнути неможливо [34].

Доведено, що накопичення вторинних каротиноїдів супроводжується збільшенням продуктивності фотосинтезу, вираженої на одиницю хлорофілу. Тобто, чим більше стає хлорофілу, тим більше продукується астаксантину [32].

Ефективне виробництво астаксантину *H. lacustris* є складним через низьку швидкість росту клітин, чутливість клітин до високого гідродинамічного стресу та зміни морфології клітин у різних умовах навколишнього середовища. За хороших умов зростання більшість клітин залишається у вегетативному стані утворюють (зооспори) і накопичують мало або зовсім не накопичують астаксантин. Проте в умовах стресу клітини перетворюються на товстостінні нерухомі спори (цисту) і при правильному освітленні накопичують високі концентрації астаксантину. Таким чином, оптимальні умови для вегетативного росту клітин відрізняються від тих, за яких синтезується астаксантин. Тому для отримання досить високої концентрації клітин з високим вмістом астаксантину необхідно відокремити фазу росту клітин від фази виробництва астаксантину. Дуже важко отримати високу концентрацію клітин під час фотоавтотрофного культивування,

оскільки клітини не можуть довго підтримуватися у вегетативній формі за умов інтенсивного освітлення. Хоча клітини цисти можуть рости за рахунок збільшення розміру, швидкість їх поділу клітин дуже низька, тому після того, як клітини інцистуються, стає дуже важко збільшити кількість клітин [30].

В результаті досліджень було виявлено, що прісноводна зелена водорість *H. lacustris* найкраще росте при високих концентраціях нітратів (приблизно від 0,5 до 1,0 г l⁻¹ KNO₃), проміжних концентраціях фосфатів (близько 0,1 г l⁻¹ K₂HPO₄) і в широкому діапазоні концентрацій Fe. Низький вміст нітратів або високий вміст фосфатів викликають утворення червонуватих пальмелоїдних клітин та апланоспор. Міксотрофний ріст з ацетатом покращує швидкість росту та кінцевий вихід клітин, а також стимулює утворення пальмелоїдних клітин та апланоспор, що містять астаксантин. *H. lacustris* не може рости при температурі вище 28 °С, якщо рівень солоності становить приблизно 1 ‰ (мас./об.) NaCl. Підвищення температури або додавання NaCl також стимулює утворення пальмелоїдних клітин та апланоспор [35]. Було доведено, що сірчане голодування призводить до масового накопичення цього комерційно важливого каротиноїду [36].

Показано, що *H. lacustris* здатний рости та утворювати астаксантин як у гетеротрофних (ацетат + темні умови), так і в автотрофних умовах, а також фотосинтетичний механізм та окисна асиміляція ацетату можуть діяти в міксотрофних умовах. Зелена водорість *H. lacustris* здатна рости гетеротрофно на ацетаті в темряві, а також міксотрофно на ацетаті та світлі. Фотосинтезуючі пігменти хлорофіл і астаксантин утворюються навіть в гетеротрофних умовах. Питома швидкість росту в міксотрофних умовах (ацетат + світло) відповідає швидкостям росту в гетеротрофних (ацетат + темрява) та автотрофних (без ацетату + світло) умовах [37].

На сьогоднішній день двоетапна система культивування використовується в успішній стратегії комерційного виробництва *H. lacustris*: зелена стадія для росту клітин і стадія індукції для накопичення астаксантину

[38], [28]. На зеленій стадії, ріст клітин швидкий, але вміст астаксантину низький. Однак на стадії індукції клітини ростуть повільно, але можуть швидко накопичувати астаксантин. Отже, *H. lacustris* культивується для отримання достатньої щільності клітин на зеленій стадії, а потім індукується збільшення вмісту астаксантину на стадії індукції шляхом зміни умов культивування. Отже, індукція *H. lacustris* має пряму кореляцію з вмістом астаксантину клітин і загальну продуктивність астаксантину [39]. Зміни біомаси водоростей та клітинних компонентів під час циклу світло-темрява відрізняються від змін у клітинах, культивованих при постійному освітленні [40]. Втрата біомаси вночі, а також зміна вмісту астаксантину в темний період можуть вплинути на продуктивність астаксантину. Під час вирощування *H. lacustris* температура є одним важливим і основним фактором, що впливає на концентрацію біомаси та вміст астаксантину через сезонні та добові коливання [35], [41], [42], [43].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктами досліджень слугували альгологічно чисті культури двох штамів *Haematococcus lacustris*: 462 та 464 із колекції культур мікроводоростей Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного України (IBASU-A).

2. 1. Характеристика штамів

Вітчизняний штам IBASU-A 462 ізольовано капілярним методом у 2011 р. із проби, зібраної на території Інституту ботаніки НАНУ (м. Київ) як збудник «цвітіння» води. Акліматизований до клімату помірної зони. Мезофіл, міксотроф. Штам IBASU-A 464, відомий як продуцент біомаси, одержано з Інституту біології південних морів НАНУ у 2004 р. Мезофіл, міксотроф. Продуцент астаксантину [44]. У колекції IBASU-A вид *H. lacustris* представлено ще двома штамми – IBASU-A 219 та IBASU-A 461, але за даними попередніх досліджень [45], їх ріст і розвиток виявився залежним від температурного фактору і пригнічувався при зростанні температури до 25°C. Слід відмітити також, що вітчизняний штам був ізольований капілярним методом [46], При капілярному методі ізолюють поодинокі клітини, колонії або нитки за допомогою стерильної піпетки Пастера з тонко відтягнутим довгим кінцем під біокулярною лупою або при малих збільшеннях мікроскопа. Водорості, ізолювані завдяки тиску в капілярі, послідовно переносять з однієї краплі стерильного поживного розчину в іншу, поки в краплі не залишиться потрібна водорість без сторонніх домішок, що дозволяє отримати клонові культури [47].

