

МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ НАКОПЛЕНИЯ β -КАРОТИНА В КЛЕТКАХ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* ПРИ АЗОТНОМ ГОЛОДАНИИ

Т. В. САМОВИЧ¹⁾, А. Д. СВЕЧКО²⁾, Н. В. КОЗЕЛ^{3), 4)}

¹⁾Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси,
пр. Независимости, 68-2, 220072, г. Минск, Беларусь

³⁾Биотехнологический научный центр,
пр. Пекинский, 18, Китайско-Белорусский индустриальный парк «Великий камень»,
222210, Смолевичский р-н, Минская обл., Беларусь

⁴⁾Крестьянское (фермерское) хозяйство «Серебряный ручей»,
222202, д. Сосновая, Озерицко-Слободской с/с,
Смолевичский р-н, Минская обл., Беларусь

Аннотация. Показано, что условия азотного голодания и действия света высокой интенсивности существенно влияют на пигментный состав клеток микроводоросли *Dunaliella salina* (штамм IBCE D-1) при ее культивировании. В частности, наблюдается снижение количества хлорофиллов и неоксантина в 7 раз, виолаксантина в 5 раз, лютеина в 4 раза на фоне повышения содержания β -каротина в клетках микроводоросли в 6 раз. Сочетанное действие азотного голодания и света высокой интенсивности является наиболее эффективным из исследованных в работе способов повышения продукции β -каротина клетками *D. salina*. Установлены снижение количества белка D1 реакционного центра фотосистемы II и частичная инактивация активности этой фотосистемы в клетках микроводоросли, культивируемых в условиях недостатка азота, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза β -каротина.

Ключевые слова: микроводоросль; *Dunaliella salina*; β -каротин; фотосинтетический аппарат; азотное голодание.

Образец цитирования:

Самович ТВ, Свечко АД, Козел НВ. Механизмы индукции накопления β -каротина в клетках микроводоросли *Dunaliella salina* при азотном голодании. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;3:26–37.
EDN: NUUFTG

For citation:

Samovich TV, Svehko AD, Kozel NV. Mechanisms of induction of β -carotene accumulation in microalgae *Dunaliella salina* cells with nitrogen starvation. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:26–37. Russian.
EDN: NUUFTG

Авторы:

Татьяна Викторовна Самович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития растений.

Алексей Дмитриевич Свечко – младший научный сотрудник центра «Лазерно-оптические технологии для медицины и биологии».

Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник³⁾, главный технолог⁴⁾.

Authors:

Tatsiana V. Samovich, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of plant growth and development.

samovich77@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-3469-3752>

Alexei D. Svehko, junior researcher at the centre «Laser optical technologies for medicine and biology».

asvehko@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0006-7096-0180>

Nikolay V. Kozel, PhD (biology), docent; leading researcher^c and chief technologist^d.

koz.el.mikalai@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

MECHANISMS OF INDUCTION OF β -CAROTENE ACCUMULATION IN MICROALGAE *DUNALIELLA SALINA* CELLS WITH NITROGEN STARVATION

T. V. SAMOVICH^a, A. D. SVECHKO^b, N. V. KOZEL^{c, d}

^aV. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^bB. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus,
68-2 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220072, Belarus

^cBiotechnological Scientific Centre,
18 Piekinski Avenue, China-Belarus Industrial Park «Great Stone» 222210,
Smaliavichy District, Minsk Region, Belarus

^dPeasant (farm) economy «Serebryanyj ruchej», Sasnovaja 222202,
Aziarycka-Slabadski village council, Smaliavichy District, Minsk Region, Belarus

Corresponding author: N. V. Kozel (kozel.mikalai@gmail.com)

Abstract. It has been shown that conditions of nitrogen starvation and exposure to high intensity light significantly affect the pigment composition of cells of microalgae *Dunaliella salina* (strain IBCE D-1) during its cultivation. In particular, there is a decrease of the concentration of chlorophyll and neoxanthine by 7 times, violaxanthin by 5, lutein by 4 times against the background of an increase of the concentration of β -carotene in the cells of microalgae by 6 times. The combined effect of nitrogen starvation and high intensity light is the most effective of the methods studied in the work to increase the production of β -carotene by cells of *D. salina*. A decrease in the D1 protein amount of the reaction centre of photosystem II and a predominant activity suppression of this photosystem in the cells of microalgae cultivated in a nitrogen-deficient medium was found, which may be a key factor in increased synthesis of β -carotene.

Keywords: microalgae; *Dunaliella salina*; β -carotene; photosynthetic apparatus; nitrogen starvation.

Введение

Галофитная зеленая микроводоросль *Dunaliella salina*, относящаяся к семейству Dunaliellaceae, способна размножаться и расти при уровне солености от 0,5 до 5,0 моль/л NaCl [1]. Клетки микроводоросли имеют хлорофиллы *a* и *b*, содержание которых варьируется в диапазонах 50–59 и 19–25 % соответственно, а также каротиноиды (неоксантин, виолаксантин, лютеин и β -каротин), которые составляют 8–16 % всех пигментов клетки [2]. *D. salina* обладает способностью к накоплению значительного количества β -каротина при действии стрессоров разной природы. Благодаря этой особенности она является важнейшим источником натурального β -каротина и используется в качестве пищевой и кормовой добавки, косметологического средства и компонента препаратов для лечения и профилактики заболеваний. *D. salina* активно культивируется ввиду очень высокого итогового выхода данного пигмента: 2100,0 мг *транс*- β -каротина и 102,4 мг *цис*- β -каротина на 100 г микроводоросли против 5,8 мг *транс*- β -каротина и 2,8 мг *цис*- β -каротина на 100 г моркови [3]. В природе каротиноиды обычно встречаются в *транс*-форме. Однако при накоплении каротиноидов, индуцированном стрессорами различной природы, клетки *D. salina* могут синтезировать *цис*-изомеры с повышенным фармакологическим эффектом. В целом доля *цис*-изомеров в клетках растительных организмов является небольшой, но при этом в клетках *D. salina* доля 9-*цис*- β -каротина может составлять от трети до половины общего числа каротиноидов [3; 4]. *D. salina* обладает высокой метаболической и физиологической пластичностью, что позволяет ей жить в агрессивной высокосолевого среде, а также в больших количествах синтезировать биотехнологически значимые продукты, среди которых важное место занимает β -каротин. По результатам ряда исследований был сделан вывод о синтезе β -каротина как адаптивной реакции на изменение условий среды с благоприятных на экстремальные [5; 6]. Показатели содержания β -каротина, такие как степень его накопления и скорость синтеза, зависят от интенсивности и продолжительности действия стрессоров, в частности высокой интенсивности падающего света, высокой температуры окружающей среды и недостатка питательных веществ. Однако такие экстремальные условия могут повлиять на жизнеспособность *D. salina*, тем самым снижая количество клеток на единицу объема [3; 7; 8]. Исследования данной микроводоросли носят как фундаментальный, так и прикладной характер, и чаще всего главным интересом в них выступает организация эффективного производства β -каротина. В Беларуси имеется коллекция микроводорослей, в которой присутствует *D. salina* (штамм IBCE D-1) [9]. Этот штамм как продуцент β -каротина изучен недостаточно.

