

Влияние хлорида натрия на рост биомассы и синтез белковых веществ при культивировании микроводорослей *Dunaliella salina* на питательной среде из свекловичной мелассы

Р. А. Иксанов¹, А. В. Канарский¹, З. А. Канарская¹, В. М. Гематдинова²

¹ Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Республика Татарстан

² Казанский инновационный университет им. В. Г. Тимирязева, Казань, Республика Татарстан

Корреспонденция:

Иксанов Ришат Анварович,
Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015, Россия, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68
E-mail: rishat.iksanov@yandex.com

Конфликт интересов:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 04.07.2023

Поступила после

рецензирования: 19.09.2023

Принята: 21.09.2023

Copyright: © 2023 Авторы

АННОТАЦИЯ

Введение. В настоящее время области применения галофилов рода Halobacteriaceae ограничены в основном применением β-каротина и гидролаз в пищевой и косметической промышленности. Расширение областей применения галофилов в биотехнологии основано на синтезе эффективных и высокоспецифичных биокатализаторов, которые могут удовлетворить промышленные потребности. Так как галофилы устойчивы к внешним факторам и могут быть культивированы в нестерильных условиях, необходимо определить возможность применения бактерий *D. salina* в промышленности, например, для очистки сточных вод, экспрессии рекомбинантных белков, производства биотоплива, получения природных полимерных материалов.

Цель. Изучить эффективность культивирования микроводорослей *Dunaliella salina* (*D. salina*) на питательной среде из мелассы с дополнительным внесением хлорида натрия.

Материалы и методы. В обзор включены зарубежные статьи, опубликованные на английском языке за 2010–2023 год. Поиск научных статей проводили в библиографических базах Google Scholar, Scopus, Web of Science. При отборе публикаций для обзора приоритет отдавали высокоцитируемым источникам.

Результаты. Установлено, что увеличение температуры культивирования микроводорослей от 5 до 25°C благоприятно влияет на ростовые характеристики культуры *D. salina*. Микроводоросли *D. salina* при содержании NaCl в питательной среде до 5 % проявляют галотолерантные свойства, а с увеличением содержания NaCl в питательной среде до 30 % — галофильные свойства. Наилучшие кинетические характеристики роста культуры *D. salina* проявляются при галофильной физиологической активности. Выход биомассы микроводорослей *D. salina* при культивировании на питательной среде без внесения и при внесении в питательную среду из мелассы 5 % NaCl выше в сравнении с внесением в питательную среду 15 и 30 % NaCl. Установлено, что повышение содержания NaCl приводит к увеличению скорости роста культуры и времени генерации, также в значениях 30 % NaCl проявляется большее содержание белка и β-фруктозидазы. При культивировании до 240 ч наблюдается снижение pH питательной среды с 7,04 до 4,70 в связи с усвоением микроводорослями минерального и связанного с органическими веществами азота. При увеличении продолжительности культивирования микроводорослей число клеток в культуральной жидкости вырастает до $4 \cdot 10^7$ кл/мл, при этом синтезируется внеклеточный фермент β-фруктозидаза, гидролизующий сахарозу.

Выводы. Ввиду полученных данных можно указать на возможность использования мелассы свекловичной в качестве источника углерода и веществ, стимулирующих рост *D. salina*, для получения биомассы, белковых веществ и фермента β-фруктозидазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

биотехнология; *Dunaliella salina*; меласса; культивирование; физиологическая активность; кинетические параметры роста

Для цитирования: Иксанов, Р. А., Канарский, А. В., Канарская, З. А., & Гематдинова, В. М. (2023). Влияние хлорида натрия на рост биомассы и синтез белковых веществ при культивировании микроводорослей *Dunaliella salina* на питательной среде из свекловичной мелассы. *Health, Food & Biotechnology*, 5(2), 17–27. <https://doi.org/10.36107/hfb.2023.i2.s168>



<https://doi.org/10.36107/hfb.2023.i2.s168>

The Effect of Sodium Chloride on Biomass Growth and Protein Synthesis during Cultivation of *Dunaliella salina* Microalgae on a Nutrient Medium from Beet Molasses

Rishat A. Iksanov¹, Albert V. Kanarsky¹, Zosya A. Kanarskay¹,
Venera M. Gematdinova²

¹ Kazan National Research Technological University, Kazan, the Republic of Tatarstan

² Kazan Innovation University named after V. G. Timiryasov, Kazan, the Republic of Tatarstan

Correspondence:

Rishat A. Iksanov

Kazan National Research Technological University, 68, Karl Marx street, Kazan, 420015, Russia
E-mail: rishat.iksarov@yandex.com

Declaration of competing interest:
none declared.