При проведенні досліджень проводили перевірку чистоти введених у культуру водоростей. Здійснювали на початку і вкінці досліду за допомогою

світлового мікроскопу та висівами на живильне середовище ФДГА, що містить глюкозу та дріжджовий автолізат і сприяє виявленню гетеротрофної контамінації (грибів та бактерій), а також здатності водоростей до міксотрофного росту.

2. 2. Умови культивування мікроводоростей

Для оцінки активності росту досліджуваних штамів проводили інтенсивне культивування водоростей у накопичувальному режимі протягом 10 діб. Водорості вирощували на середовищі Болда (3N BBM) у конічних колбах об'ємом 1000 мл на люміностаті з чергуванням світлової та темної фази 15:9 та освітленням лампами ЛБ-40 (освітленості 1.5-2 тис. лк) за температури (20-28 °С) та постійним барботуванням повітряною сумішшю. Об'єм середовища – 200 мл. Товщину шару суспензії постійно підтримували на рівні 3 см. У якості інокулята використовували 7- добові культури, які після пророщування апланоспор містили тільки монадні (рухливі) клітини. Їх центрифугували протягом 10 хв при 3000 об./хв для одержання вихідної кількості 550-600 тис. кл. в мл. Кожний штам культивували в трьох повторях. На початку та наприкінці експериментів проводили перевірку чистоти культури шляхом висіву проб на ФДГА – агаризоване середовище з органічними добавками.

2. 3. Склад живильних середовищ:

ФДГА:

KNO_3 – 1440 мг/л

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 100 мг/л

K_2HPO_4 – 160 мг/л

$CaCl_2$ – 20 мг/л

$Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ – 0,02 мг/л

$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ – 0,01 мг/л

$Zn_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,04 мг/л

H_3BO_3 – 1,4 мг/л

$(NH_4)_2MoO_4$ – 0,5 мг/л

агар – 20 г/л .

Болда (1N BBM) та Болда (3N BBM):

$NaNO_3$ – 250/750 мг/л

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 75 мг/л

$NaCl$ – 25 мг/л

$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ – 25 мг/л

KH_2PO_4 – 175 мг/л

K_2HPO_4 – 75 мг/л

$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 2,5 мг/л

мікроелементи – 10 мл .

Розчин мікроелементів:

H_3BO_3 – 2,86 мг/л

$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ – 1,81 мг/л

$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,22 мг/л

$Co(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$ – 0,15 мг/л

NH_4VO_3 – 2,3 мг/л

$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ – 0,01 мг/л [44].

Інтенсивність росту водоростей оцінювали шляхом щодобового підрахунку кількості клітин у камері Горяєва, а також за зміною вмісту абсолютно сухої біомаси у певному об'ємі культуральної рідини. Для цього 100 мл суспензії водоростей фільтрували через зважені та доведені до постійної ваги фільтри № 4 за допомогою фільтру Зейца з послідуочим їх висушуванням при температурі 60-80 С [46].

Питому швидкість росту культури водоростей у зоні експоненціальної фази встановлювали за формулою (2.1):

$$\mu = \mu_m; \quad \mu_m = \frac{\ln n - \ln n_{ln}}{t - t_{ln}} \quad (2.1)$$

де n та n_{ln} – концентрація клітин водоростей в момент часу t .

Для визначення лінійного росту культури користувалися формулою (2.2.):

$$\mu = \frac{P_m}{B} \quad (2.2)$$

де P_m – продуктивність культури; B – концентрація клітин.

Для визначення росту культури на фазі уповільненого росту користувалися формулою (2.3):

$$\mu = \frac{P_m}{B} \times \frac{B_m - B}{B_m - B^l} \quad (2.3)$$

де B_m – максимальна щільність культури; B^l – щільність культури в кінці фази лінійного росту.

Продуктивність культури визначали за формулами:

– на фазі логарифмічного росту за формулою (2.4):

$$P = \mu_t \times n_t \quad (2.4)$$

де μ_t – питома швидкість росту; n_t – середня концентрація клітин в момент t .

– на фазі лінійного росту за формулою (2.5):

$$P = P_m; \quad P_m = \frac{B - B_l}{t - t_l} \quad (2.5)$$

– на фазі уповільненого росту за формулою (2.6):

$$P = \mu_r \times (B_m - B); \quad \mu_r = \frac{P_m}{B_m - B^l} \quad (2.6)$$

2. 4. Дослідження морфологічних ознак штамів

Лінійні розміри клітин *H. lacustris* визначали за допомогою мікроскопа Olympus BX-53 (об'єктив $\times 40$, окуляр $\times 10$) і цифрової камери Olympus LC-30, програмне забезпечення CellSens Entry. Клітини фотографували на різних стадіях росту культури. Лінійні розміри клітин визначали на живому матеріалі, попередньо знерухомленому розчином Люголя.

Об'єми клітин обчислювали за формулою: $V = 0,5236 \cdot D^2 \cdot H$, де V – об'єм, мкм^3 ; D , H – довжина і ширина клітин (мкм) відповідно [48]. Численність вибірок (n) для визначення характеру розподілу клітин у культурі по об'єму і співвідношенню H/D складала 100 клітин.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Ростові характеристики штамів

Проведено експериментальні дослідження активності росту та визначені кінетичні характеристики (питома швидкість росту та продуктивність) і біологічні особливості штамів *Haematococcus lacustris* для оцінки їхньої біотехнологічної придатності. Відбір перспективних штамів продуцентів біомаси проводили за такими критеріями як інтенсивність росту водоростей, їх стійкість до бактеріальної контамінації та здатність до різних умов культивування. Визначено їхній характер росту та продуктивність за однотипними умовами культивування в інтенсивному режимі (оптимальний мінеральний склад та рН середовища, температура, освітленість, перемішування тощо).

За результатами даних щоденного підрахунку кількості клітин, було побудовано криві росту штамів (Рис. 3.1-3.2). В розвитку обох штамів спостерігається диференціація типових фаз росту.