Цель данной работы – исследование влияния модификации состава питательной среды путем удаления из нее азота на продуцирование клетками *D. salina* (штамм IBCE D-1) β-каротина в условиях разной освещенности, а также раскрытие механизмов индукции его накопления.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали галофитную зеленую микроводоросль *D. salina* (штамм IBCE D-1) из альгологической коллекции Республиканского центра альгологии Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [9]. Ее культивировали в стеклянных колбах с рабочим объемом 50 мл на стандартной питательной среде Артари при светодиодном освещении (цветовая температура 4000 К) с интенсивностью 20 мкмоль квантов на 1 м² в секунду и фотопериодом 14 ч света и 10 ч темноты. Эксперименты проводили в строго контролируемых условиях окружающей среды: температура в световом периоде составляла (23 ± 1) °С, относительная влажность воздуха была равна 50 %.

Полная стандартная питательная среда Артари для *D. salina* имела такой состав: NaCl – 116,0 г/л; MgSO₄ · 7H₂O – 50,0 г/л; KNO₃ – 2,5 г/л; K₂HPO₄ – 0,2 г/л; FeSO₄ – 0,009 г/л; ЭДТА – 0,037 г/л; NaHCO₃ – 1,0 г/л; микроэлементы по Арнону – 2,0 мл на 1 л среды. Состав раствора микроэлементов был следующим: H₃BO₃ – 2,86 г/л; MnCl₂ · 4H₂O – 1,81 г/л; ZnSO₄ · 7H₂O – 0,222 г/л; MoO₃ – 176,4 мг на 10 л; NH₄VO₃ – 229,6 мг на 10 л. Для выяснения влияния модификации состава питательной среды, а именно удаления из нее биогенов, использовали дефицитную по азоту среду, которая не содержала KNO₃. Постановка эксперимента осуществлялась следующим образом. Суспензию микроводоросли *D. salina* известной оптической плотности центрифугировали 10 мин при 4000 g на центрифуге 3-18KS (*Sigma Laborzentrifugen GmbH*, Германия), супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и затем снова центрифугировали 10 мин при 4000 g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 30 мл питательной среды, после чего суспензию помещали в стеклянные колбы. Экспериментальные колбы с микроводорослью *D. salina* располагали под светом высокой интенсивности (*high intensity*, HI) (200 мкмоль квантов на 1 м² в секунду), а контрольные колбы – под светом низкой интенсивности (*low intensity*, LI) (20 мкмоль квантов на 1 м² в секунду). РАМ-флуориметрию и вестерн-блоттинг проводили после 2 сут инкубации суспензии *D. salina* на свету, анализ содержания фотосинтетических пигментов и подсчет клеток – после 14 сут инкубации. Для осуществления биохимических и молекулярно-биологических анализов (определения содержания фотосинтетических пигментов и белков фотосистем) отбирали по 12 мл суспензии из каждой колбы, центрифугировали 10 мин при 4000 g, супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и снова центрифугировали 10 мин при 17 000 g на центрифуге Heraeus Pico 17 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, США). Осадок замораживали и хранили до проведения анализа при температуре –24 °С.

Метод оценки продуктивности микроводоросли. Продуктивность микроводоросли *D. salina* оценивали по количеству клеток в единице объема суспензии. Подсчет осуществляли на 14-е сутки эксперимента с помощью камеры Горяева на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (*Nikon*, Япония) [10].

Метод определения качественного и количественного состава фотосинтетических пигментов в клетках микроводоросли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пигментный состав клеток *D. salina* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), модифицированным в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [11] согласно работам [12; 13]. В целях выполнения ВЭЖХ использовали 100 % ацетон для экстракции пигментов, раствор *A*, содержащий 90 % ацетонитрила, 9,9 % дистиллированной воды, 0,1 % триэтиламина, и раствор *B*, содержащий 100 % этилацетат. ВЭЖХ проводили с помощью хроматографа LC-20 Prominence (*Shimadzu*, Япония), используя хроматографическую колонку Nucleodur C18 Gravity (размер частиц 5 мкм, длина колонки 15 см) фирмы *Macherey-Nagel GmbH* (Германия). Разделение пигментов в хроматографической колонке осуществляли с использованием растворов *A* и *B* по программе, представленной в табл. 1, со скоростью потока 0,5 мл/мин. Объем инъекции составлял 30 мкл. Пигменты регистрировали детектором с диодной матрицей по спектрам поглощения в диапазоне 200–800 нм.

Таблица 1

Программа изменения концентрации растворителя

Table 1

Programme for changing the solvent concentration

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	Раствор <i>A</i> , %	Раствор <i>B</i> , %	Режим
0,01	1,0	100	0	Линейный градиент
6,0	1,0	0	100	Изократический режим

Окончание табл. 1
Ending of the table 1

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	Раствор А, %	Раствор В, %	Режим
9,0	1,0	0	100	Линейный градиент
9,50	1,0	100	0	Изократический режим
12,50	1,0	100	0	Остановка

Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм. В целях количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы. Расчет содержания пигментов проводили по формуле

$$C_{\text{пигм}} = \frac{S_{440} F_{\text{пигм}} V}{V_{\text{аликв}} l},$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента, мкг на 1 мл суспензии; S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм; $F_{\text{пигм}}$ – фактор (коэффициент) для расчета содержания пигмента; V – объем супернатанта; $V_{\text{аликв}}$ – объем инъекции (аликвота 30 мкл); l – объем исходной суспензии, мл. Для получения факторов (коэффициентов), отражающих зависимость площади под пиком хроматограммы от концентрации пигмента, использовали стандарты соответствующих пигментов.