Received: 04.07.2023

Received in revised form: 19.09. 2023

Accepted: 21.09.2023

Copyright: © 2023 The Authors

ABSTRACT

Introduction. Currently, the applications of halophiles of the genus Halobacteriaceae are mainly limited to the use of β -carotene and hydrolases in the food and cosmetic industries. Expanding applications of halophiles in biotechnology are based on the synthesis of efficient and highly specific biocatalysts that can meet industrial needs. Since halophiles are resistant to external factors and can be cultivated under non-sterile conditions, it is necessary to determine the possibility of using *D. salina* bacteria in industry, for example, for wastewater treatment, expression of recombinant proteins, biofuel production, and production of natural polymeric materials.

Purpose. To study the effectiveness of cultivation of microalgae *Dunaliella salina* (*D. salina*) on a nutrient medium from molasses, experiments with additional addition of sodium chloride were carried out in this work.

Materials and Methods. The review includes foreign articles published in English for the period 2010–2023. Search for scientific articles on suitable topics in the bibliographic databases Google Scholar, Scopus, Web of Science. When selecting publications for review, priority was given to highly cited sources.

Results. It has been established that increasing the microalgae cultivation temperature from 5 to 25°C has a beneficial effect on the growth characteristics of the *D. salina* culture. Microalgae *D. salina* exhibit halotolerant properties when the NaCl content in the nutrient medium is up to 5 %, and halophilic properties when the NaCl content in the nutrient medium increases to 30 %. The best kinetic characteristics of the growth of the *D. salina* culture are manifested with halophilic physiological activity. The yield of biomass of microalgae *D. salina* when cultivated on a nutrient medium without adding 5 % NaCl to a nutrient medium from molasses is higher compared to adding 15 and 30 % NaCl to a nutrient medium. Moreover, an increase in the NaCl content leads to an increase in the culture growth rate and generation time; also, at values of 30 % NaCl, a higher content of protein and β -fructosidase appears. When cultivated for up to 240 hours, a decrease in the pH of the nutrient medium is observed from 7.04 to 4.70 due to the assimilation of mineral and nitrogen associated with organic matter by microalgae. With an increase in the duration of microalgae cultivation, the number of cells in the culture liquid increases to $4 \cdot 10^7$ cells/ml, and the extracellular enzyme β -fructosidase is synthesized, which hydrolyzes sucrose.

Conclusions. The research indicates the possibility of using beet molasses as a source of carbon and substances that stimulate the growth of *D. salina* to produce biomass, protein substances and the enzyme β -fructosidase.

KEYWORDS

biotechnology; *Dunaliella salina*; molasses; cultivation; physiological activity; growth kinetic parameters

To cite: Iksanov, R. A., Kanarsky A. V., Kanarskay Z. A., & Gematdinova, V. M. (2023). The effect of sodium chloride on biomass growth and protein synthesis during cultivation of *Dunaliella salina* microalgae on a nutrient medium from beet molasses. *Health, Food & Biotechnology*, 5(2), 17-27. <https://doi.org/10.36107/hfb.2023.i2.s168>



ВВЕДЕНИЕ

D. salina — это галофильные зеленые одноклеточные микроводоросли, встречающиеся в таких гиперсолевых средах, как соленые озера и пруды, в которых немногие организмы способны существовать. Выживанию этих микроводорослей способствуют высокие концентрации β-каротина, защищающего их от длительного ультрафиолетового излучения, и глицерин, который обеспечивает защиту от осмотического давления и ферментативную активность (Боровков & Губдвилевич, 2019). Благодаря обилию β-каротина, который является антиоксидантом и предшественником витамина А, микроводоросли *D. salina* используются в пищевой и косметической промышленности.

D. salina не имеет клеточной стенки и сократительной вакуоли, размеры клеток могут варьироваться в длину от 2,8 до 40 мкм, в ширину от 1,5 до 20 мкм. В чашеобразном хлоропласте микроводорослей содержится большое количество β-каротина, что придает ему оранжево-красный цвет. В зависимости от условий среды обитания *D. salina* бывает различной формы и симметричности. Оптимальная температура роста микроводорослей в зависимости от штамма находится в диапазоне 15–25°C. Некоторые штаммы обладают высокой устойчивостью к стрессам при высоких температурах и концентрациях CO₂ и NO₂ (Borovkov et al., 2021; Баймурзаев и соавт., 2022).