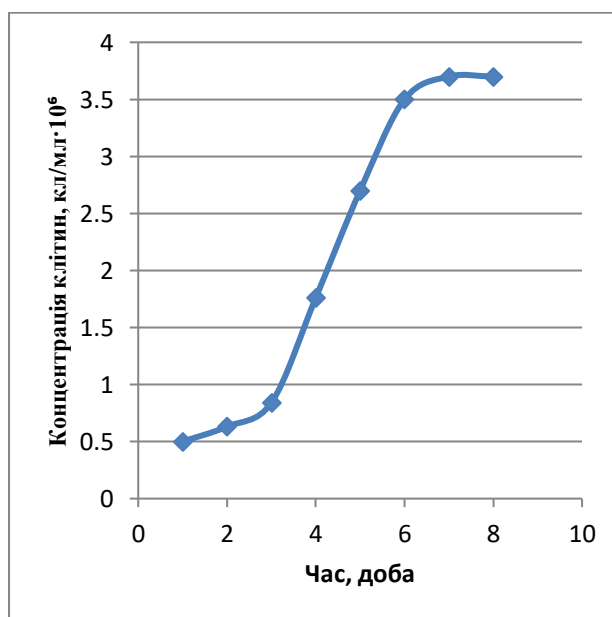


Рис. 3.1 – Крива росту штаму *Haematococcus lacustris* IBASU-A 462

Обидва з них мали типовий S-подібний вигляд, і протягом 8 діб пройшли такі фази росту: початкову, або лаг-фазу, логарифмічну, лінійну, фазу уповільненого росту.

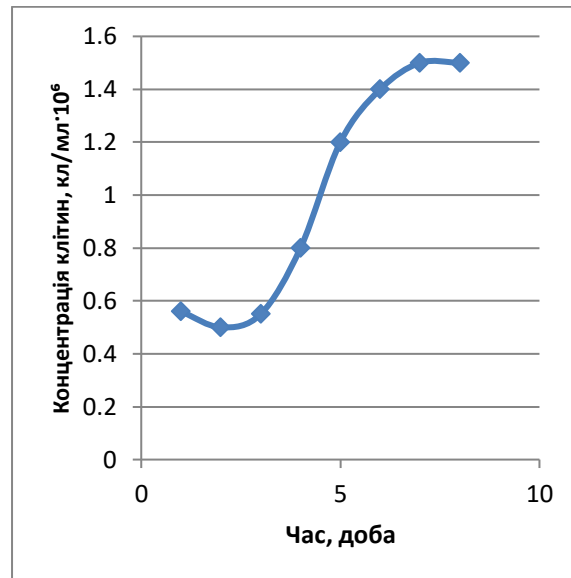


Рис. 3.2 – Крива росту штаму *Haematococcus lacustris* IBASU-A 464

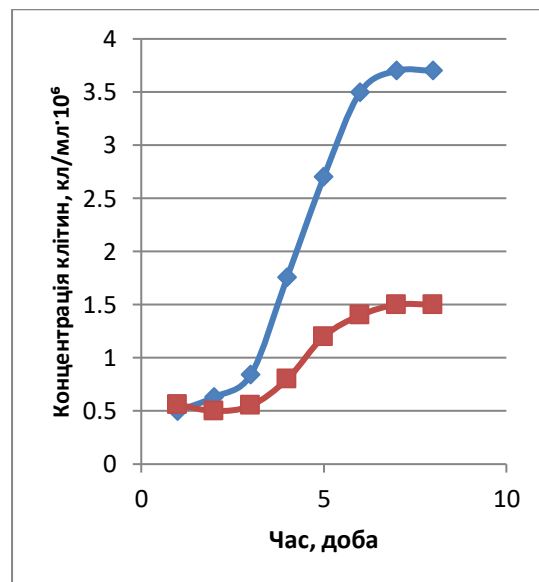


Рис. 3.3 – Криві росту штамів *Haematococcus lacustris* IBASU-A 462 та IBASU-A 464