Для проведения ВЭЖХ применялись следующие реагенты: ацетон марки «х. ч.» ($\geq 99,0\%$) (АО «Экос-1», Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$) и этилацетат для ВЭЖХ ($\geq 99,7\%$) (Honeywell, Германия), триэтиламин ($\geq 99,5\%$) (AppliChem, Германия), стандарты фотосинтетических пигментов (Sigma-Aldrich, Германия).

Метод определения фотохимической активности фотосистем в клетках микроводоросли с помощью РАМ-флуориметрии. Фотосинтетическую активность фотосистем клеток водоросли определяли на 2-е сутки эксперимента. Параметры, характеризующие активность работы фотосистемы II (ФС II) и фотосистемы I (ФС I), рассчитывали с использованием метода индукции флуоресценции хлорофилла для нативной культуры *D. salina*, которую адаптировали к темноте в течение 15 мин.

Для определения показателей индукции флуоресценции хлорофилла использовали РАМ-флуориметр Dual-PAM-100 (Heinz Walz, Германия) с модулем регистрации флуоресценции ФС II и двухволновым (830 и 875 нм) модулем регистрации сигнала P700 (реакционного центра ФС I). Данный прибор позволяет возбуждать модулированным светом низкой интенсивности (0,048 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду, длина волны возбуждающего света 635 нм) фоновую флуоресценцию хлорофилла (F_0). При включении актиничного света с интенсивностью 150 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду интенсивность флуоресценции достигает максимального уровня (F_m), после чего за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному пути снижается. Применение вспышки насыщающего света (10 000 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду, 635 нм) на фоне действия актиничного света увеличивает интенсивность флуоресценции с уровня F до уровня F'_m . По полученным значениям показателей F_0 , F'_0 , F_m , F'_m и F рассчитывали величину вариабельной флуоресценции ($F_v = F_m - F_0$), потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС II ($\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$), эффективный квантовый выход фотохимических реакций ФС II ($Y(\text{II}) = \frac{F_m - F}{F_m}$), а также величину фотохимического и нефотохимического тушения ($qP = \frac{F_m - F}{F_m - F_0}$, $qN = \frac{F_m - F'_m}{F_m - F_0}$, $\text{NPQ} = \frac{F_m}{F'_m - 1}$). Эффективность функционирования электрон-транспортной цепи, или скорость транспорта электронов, вычисляли по формуле

$$\text{ETR}(\text{II}) = Y(\text{II}) \cdot \text{PAR} \cdot c \cdot 0,5,$$

где PAR – интенсивность фотосинтетически активной радиации (в нашем случае 150 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду); c – часть поглощенного света (обычно 0,84, т. е. 84 %); 0,5 – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на ФС II¹ [14; 15]. Кроме того, определяли показатели $Y(\text{I})$ и $\text{ETR}(\text{I})$, которые характеризуют состояние и активность ФС I и являются аналогичными таковым для ФС II². После световой адаптации клеток регистрировали световые кривые для показателей $\text{ETR}(\text{I})$ и $\text{ETR}(\text{II})$

¹Dual-PAM-100//WALZ Photosynthesis Instruments : website. URL: <http://www.walz.com/products/dual-pam-100/> (date of access: 28.08.2025).

²Ibid.

с применением вспышки насыщающего света (10 000 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду, 635 нм) на фоне действия актиничного света разной интенсивности (11; 18; 27; 58; 100; 131; 221; 344; 536 и 830 мкмоль квантов на 1 м^2 в секунду; 30 с при каждой интенсивности света).

Метод определения содержания белка D1 с помощью вестерн-блоттинга в клетках *D. salina*. Выделение белков из клеток *D. salina*, их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг выполняли так, как описано в работе [16]. Навеску осажденных при 17 000 g клеток водоросли массой 0,1 г растирали в ступке с жидким азотом до порошка, переносили в пробирку Эппендорфа и приливали 1 мл среды выделения, содержащей 56 ммоль/л дитиотреитола, 56 ммоль/л Na_2CO_3 , 12 % сахарозы, 2 ммоль/л этилендиаминтетраацетата, 2 % SDS-Na, и тщательно перемешивали 1 мин, используя вортекс Vortex-Genie-2 (*Scientific Industries*, США). После этого пробы инкубировали в течение 10 мин при температуре 80 °C в термошейкере TS-100 (*Biosan*, Латвия). Затем снова перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 17 000 g на центрифуге Biofuge Pico (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). В полученном экстракте определяли содержание белка по методу Брэдфорда [17] и при необходимости разбавляли пробы буфером для экстракции в целях выравнивания в них содержания белка.

Разделение белков осуществляли с помощью денатурирующего гель-электрофореза. В лунки вносили 15 мкл белкового экстракта с равным количеством белка. Электрофорез проводили на установке для вертикального гель-электрофореза Mini-Protean Tetra System (*Bio-Rad*, США), используя коммерческие препараты разделяющего и концентрирующего гелей в течение 1 ч при комнатной температуре и начальном напряжении 120 В (пока белки не вошли в разделяющий гель). Затем напряжение увеличивали до 180 В.