В состав *D. salina* входят 25 % углеводов, которые являются основным компонентом микроводорослей, 10 % белков, 3 % каротиноидов и 3 % липидов. В коммерческих продуктах содержится 48,5 % зольных веществ и 6,6 % влаги (Cakmak et al., 2014). Кроме того, микроводоросли *D. salina* также являются источником витамина B₁₂.

D. salina широко применяется при изучении механизма галотолерантности, экспрессии рекомбинантных белков, очистке сточных вод, производстве биотоплива, при получении природных материалов и т. д. В настоящее время ее промышленное выращивание для получения β-каротина является одной из историй успеха галофильной биотехнологии. Используются различные технологии культивирования *D. salina*, начиная от экстенсивного культивирования в лагунах до интенсивного культивирования при высокой плотности клеток в тщательно контролируемых условиях биореакторов (Али-заде и соавт., 2020).

Расширение областей применения галофилов в биотехнологии основано на синтезе эффективных и высокоспецифичных биокатализаторов, удовлетворяющих промышленные потребности. Галофилы являются отличными источниками ферментов, которые устойчивы не только к соли, но и к другим экстремальным

условиям, содержат биологически активные вещества, при этом культивирование возможно проводить в нестерильных условиях.

Для увеличения скорости культивирования *D. salina* рекомендуется использование синтетических сред с содержанием солей металлов, которые способствуют переходу микроводорослей от «зеленой» культуры к «красной» (Borovkov et al., 2020).

В работе Gastelum-Franco et al. (2021) указывается использование мелассы сахарного тростника после обработки в качестве источника углерода в питательной среде. Установлено влияние источника углерода на скорость роста биомассы и объем выделенных липидов в культуральную среду. Тростниковую мелассу предлагается использовать как основу питательной среды для дальнейшего культивирования.

Уровень накопления биомассы и продуктивность углеводов являются важными показателями эффективности штамма микроводорослей, предназначенного для использования в процессах производства биопрепаратов. На них влияют такие условия, как концентрация и состав питательных веществ, температура, pH и освещенность. Изменение этих параметров приводит к изменению состава биомассы, содержания и состава различных веществ (включая углеводы), что необходимо учитывать при масштабировании процесса производства биомассы (Alva et al., 2022).

Установлено влияние концентрации соли (NaCl) солёности среды на интенсивность накопления каротиноидов (Xi et al., 2022). При культивировании происходит изменение pH среды из-за влияния глицерина, синтезируемого микроводорослями *D. salina*. Показано, что внутриклеточная концентрация ионов глицерина во время синтеза внутриклеточных продуктов приводит к образованию соединений тем или иным способом, влияющих на pH среды (Gonabadi et al., 2022).

Для микроводорослей свет необходим для метаболических процессов, протекающих в клетках, и фотоокисления пигментов. При увеличении освещенности наблюдается повышение скорости синтеза ферментов. Ограничение азота в питательной среде в условиях интенсивного роста культуры приводит к увеличению содержания β-каротина в клетках микроводорослей в несколько раз.

В опубликованных исследованиях указывается на влияние pH питательной среды при культивировании на синтезируемые микроорганизмами жирные кислоты, липиды и ферменты. При этом благоприятными условиями синтеза ферментов микроводорослями *D. salina* является слабощелочная питательная среда с содержанием

малых и средних концентраций соли. Способность галофильных микроорганизмов существовать в засоленных средах обосновывается синтезом ферментов, которые повышают устойчивость культуры в кислой среде (Kumudha & Sarada, 2016; Рязанцев & Муратов, 2021). Данный механизм помогает микроводорослям поддерживать протекание биохимических процессов в клетках (Baati et al., 2022; Jungmann et al., 2022).

Вещества, синтезируемые микроводорослями *D. salina*, целесообразно использовать в качестве биопродуктов (Moghaieb et al., 2018). Например, осмолиты рекомендуются применять в производстве средств для защиты кожи от различных раздражителей и при изготовлении лекарств, способствующих борьбе с заражением кожи (Xu & Harvey, 2019; Silva et al., 2021; Akpolat et al., 2015).

Синтезируемые микроводорослями *D. salina* ферменты способны не только контролировать устойчивость к воздействию соленой среды, но и влиять на химическую потребность кислорода (ХПК) в данной среде. Показано (Akpolat et al., 2015), что при повышении концентрации ведет к уменьшению ХПК, что незначительно влияет на синтез продуктов, необходимых для жизнедеятельности клеток.