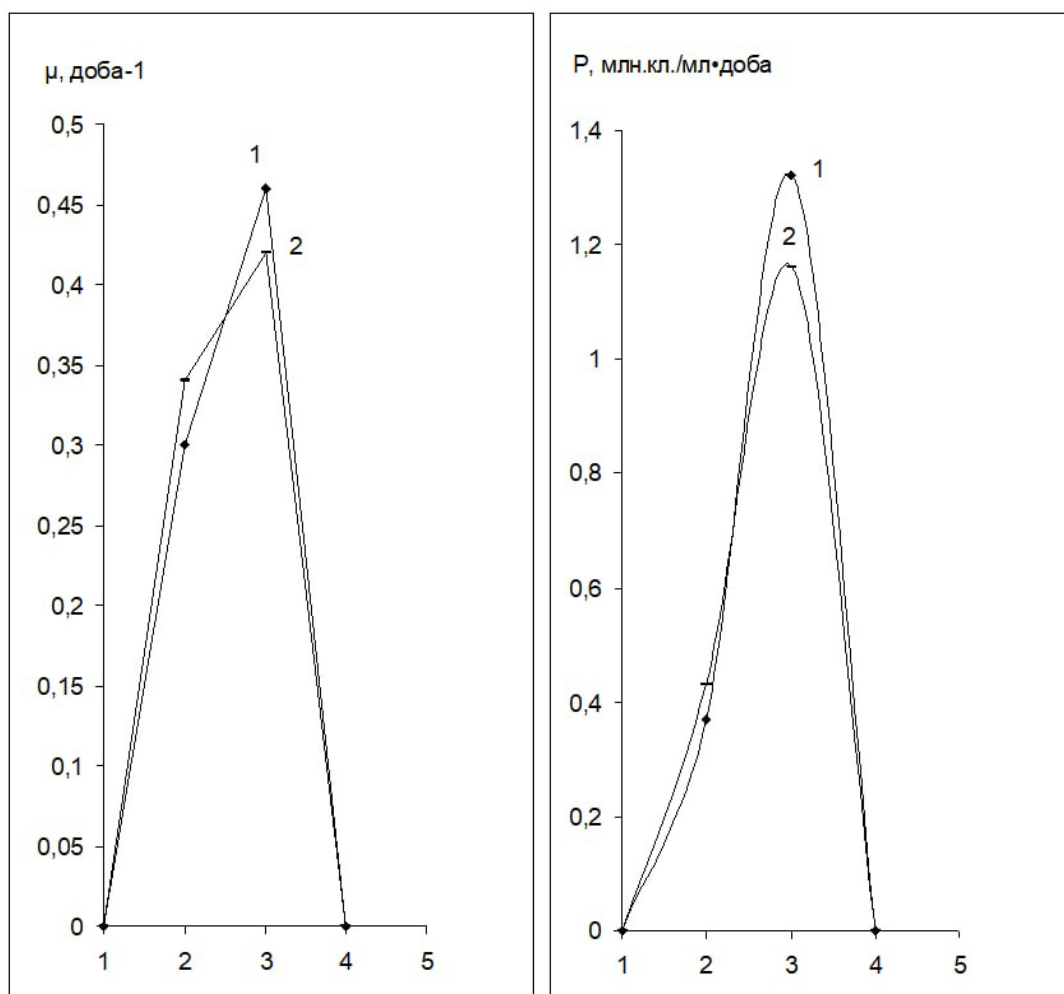


Рис. 3.4 – Ростові характеристики культур *Haematococcus lacustris*: а – питома швидкість росту (μ), б – продуктивність (P), 1 – IBASU-A 462, 2 – IBASU-A 464

Як видно з рисунку, в цілому ростова активність обох досліджуваних нами штамів *H. lacustris*: колекційного відомого продуцента IBASU-464 та вітчизняного IBASU-A 462 є дуже близькою. Лаг-фаза продовжується не більше двох діб, після чого ріст культур переходить в фазу активного росту. Питома швидкість росту становить відповідно 0,38-0,42 доби⁻¹, продуктивність – 0,14-0,16·10⁶ мл⁻¹·доби⁻¹. Максимальна кількість клітин досягає 0,48-0,5·10⁶ мл⁻¹. з урахуванням початкової кількості клітин 0, 55-0, 56·10⁶ мл⁻¹.

Слід відмітити, що в наших дослідах за умов стерильного культивування наявність або відсутність супутніх мікроорганізмів суттєво не

впливає на ростові параметри досліджуваних водоростей. Культури усіх досліджуваних штамів водоростей за умов інтенсивного культивування відзначаються слабким піноутворенням.

3.2. Морфометричні характеристики клітин

Обидва з досліджених штамів мають монадні клітини кулястої або еліпсоїдної форми. Співвідношення клітин різної форми в культурах залежить від їх віку і природи штамів. При старінні клітини округлювались та збільшувались в об'ємі. У штама 462 в період активного росту переважали видовжені монадні клітини (Рис. 3.5).

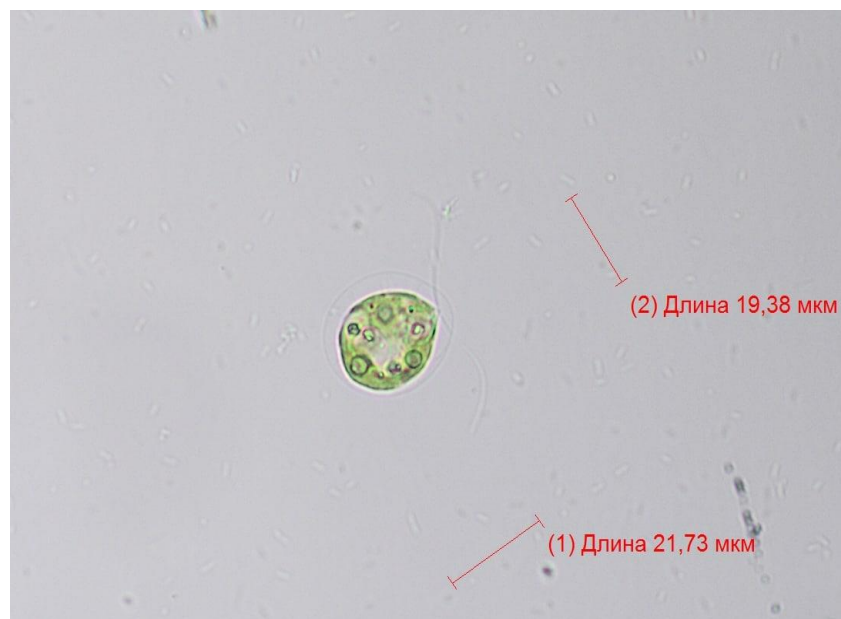


Рис. 3.5 – Монадна клітина штаму *H. lacustris* IBASU-A 462

В перший день їх середній об'єм складав $3,9 \cdot 10^3$ мкм³. Відсоток таких клітин в період лаг-фази складав близько 97%. В період уповільненого росту на 6-8 добу розмір монадних клітин збільшився близько втричі, складаючи $10,4 \cdot 10^3$ мкм³. При цьому, їх відсоток зменшився до 21%. Проте клітини штаму 464 навпаки мали форму, ближче до кулястої. Об'єм монадних клітин

цього штаму під час лаг-фази складав $1,4 \cdot 10^3$ мкм³. До того ж, відсоток цього виду клітин на стадії лаг-фази складав 75%. На 4 добу спостерігалась адгезія клітин. Це свідчить про те, що вже тоді близько 25% клітин перейшли в нерухомий стан. Вже на 4 день в період лінійної фази спостерігалась наявність пальмелоїдних клітин (Рис. 3.6).