После разделения белков их переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C pure (*Cytiva*, Великобритания) с порами 0,45 мкм. Гель наносили на мембрану и помещали на поверхность Trans-Blot Turbo Transfer System (*Bio-Rad*) между семью слоями хроматографической бумаги размером $7,0 \times 8,5$ см, предварительно смочив их в анодном буфере, содержащем 25 ммоль/л Tris, 129 ммоль/л глицина и 20 % метанола. Перенос белков осуществляли в течение 7 мин (сила тока рассчитывалась автоматически). После окончания переноса нитроцеллюлозную мембрану окрашивали в течение 3 мин в растворе красителя пунцового красного для визуализации белкового профиля. Для иммунохимического окрашивания белков, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране, использовали раствор TBS, содержащий 20 ммоль/л Tris-HCl (pH 7,5) и 150 ммоль/л NaCl, а также раствор TBST, в состав которого дополнительно входил 0,05 % Tween-20. Мембрану инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч в 50 мл TBST, содержащего 5 % сухого обезжиренного молока, перемешивая в шейкере Elpan-357 (*Elpan*, Польша). После блокировки мембрану инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании с поликлональными первичными антителами к белку D1 реакционного центра ФС II (*Agrisera*, Швеция), растворенными в TBS, содержащем 5 % сухого обезжиренного молока. Затем мембрану дважды промывали в течение 30 мин в TBST (без сухого молока), после чего инкубировали при постоянном перемешивании в течение 1 ч с кроличьими вторичными антителами (*Agrisera*), конъюгированными со щелочной фосфатазой. Мембрану снова промывали в течение 30 мин в TBST (без сухого молока), а затем инкубировали в течение 2 мин в щелочно-фосфатазном буфере, содержащем 100 ммоль/л Tris-HCl (pH 9,5), 100 ммоль/л NaCl и 5 ммоль/л MgCl_2 . Для визуализации белков мембрану инкубировали в темноте в 25 мл проявляющей смеси для щелочной фосфатазы, которая содержала 10 мг NBT, растворенного в 200 мкл дистиллированной воды, и 5 мг BCIP, растворенного в 400 мкл дистиллированной воды. После четкой визуализации полос мембрану тщательно промывали водой, подсушивали на воздухе. Количество белков рассчитывали в относительных единицах по площади и интенсивности окраски полос после их визуализации, используя программу *TotalLab* (версия 2.01).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Для статистической обработки экспериментальных данных рассчитывали среднее значение и стандартную ошибку среднего. При определении достоверности различий полученных сведений между опытными образцами учитывались допустимый уровень значимости ($p \leq 0,05$) и заданное число степеней свободы. Представлены данные как минимум трех независимых экспериментов в двойной биологической повторности. В качестве средств статистической обработки экспериментальных данных были использованы программы *Excel 2019* (*Microsoft*) и *SigmaPlot* (версия 12.0) (*Systat Software Inc.*, США), а также статистические методы из области биологических исследований [18].

Результаты и их обсуждение

Оценка продуктивности *D. salina* при культивировании в условиях азотного голодания и разной интенсивности света. На первом этапе исследования проводили оценку влияния сочетанного действия дефицита азота и света высокой интенсивности на продуктивность *D. salina* непосредственно по измене-

нию количества клеток микроводоросли в суспензии после культивирования в течение 14 сут. На рис. 1 представлены данные опытов, проведенных в следующих условиях: в среде с нормальным содержанием азота при низкой интенсивности света (+N LI), в среде с дефицитом азота при низкой интенсивности света (-N LI), в среде с нормальным содержанием азота при высокой интенсивности света (+N HI), в среде с дефицитом азота при высокой интенсивности света (-N HI). В полной питательной среде количество клеток в течение 14 сут культивирования в среднем увеличилось в 2,5 (низкая интенсивность света) и 2,0 (высокая интенсивность света) раза по сравнению с исходным значением. В условиях азотного голодания количество клеток повысилось в среднем в 1,5 раза.

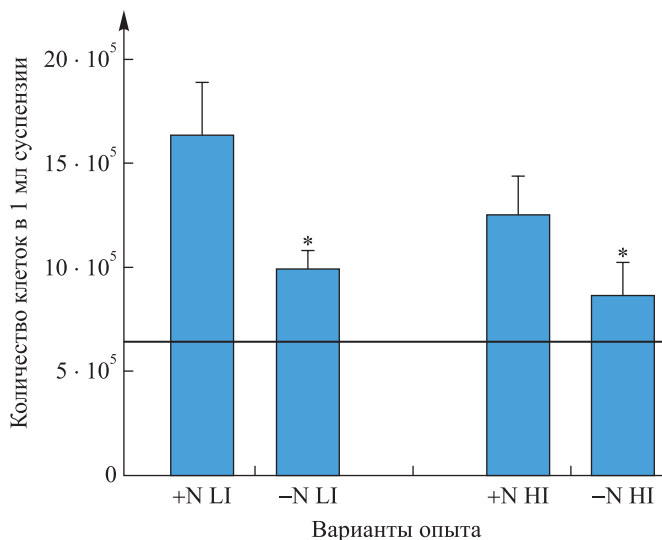


Рис. 1. Количество клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI).

Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю (+N LI) ($p \leq 0,05$).

Референсной линией обозначено исходное количество клеток

Fig. 1. Number of *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI).

Sign * marked significant differences in relation to control (+N LI) ($p \leq 0.05$).

Reference line indicates the initial number of cells

Отметим, что еще до хроматографического разделения фотосинтетических пигментов наблюдались существенные различия в окраске суспензий микроводоросли для разных вариантов опыта. Так, если исходная культура и культура, инкубированная на свету низкой интенсивности, имели ярко-зеленый цвет, что указывает на нормальное соотношение в клетках хлорофиллов и каротиноидов, то при действии света высокой интенсивности и особенно сочетанном действии дефицита азота и света высокой интенсивности суспензия приобрела желтый цвет, что свидетельствует о повышенном накоплении каротиноидов (рис. 2).

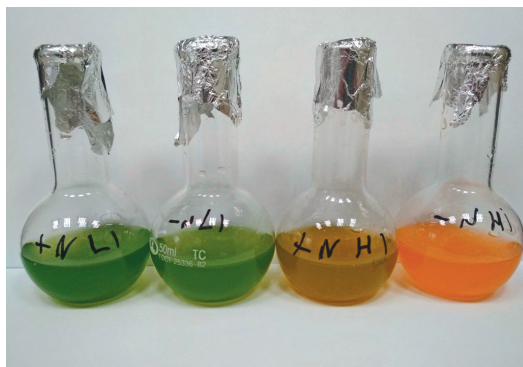


Рис. 2. Суспензии клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI)

Fig. 2. Suspensions of *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI)

На рис. 3 представлены микрофотографии, которые демонстрируют изменение формы и окраски клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях. Наблюдается четкое влияние азотного голодания в сочетании с действием света высокой интенсивности на накопление каротиноидов непосредственно в клетках микроводоросли (рис. 3, з).