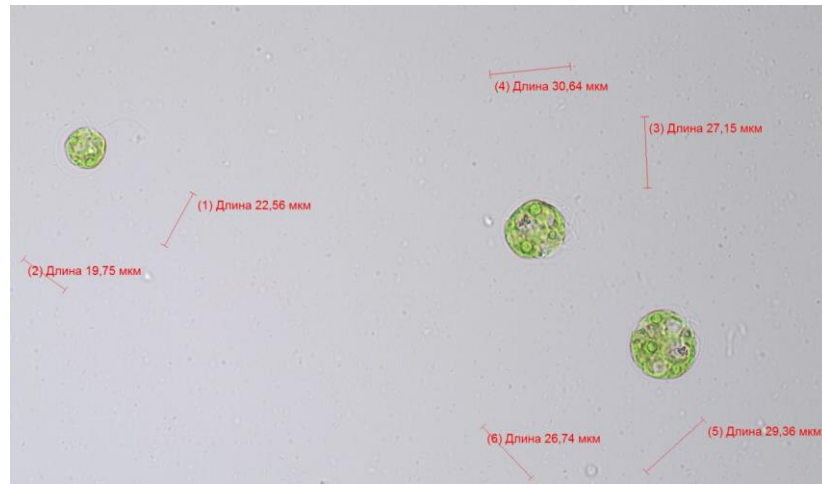


Рис. 3.6 – Пальмелоїдна клітина штаму *H. lacustris* IBASU-A 462

Ці клітини округлювались, втрачали джгутики, починали нарощувати оболонку, проте були ще зеленого кольору. У штаму 462 в цей період було близько 30% клітин такого типу. Їх об'єм складав $4,4 \cdot 10^3$ мкм³. При настанні фази уповільненого росту, спостерігалось їх збільшення до $18 \cdot 10^3$ мкм³, при тому відсоток їх залишився незмінним. У штаму 464 в період лінійної фази спостерігався значно більший розмір пальмелоїдних клітин, який складав $12 \cdot 10^3$ мкм³, але при тому менший відсоток – 15%. Це пов'язано з тим, що для цього штаму характерний швидший перехід клітин на стадію апланоспор. Апланоспори почали утворюватись в період лаг-фази у штаму 462. Вони відзначалися дуже великими об'ємами – $43 \cdot 10^3$ мкм³ при тому, що відсоток їх у цей період складав 3%. В період фази уповільненого росту цей відсоток виріс до 49%, а об'єм становив $11 \cdot 10^3$ мкм³. Вони здебільшого були вже з товстою оболонкою, проте ще не почали набувати червоного відтінку (Рис. 3.7).

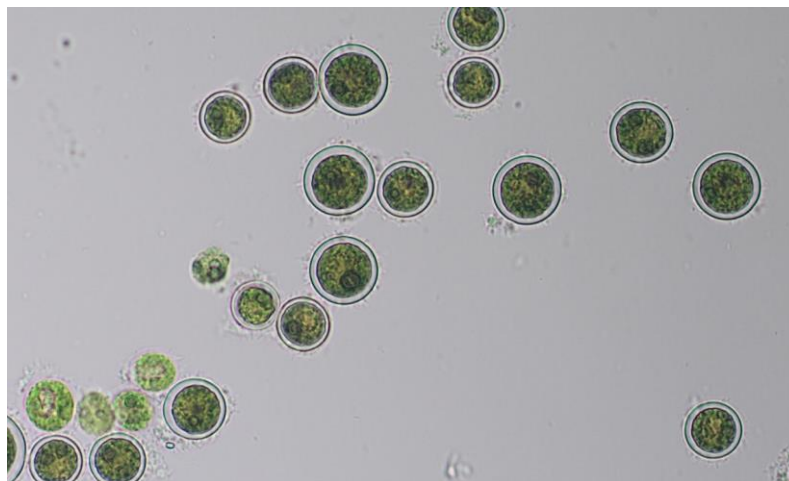


Рис 3.7 – Зелені апланоспори штаму *H. lacustris* IBASU-A 462

Отримання такого результату може бути пов'язане не зі зменшенням об'єму, а з тим, що в період лаг-фази вибірка була дуже малою через низький відсоток кількості апланоспор. У штаму 464 в період лаг-фази апланоспори склали 25% від усіх клітин. Їх об'єм складав $3,7 \cdot 10^3$ мкм³. При настанні фази уповільненого росту спостерігалось 99% апланоспор, при тому, майже всі з них набували багряного кольору зсередини клітини (Рис. 3.8).

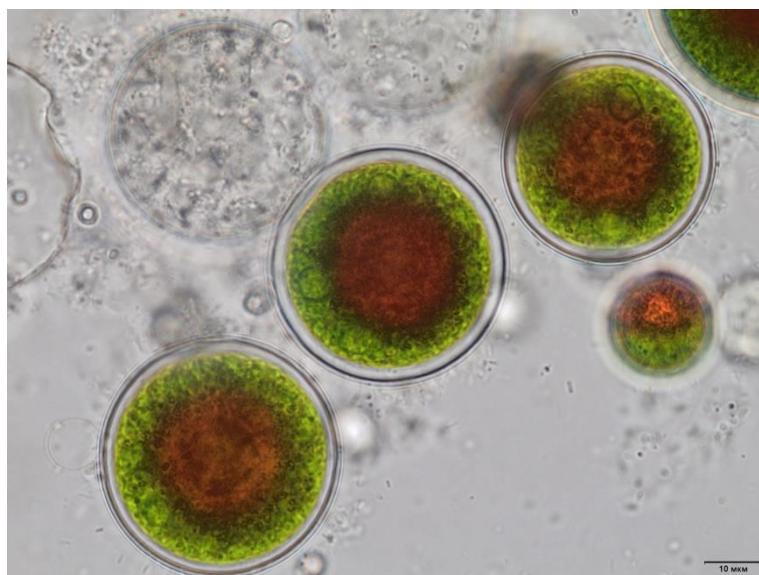


Рис. 3.8 – Червоніючі планоспори штаму *H. lacustris* IBASU-A 464

Об'єм таких клітин склав $12 \cdot 10^3$ мкм³, що дещо перевищує показник штаму 462 (Рис. 3.9-3.11). Отже, морфологічні знаки при розвитку штамів 462 та 464 дещо відрізнялися, проте в обох спостерігалась тенденція до