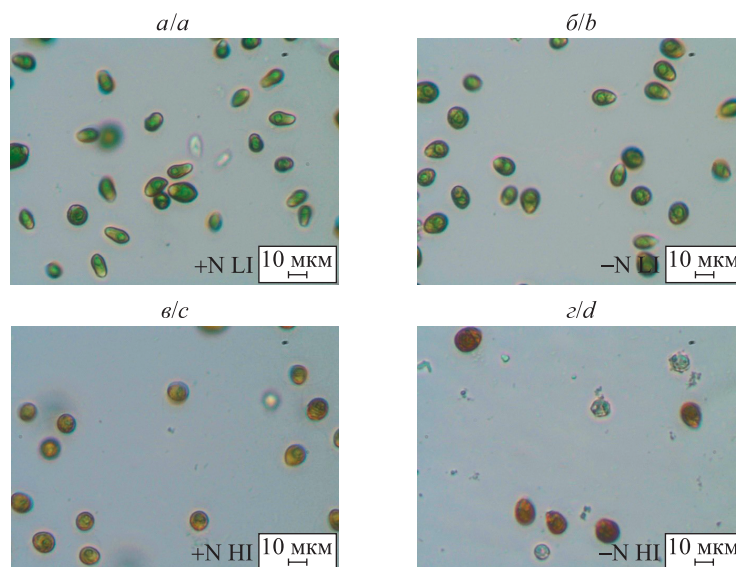


Рис. 3. Микрофотографии клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI (а), -N LI (б), +N HI (в), -N HI (з)) (увеличение $\times 40$)

Fig. 3. Microphotographs of *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI (a), -N LI (b), +N HI (c), -N HI (d)) (magnification $\times 40$)

Влияние азотного голодания и света высокой интенсивности на накопление фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina*. На втором этапе исследования проводили оценку качественного и количественного состава фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina*. Были разделены и идентифицированы следующие пигменты: неоксантин, виолаксантин, лютеин, хлорофилл *b*, хлорофилл *a* и β -каротин. Хроматограмма ацетонового экстракта фотосинтетических пигментов из клеток *D. salina*, отраженная на рис. 4, содержит пики неоксантина (время удержания 2,06 мин), виолаксантина (2,36 мин), лютеина (3,08 мин), хлорофилла *b* (4,06 мин), хлорофилла *a* (4,39 мин) и β -каротина (5,31 мин).

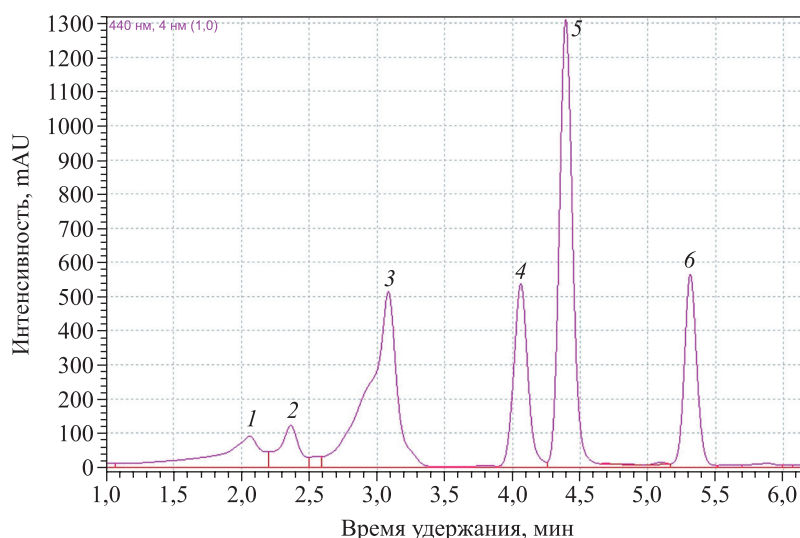


Рис. 4. Хроматограмма ацетонового экстракта фотосинтетических пигментов из клеток *D. salina*. Цифрами 1–6 обозначены пики неоксантина (1), виолаксантина (2), лютеина (3), хлорофилла *b* (4), хлорофилла *a* (5) и β -каротина (6)

Fig. 4. Chromatogramme of the acetone extract of photosynthetic pigments from *D. salina* cells. Numbers 1–6 indicate peaks of neoxanthin (1), violaxanthin (2), lutein (3), chlorophyll *b* (4), chlorophyll *a* (5) and β -carotene (6)

Для идентификации разделенных веществ использовали очищенные стандарты соответствующих соединений, а также спектры поглощения, зарегистрированные фотометрическим детектором [11]. На рис. 5 представлены данные проведенного методом ВЭЖХ анализа количества фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina* при культивировании в разных условиях. Выявлено, что при выращивании клеток в среде с азотным голоданием, при свете высокой интенсивности, а также в условиях сочетанного действия этих факторов содержание β -каротина относительно контроля (+N LI) увеличивалось. Клетки, культивированные в дефицитной по азоту среде при свете высокой интенсивности, характеризовались максимальным количеством этого пигмента (превышает его количество в клетках контрольных образцов более чем в 6 раз). В клетках, сформировавшихся в данной среде, на фоне увеличения содержания β -каротина наблюдалось существенное уменьшение содержания хлорофилла и ксантофилловых каротиноидов (неоксантина, виолаксантина и лютеина) по сравнению с клетками контрольных образцов. Так, сочетанное действие азотного голодания и света высокой интенсивности снизило количество хлорофилла и неоксантина в среднем в 7 раз, виолаксантина в 5 раз, лютеина в 4 раза.