переходу в стадію апланоспор з подальшим накопиченням астаксантину. Це співпадає з результатами інших авторів, які вказують, що це пов'язано з швидким зменшенням кількості біогенних елементів у поживному середовищі у накопичувальних культурах протягом перших діб. Зокрема, концентрація азоту під час культивування *H. pluvialis* через дві доби вирощування знижується на 40-46 %, а фосфору – на 76-82 %, що приводить до різкого зменшення темпів росту при подальшому відносно стабільному вмісту цих біогенних елементів у живильному середовищі [49].

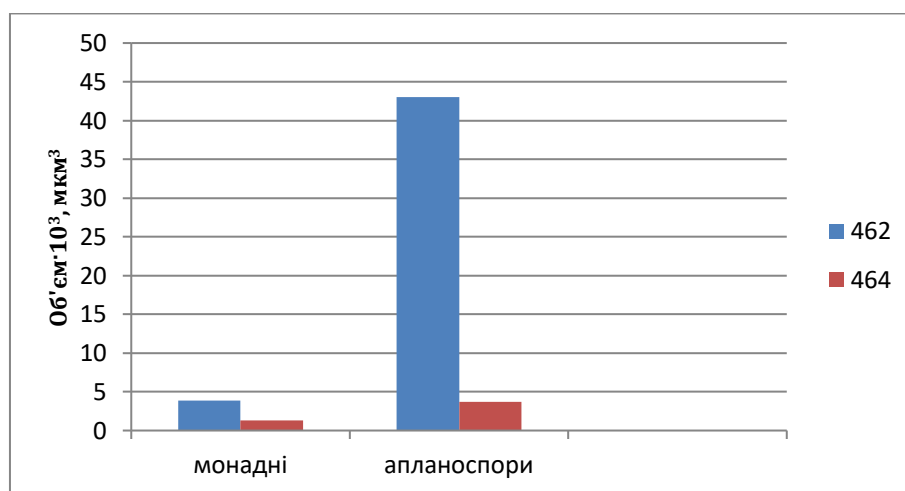


Рис. 3.9 – Порівняння об'ємів клітин штамів *H. lacustris* IBASU-A 462 та IBASU-A 464 у період лаг-фази.

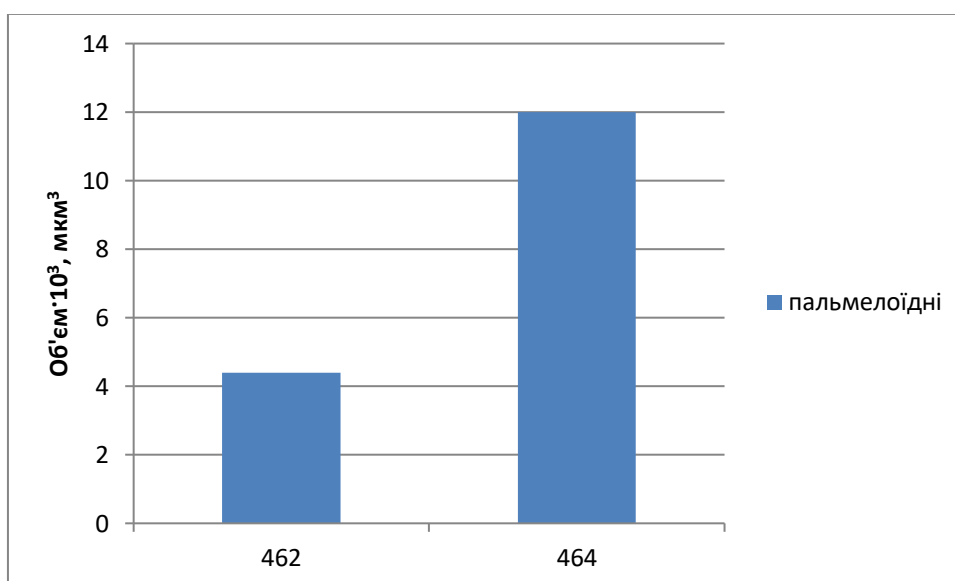


Рис. 3.10 – Порівняння об'ємів пальмелоїдних клітин штамів *H. lacustris* IBASU-A 462 та IBASU-A 464 у період лінійної фази росту

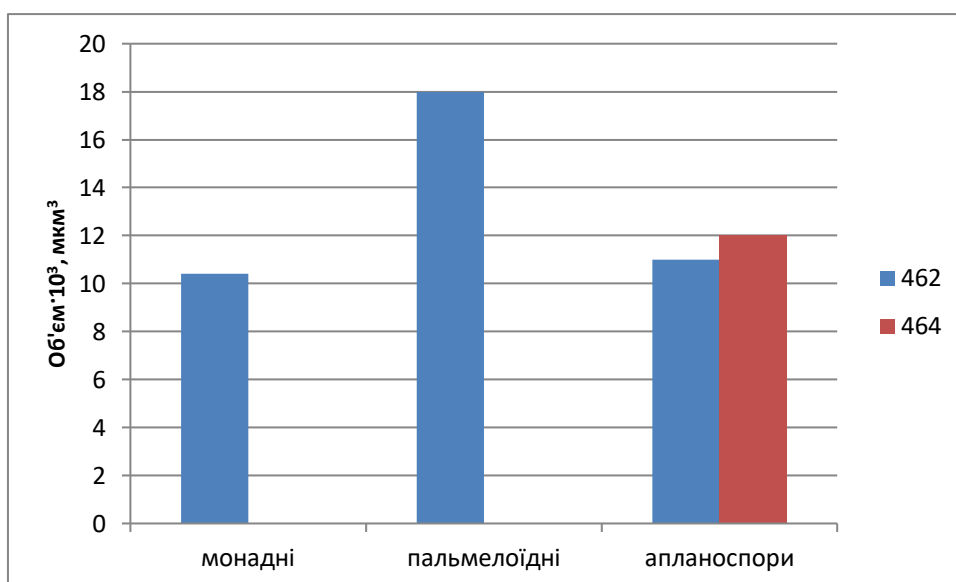


Рис. 3.11 – Порівняння об'ємів клітин штамів *H. lacustris* IBASU-A 462 та IBASU-A 464 у період уповільненої фази росту

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що активний ріст вітчизняного штаму *Haematococcus lacustris* IBASU-A 462 співставний з інтенсивністю росту відомого продуцента.

2. Визначено характер його росту та кінетичні характеристики (питома швидкість та продуктивність) у порівнянні з відомим продуцентом біомаси *H. lacustris* IBASU-A 464. Ріст характеризується наступними параметрами: максимальна кількість клітин досягає $0,48-0,5 \cdot 10^6$ мл^{-1} . з урахуванням початкової кількості клітин $0,55-0,56 \cdot 10^6$ мл^{-1} , питома швидкість росту – $0,38-0,42$ доби⁻¹, продуктивність – $0,14-0,16 \cdot 10^6$ $\text{мл}^{-1} \cdot \text{доби}^{-1}$.

3. Результати дослідження цих параметрів дозволяють розглядати його як перспективний продуцент біомаси як сировини для виробництва астаксантину.

4. Аналіз морфологічних ознак свідчить про те, що штам 462 як продуцент біомаси дещо переважає активність зразкового штаму. Тим не менш, він довше зберігає монадну форму і продовжує накопичувати біомасу, що свідчить про необхідність проведення додаткових досліджень для визначення оптимального терміну його вирощування для забезпечення найбільшого виходу цільового продукту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea, “Astaxanthin: A review of its chemistry and applications,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 46, no. 2, 2006. doi: 10.1080/10408690590957188.
- [2] R. T. Lorenz and G. R. Cysewski, “Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin,” *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 160–167, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01433-5).
- [3] E. A. Johnson and G. H. An, “Astaxanthin from microbial sources,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 11, no. 4, 1991, doi: 10.3109/07388559109040622.
- [4] Y. Tomita, R. J. Hill, and R. A. Good, “Studies of Immunomodulating Actions of Carotenoids. I. Effects of β -Carotene and Astaxanthin on Murine Lymphocyte Functions and Cell Surface Marker Expression in In Vitro Culture System,” *Nutr. Cancer*, vol. 16, no. 2, 1991, doi: 10.1080/01635589109514148.
- [5] T. Tanaka, H. Makita, M. Ohnishi, H. Mori, K. Satoh, and A. Hara, “Chemoprevention of Rat Oral Carcinogenesis by Naturally Occurring Xanthophylls, Astaxanthin and Canthaxanthin,” *Cancer Res.*, vol. 55, no. 18, 1995.
- [6] S. M. Lawlor and N. M. O’Brien, “Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts,” *Nutr. Res.*, vol. 15, no. 11, 1995, doi: 10.1016/0271-5317(95)02040-9.
- [7] M. Guerin, M. E. Huntley, and M. Olaizola, “*Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition,” *Trends in Biotechnology*, vol. 21, no. 5, 2003. doi: 10.1016/S0167-7799(03)00078-7.
- [8] J. Terao, “Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution,”

- Lipids*, vol. 24, no. 7, 1989, doi: 10.1007/BF02535085.
- [9] K. Nakagawa, S. Do Kang, D. K. Park, G. J. Handelman, and T. Miyazawa, "Inhibition by β -carotene and astaxanthin of NADPH-dependent microsomal phospholipid peroxidation," *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 43, no. 3, 1997, doi: 10.3177/jnsv.43.345.
- [10] W. Miki, "Biological functions and activities of animal carotenoids," *Pure Appl. Chem.*, vol. 63, no. 1, 1991, doi: 10.1351/pac199163010141.
- [11] P. Palozza and N. I. Krinsky, "Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 297, no. 2, 1992, doi: 10.1016/0003-9861(92)90675-M.
- [12] J. P. Yuan and F. Chen, "Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection," *Biotechnol. Tech.*, vol. 11, no. 7, 1997, doi: 10.1023/A:1018441411746.
- [13] B. Capelli, D. Bagchi, and G. R. Cysewski, "Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement," *Nutrafoods*, vol. 12, no. 4, 2013, doi: 10.1007/s13749-013-0051-5.
- [14] X. Gong and F. Chen, "Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*," in *Journal of Applied Phycology*, 1997, vol. 9, no. 5. doi: 10.1023/A:1007944922264.
- [15] R. Newsome, "Food colors. Food Technology," *Food Technol.*, vol. 40, pp. 49–56, 1986.
- [16] J. Li, D. Zhu, J. Niu, S. Shen, and G. Wang, "An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*," *Biotechnology Advances*, vol. 29, no. 6. 2011. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.04.001.
- [17] E. Stephens *et al.*, "An economic and technical evaluation of microalgal biofuels," *Nature Biotechnology*, vol. 28, no. 2. 2010. doi: 10.1038/nbt0210-126.
- [18] P. Z. Margalith, "Production of ketocarotenoids by microalgae," *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, no. 4. 1999. doi: 10.1007/s002530051413.
- [19] D. H. Zhang and Y. K. Lee, “Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of the green alga, *Chlorococcum* sp.,” in *Journal of Applied Phycology*, 1997, vol. 9, no. 5. doi: 10.1023/A:1007902103419.
- [20] L. Gouveia, G. Choubert, E. Gomes, P. Rema, and J. Empis, “Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for rainbow trout: Effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and retention in the muscle tissue,” *Aquac. Int.*, vol. 6, no. 4, 1998, doi: 10.1023/A:1009251714573.
- [21] L. M. Ducrey Sanpietro and M. R. Kula, “Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of inhibitors and low temperature,” *Yeast*, vol. 14, no. 11, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199808)14:11<1007::AID-YEA307>3.0.CO;2-U.
- [22] E. A. Johnson and W. A. Schroeder, “Biotechnology of Astaxanthin Production in *Phaffia rhodozyma*,” *ACS Symp. Ser.*, vol. 637, 1996, doi: 10.1021/bk-1996-0637.ch004.
- [23] S. Boussiba, “Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response,” *Physiologia Plantarum*, vol. 108, no. 2. 2000. doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x.
- [24] G. Lilitska, *Identification manual of phytomonads algae of Ukraine*. Kyiv, 2019.
- [25] A. Topachevskyi and N. Massjuk, *Freshwater algae of Ukrainian SSR*. Kyiv: Vyscha shkola, 1984.
- [26] M. Marker, A. J. Tsavalos, and A. J. Young, “Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor,” *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 82, no. 2, 1996, doi: 10.1016/0922-338X(96)85031-8.
- [27] U. Tripathi, S. Ramachandra Rao, and G. A. Ravishankar, “Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor metabolites in cultures of *Haematococcus pluvialis*,” *Process Biochem.*, vol.