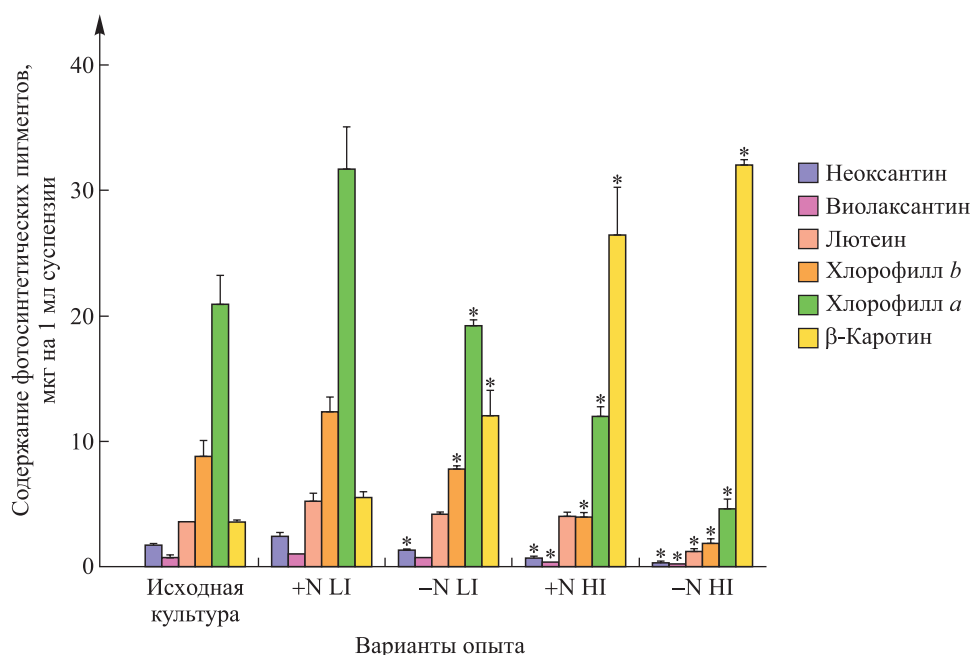


Рис. 5. Содержание фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI). Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю (+N LI) ($p \leq 0,05$)

Fig. 5. Content of photosynthetic pigments in *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI). Sign * marked significant differences in relation to control (+N LI) ($p \leq 0.05$)

Влияние азотного голодания и света высокой интенсивности на фотохимическую активность фотосистем клеток *D. salina*. На третьем этапе работы проанализировали фотохимическую активность фотосистем клеток *D. salina* на начальной стадии стрессового воздействия, а именно через 2 сут после начала инкубации клеток в среде с дефицитом азота при действии света высокой интенсивности. На этой стадии стрессового воздействия еще отсутствуют детектируемые инструментальными методами изменения в пигментном составе клеток, однако уже наблюдаются отклонения от их контрольных флуоресцентных характеристик. РАМ-флуориметрия дает информацию об эффективности функционирования электрон-транспортной цепи в пределах ФС I и ФС II, а также о перераспределении энергии на фотохимические (фотосинтез) и нефотохимические процессы. Знание этих параметров работы системы фотосинтеза клеток *D. salina* позволит определить возможное участие фотосинтетического аппарата в регуляции накопления каротиноидов как адаптационного механизма.

При азотном голодании выявлено снижение показателей $\frac{F_v}{F_m}$, $Y(II)$ и $ETR(II)$ в пределах ФС II на 9; 9 и 10 % соответственно, при действии света высокой интенсивности – на 40; 51 и 52 % соответственно, при сочетанном действии стрессовых факторов – на 60; 67 и 67 % соответственно (табл. 2). Для всех вариантов опыта также было установлено снижение показателя qP в среднем на 15 %. В условиях дефицита азота и действия света высокой интенсивности достоверное снижение фотохимической активности ФС I (показатели $Y(I)$ и $ETR(I)$) не было обнаружено.

На рис. 6 представлены результаты анализа изменения хода световых кривых, отражающих зависимость эффективности функционирования электрон-транспортной цепи ФС II от интенсивности актиничного света. Зафиксировано существенное достоверное снижение показателя ETR(II) как при азотном голодании, так и при действии света высокой интенсивности. Различия значений показателя ETR(I), отражающего эффективность функционирования электрон-транспортной цепи ФС I, в условиях дефицита азота и света разной интенсивности были не такими явными (рис. 7). Более того, при использовании актиничного света с интенсивностью 344 мкмоль квантов на 1 м² в секунду показатель ETR(I) в клетках, выращенных при азотном голодании и свете высокой интенсивности, был выше, чем в клетках контрольных образцов, что указывает на отсутствие подавления активности ФС I при недостатке азота.

Таблица 2

Результаты РАМ-флуориметрии суспензии клеток *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, –N LI, +N HI, –N HI)

Table 2

Results of RAM fluorimetry of suspension of *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, –N LI, +N HI, –N HI)

Показатели	Варианты опыта			
	+N LI	–N LI	+N HI	–N HI
F_0	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,02
F_m	0,52 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,26 ± 0,02*	0,15 ± 0,02*
$\frac{F_v}{F_m}$	0,63 ± 0,01	0,57 ± 0,02*	0,38 ± 0,03*	0,25 ± 0,02*
$Y(II)$	0,43 ± 0,01	0,35 ± 0,02*	0,21 ± 0,02*	0,14 ± 0,01*
ETR(II)	23,91 ± 0,45	19,02 ± 0,94*	11,36 ± 1,54*	7,83 ± 0,49*
NPQ	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,24 ± 0,16	0,03 ± 0,01
qN	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,16 ± 0,07	0,05 ± 0,02
qP	0,70 ± 0,01	0,63 ± 0,01*	0,54 ± 0,06*	0,62 ± 0,04*
$Y(I)$	0,62 ± 0,05	0,56 ± 0,05	0,50 ± 0,06	0,51 ± 0,06
ETR(I)	34,02 ± 2,49	31,0 ± 2,73	27,54 ± 3,11	27,90 ± 3,25

*Достоверные различия по отношению к контролю (+N LI) ($p \leq 0,05$).