- 38, no. 3, 2002, doi: 10.1016/S0032-9592(02)00135-8.
- [28] R. Sarada, U. Tripathi, and G. A. Ravishankar, "Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions," *Process Biochem.*, vol. 37, no. 6, 2002, doi: 10.1016/S0032-9592(01)00246-1.
- [29] M. Kobayashi, T. Kakizono, and S. Nagai, "Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 71, no. 5, 1991, doi: 10.1016/0922-338X(91)90346-I.
- [30] N. Hata, J. C. Ogbonna, Y. Hasegawa, H. Taroda, and H. Tanaka, "Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture," *J. Appl. Phycol.*, vol. 13, no. 5, 2001, doi: 10.1023/A:1011921329568.
- [31] J. Zhao, L. C. Davis, and R. Verpoorte, "Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites," *Biotechnology Advances*, vol. 23, no. 4, 2005. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003.
- [32] C. Hagen, K. Grünewald, S. Schmidt, and J. Müller, "Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *haematococcus pluvialis* (chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis," *Eur. J. Phycol.*, vol. 35, no. 1, 2000, doi: 10.1080/09670260010001735651.
- [33] M. F. Santos and J. F. Mesquita, "Ultrastructural Study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis," *Cytologia (Tokyo)*, vol. 49, no. 1, 1984, doi: 10.1508/cytologia.49.215.
- [34] J. Fábregas, A. Domínguez, M. Regueiro, A. Maseda, and A. Otero, "Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 53, no. 5, 2000, doi: 10.1007/s002530051652.
- [35] M. A. Borowitzka, J. M. Huisman, and A. Osborn, "Culture of the

- astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 3, no. 4, 1991, doi: 10.1007/bf00026091.
- [36] P. He, J. Duncan, and J. Barber, “Astaxanthin accumulation in the green alga *haematococcus pluvialis*: Effects of cultivation parameters,” *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 49, no. 4, 2007, doi: 10.1111/j.1744-7909.2007.00468.x.
- [37] M. Kobayashi, T. Kakizono, K. Yamaguchi, N. Nishio, and S. Nagai, “Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions,” *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 74, no. 1, 1992, doi: 10.1016/0922-338X(92)90261-R.
- [38] C. Aflalo, Y. Meshulam, A. Zarka, and S. Boussiba, “On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98, no. 1, 2007, doi: 10.1002/bit.21391.
- [39] M. Wan *et al.*, “The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation,” *Bioresour. Technol.*, vol. 167, 2014, doi: 10.1016/j.biortech.2014.06.030.
- [40] F. Han, W. Wang, Y. Li, G. Shen, M. Wan, and J. Wang, “Changes of biomass, Lipid content and fatty acids composition under a light-dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature,” *Bioresour. Technol.*, vol. 132, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.175.
- [41] L. Fan, A. Vonshak, and S. Boussiba, “EFFECT OF TEMPERATURE AND IRRADIANCE ON GROWTH OF HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS (CHLOROPHYCEAE),” *J. Phycol.*, vol. 30, no. 5, 1994, doi: 10.1111/j.0022-3646.1994.00829.x.
- [42] M. Harker, A. J. Tsavalos, and A. J. Young, “Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 7, no. 4, 1995, doi: 10.1007/BF00003797.
- [43] U. Tripathi, R. Sarada, and G. A. Ravishankar, “Effect of culture conditions

- on growth of green alga - *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production,” *Acta Physiol. Plant.*, vol. 24, no. 3, 2002, doi: 10.1007/s11738-002-0058-9.
- [44] O. Borysova, P. Tsarenko, and M. Konishchuk, “Microalgae culture collection IBASU-A.” Kyiv, 2014.
- [45] Kostenko D.I. and Konishchuk M.O., “A growth pattern of the *Haematococcus pluvialis* Flotow strains from IBASU-A collection – producers of astaxanthinентів атаксантину,” 2019.
- [46] Topachevskiy A. V., *Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice*. Kyiv: Naukova dumka, 1975.
- [47] R. A. Andersen, *Algal culturing techniques*, vol. 1, no. 1. 2018.
- [48] Курилов А. В. and Брянцева Ю.В., “Розрахунок об’ємів клітин мікроводоростей та планктонних інфузорій Чорного моря,” 2003.
- [49] Терентьева Н. В., Мінюк Г. С., Дробецька І. В., and Чубчикова І. М., “Вплив освітленості на фізіолого-біохімічні характеристики зеленої мікроводорості *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlamydomonadales),” *Екологія моря*, pp. 82–88, 2008.