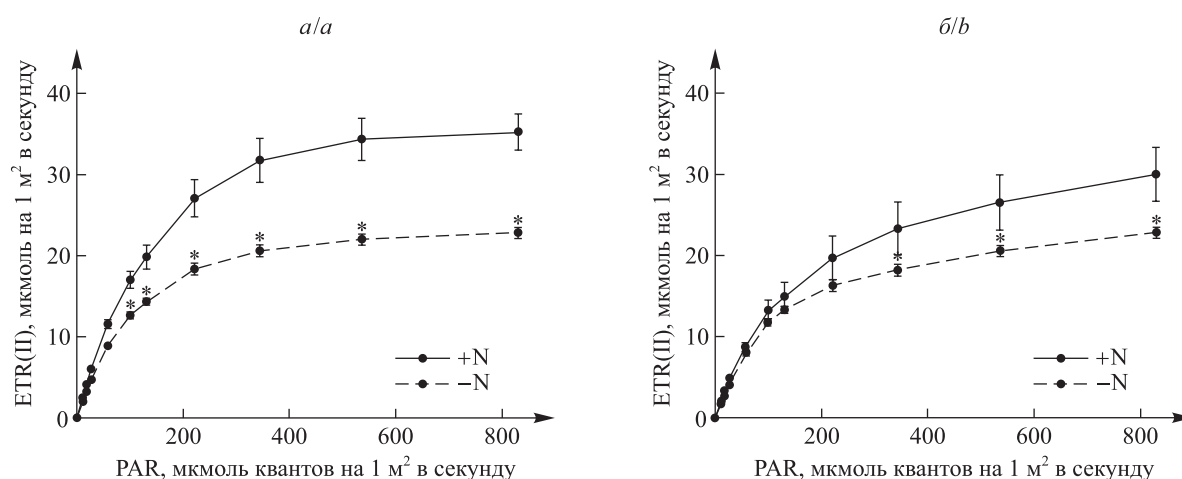


Рис. 6. Эффективность функционирования электрон-транспортной цепи ФС II в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в среде с нормальным содержанием азота и его дефицитом на свете низкой (а) и высокой (б) интенсивности. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю (+N) ($p \leq 0,05$)

Fig. 6. Efficiency of the electron transport chain of photosystem II (PS II) in *D. salina* cells grown for 14 days in a medium with normal nitrogen content and nitrogen deficiency under low (a) and high (b) light intensity. Sign * marked significant differences in relation to control (+N) ($p \leq 0.05$)

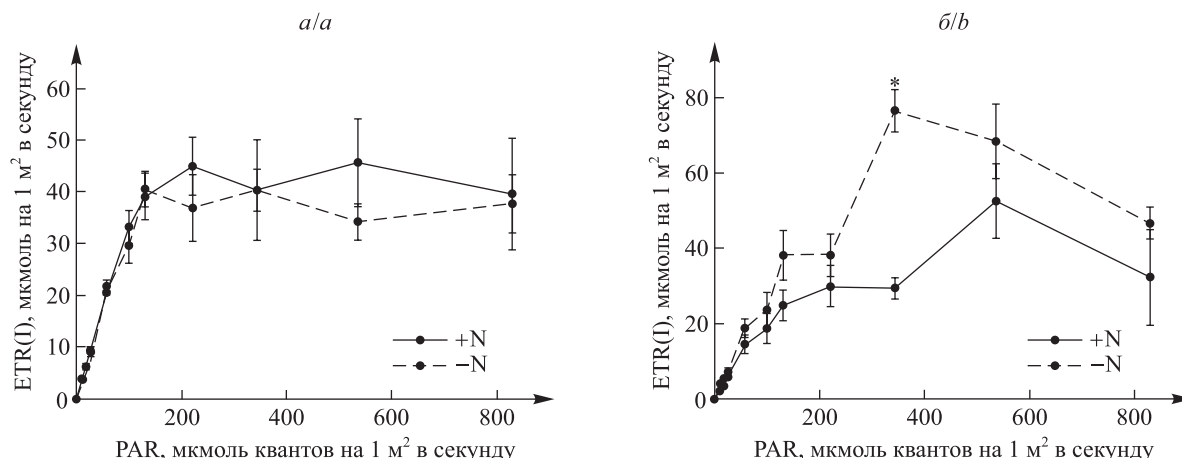


Рис. 7. Эффективность функционирования электрон-транспортной цепи ФС I в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в среде с нормальным содержанием азота и его дефицитом на свету низкой (а) и высокой (б) интенсивности. Знаком * отмечено достоверное различие по отношению к контролю (+N) ($p \leq 0,05$)

Fig. 7. Efficiency of the electron transport chain of photosystem I in *D. salina* cells grown for 14 days in a medium with normal nitrogen content and nitrogen deficiency under low (a) and high (b) light intensity. Sign * marked significant difference in relation to control (+N) ($p \leq 0.05$)

Влияние азотного голодания и света высокой интенсивности на накопление белка D1 реакционного центра ФС II в клетках *D. salina*. Вестерн-блоттинг позволил через 2 сут инкубации выявить уменьшение количества белка D1 реакционного центра ФС II в клетках, выращенных в условиях азотного голодания при низкой (уменьшение составило 27 %) и высокой (уменьшение составило 28 %) освещенности, по сравнению с количеством этого белка в клетках, культивированных в питательной среде с нормальным содержанием азота (рис. 8). Отметим, что хотя действие света высокой интенсивности во всех вариантах опыта приводило к достоверному снижению содержания белка D1 реакционного центра ФС II в клетках микроводоросли, однако влияние дефицита азота на его количество было более значительным. Результаты денситометрического анализа полученных изображений вестерн-блоттинга представлены на рис. 9.

Таким образом, установлено снижение количества белка D1 реакционного центра ФС II на фоне преимущественного подавления активности ФС II в клетках *D. salina*, культивированных в дефицитной по азоту среде, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза в клетках β -каротина как антиоксиданта, предотвращающего избыточное накопление в хлоропластах активных форм кислорода, в частности синглетного молекулярного кислорода [19]. Подавление фотохимической активности ФС II в условиях азотного голодания является следствием нарушения биосинтеза основных структурных белков фотосинтетического аппарата, в том числе белка D1 реакционного центра ФС II [20]. Максимальный выход β -каротина в условиях дефицита азота и света высокой интенсивности может быть обусловлен действием синглетного молекулярного кислорода, генерация которого увеличивается при повреждении компонентов или нарушении функционирования комплексов ФС II, особенно на свету высокой интенсивности [21; 22].

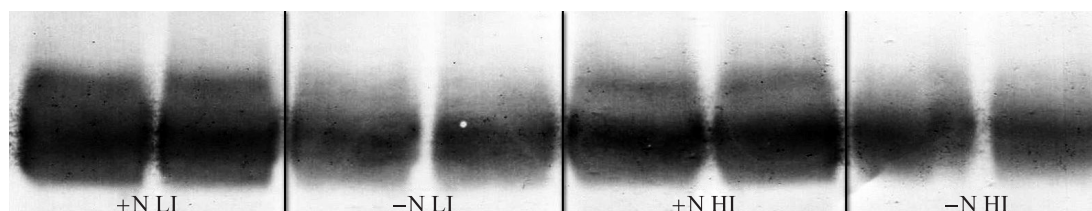


Рис. 8. Вестерн-блоттинг белка D1 реакционного центра ФС II в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI)

Fig. 8. Western blot analysis of D1 protein of the reaction centre PS II in *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI)

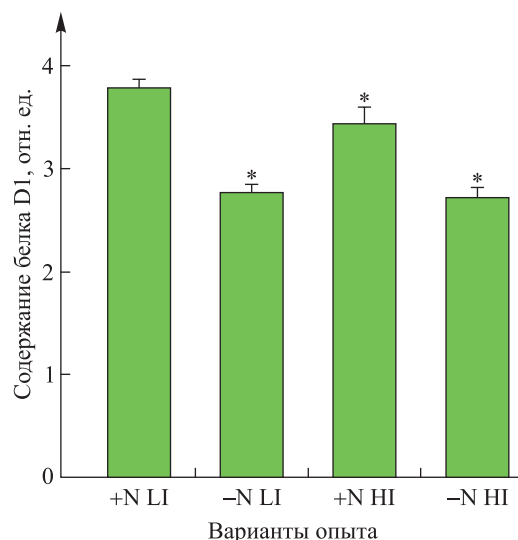


Рис. 9. Содержание белка D1 реакционного центра ФС II в клетках *D. salina*, выращенных в течение 14 сут в разных условиях (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI). Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к контролю (+N LI) ($p \leq 0,05$)

Fig. 9. Content of D1 protein of the reaction centre PS II in *D. salina* cells grown for 14 days under different conditions (+N LI, -N LI, +N HI, -N HI). Sign * marked significant differences in relation to control (+N LI) ($p \leq 0.05$)

Закключение

Условия азотного голодания и действия света высокой интенсивности существенно влияют на пигментный состав клеток микроводоросли *D. salina* (штамм IBCE D-1) при ее культивировании. В частности, наблюдается снижение содержания хлорофиллов и неоксантина в 7 раз, виолаксантина в 5 раз, лютеина в 4 раза на фоне увеличения содержания β -каротина в клетках микроводоросли в 6 раз. Сочетанное действие дефицита азота и света высокой интенсивности является наиболее эффективным из исследованных в работе способов повышения продуцирования β -каротина клетками *D. salina*. Установлены снижение количества белка D1 реакционного центра ФС II и частичная инактивация активности ФС II в клетках микроводоросли, культивированных в условиях азотного голодания. Такое нарушение структурно-функционального состояния фотосинтетического аппарата клеток *D. salina* потенциально опасно развитием фотоокислительного стресса, оно приводит к активации биосинтеза каротиноидов и, как следствие, сверхпродуцированию β -каротина, являющегося специфическим тушителем синглетного молекулярного кислорода. Настоящее исследование дает представление о механизме регуляции синтеза β -каротина в клетках *D. salina*, а также показывает перспективность использования дефицитных по азоту сред при культивировании клеток данной микроводоросли в целях получения β -каротина в промышленных масштабах.

Библиографические ссылки

1. Raja R, Hemaiswarya S, Rengasamy R. Exploitation of *Dunaliella* for beta-carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(3):517–523. DOI: 10.1007/s00253-006-0777-8.
2. Amini M, Amini Khoei Z, Erfanifar E. Nitrate (NO_3^-) and phosphate (PO_4^{3-}) removal from aqueous solutions by microalgae *Dunaliella salina*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;19:5–8. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101097.
3. al-Muhteseb SI, Emeish S. Producing natural mixed carotenoids from *Dunaliella salina*. *Journal of Natural Sciences Research*. 2015;5(10):53–59.
4. Ben-Amotz A, Lers A, Avron M. Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*. 1988;86(4):1286–1291.
5. Pisal DS, Lele SS. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*. 2005;4:476–483.
6. García-González M, Moreno J, Manzano JK, Florencio FJ, Guerrero MG. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-*cis*-beta-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. 2005;115(1):81–90. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.07.010.
7. Ben-Amotz A, Shaish A, Avron M. The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β -carotene rich algae. *Biore-source Technology*. 1991;38:233–235. DOI: 10.1016/0960-8524(91)90160-L.
8. Божков А. Динамика функциональных эпигенотипов *Dunaliella viridis* Teodor. при накопительном и квазинепрерывном культивировании. *Альгология*. 2013;23(3):231–247.

9. Мельников СС, Мананкина ЕЕ, Будакова ЕА, Шалыго НВ, составители. *Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей*. Минск: Беларуская навука; 2011. 101 с.
10. Сиренко ЛА, Сакевич АИ, Осипов ЛФ, Лукина ЛФ, Кузьменко МИ, Козицкая ВН и др. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*. Киев: Наукова думка; 1975. 248 с.
11. Каляга ТГ, Козел НВ. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:46–53. DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-46-53.
12. Forni E, Ghezzi MN, Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatographia*. 1988;26:120–124. DOI: 10.1007/BF02268135.
13. Milenković SV, Zvezdanović J, Anđelković T, Marković D. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced Technologies*. 2012;1:16–24.
14. Govindjee G. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1995;22(2):131–160.
15. Корнеев ДЮ. *Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла*. Киев: Альтерпрес; 2002. 188 с.
16. Jansson S, Stefansson H, Nystrom U, Gustafsson P, Albertsson P-A. Antenna protein composition of PS I and PS II in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997;1320(3):297–309. EDN: AFSXIF.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
18. Рокицкий Ф. *Биологическая статистика*. Минск: Вышэйшая школа; 1973. 320 с.
19. Красновский АА. Синглетный молекулярный кислород: механизмы образования и пути дезактивации в фотосинтетических системах. *Биофизика*. 1994;39(2):236–250.
20. Liu X, Yin C, Xiang L, Jiang W, Xu S, Mao Z. Transcription strategies related to photosynthesis and nitrogen metabolism of wheat in response to nitrogen deficiency. *BMC Plant Biology*. 2020;20(1):448. DOI: 10.1186/s12870-020-02662-3.
21. Dogra V, Kim C. Singlet oxygen metabolism: from genesis to signaling. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:1640. DOI: 10.3389/fpls.2019.01640.
22. Dmitrieva VA, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. Singlet oxygen in plants: generation, detection, and signaling roles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(9):3237. DOI: 10.3390/ijms21093237.

Получена 29.08.2025 / исправлена 22.09.2025 / принята 22.09.2025.
Received 29.08.2025 / revised 22.09.2025 / accepted 22.09.2025.