Биопродукты, синтезируемые микроорганизмами галофильного свойства, используются в ветеринарной практике для лечения скота от болезней, связанных с шерстяным покровом и пищеварением (Martinez et al., 2022; Khayyal et al., 2019).

В работах Боровков & Гудвилович (2012) и Ха и соавт. (2019) показано применение среды Тренкеша и модифицированной среды Джонсона. Данные среды являются синтетическими, поэтому значительно возрастает себестоимость биопродуктов, синтезируемых *D. salina* в производстве.

Анализ опубликованных работ, отражающих результаты исследований по культивированию *D. salina*, указывает на тенденцию применения в составе питательных сред минеральных веществ с дополнительным внесением рафинированных источников углерода, в частности, глюкозы, фруктозы, мальтозы и сахарозы. При этом из-за низкого выхода биомассы на стадиях культивирования применение микроводорослей *D. salina* в промышленности ограничено, что обуславливает необходимость поиска благоприятных условий для роста биомассы этих микроводорослей и питательных сред и, соответственно, путей повышения экономической эффективности производства БАВ культивированием микроводорослей *D. salina* (Kalaitzidou et al., 2022). В этой связи весьма актуальны исследования по определению возможности использования для культивирования микроводорослей *D. salina* питательных сред,

приготовленных из вторичных ресурсов переработки растительного сырья.

Целью данной статьи является определение эффективности роста биомассы и синтеза белковых веществ при культивировании микроводорослей *D. salina* на питательной среде из свекловичной мелассы в присутствии хлорида натрия.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- (1) определение влияния NaCl и температуры культивирования на усвоение редуцирующих веществ свекловичной мелассы микроводорослями *D. salina*;
- (2) определение влияния NaCl и температуры культивирования на кинетические параметры роста микроводорослей *D. salina* при культивировании на питательной среде из свекловичной мелассы;
- (3) определение влияния NaCl и температуры культивирования на синтез биомассы и белка при культивировании *D. salina* на питательной среде из свекловичной мелассы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были микроводоросли *D. salina*, выделенные из донных осадков Кояшского озера Керченского полуострова в августе 2019 года. Культура была отобрана со дна во время цветения поверхности озера красным цветом.

Выделение микроводорослей из донного осадка и хранение культуры проводили принятыми в микробиологии методами (Ха и соавт., 2020) с соблюдением стерильности на питательной среде ГРМ-агар. Определение морфологических признаков микроводорослей проводили на питательной среде МПА. Культивирование колоний микроводорослей проводили в течение 3 суток на чашках Петри и определяли их морфологические и культуральные признаки путем мониторинга на микроскопе Biomed 5 при увеличении 40х. При описании колоний микроводорослей отмечали морфологические и культуральные признаки: форма, цвет, поверхность, оптические свойства, профиль и край колоний. Для дальнейших исследований использовали культуру по фенотипическим признакам, соответствующим микроводоросли *D. salina* (Ха и соавт., 2020): форма колонии круглая, цвет колонии желто-оранжевый, поверхность гладкая, непрозрачная, профиль колонии плоский, край колонии гладкий. Культивирование микроводорослей на питательной среде Гисса показало, что выделенная из донного осадка культура микроводорослей имеет сахаролитическую активность.

В нашем исследовании для приготовления питательной среды использовалась неочищенная меласса (свекло-

сахарная патока) с содержанием сухих веществ 83,0 %, сахара 53,0 %, безазотистых органических веществ 16,7 %, азотистых веществ 14,8 % и 8,5 % минеральных веществ. Меласса была получена из Буинского сахарного завода РТ партии 2022 года. Общее содержание мелассы в питательной среде составляло 6,0 %. Содержание редуцирующих веществ в питательной среде после кислотного гидролиза серной кислотой при 100 °С в течение 2 часов, составило 5,0 %. Меласса содержит микро- и макроэлементы (соединения фосфора, соли калия и кальция), имеет pH 6,78 и необходимые для роста микроорганизмов, поэтому в питательную среду дополнительных биогенных веществ не вносили. При этом в питательную среду вносили хлорид натрия в количестве 5; 15 и 30 % к массе мелассы, что дает возможность определения влияния концентрации соли на физиологическую активность микроводорослей *D. salina* в диапазоне малосолёных, среднесолёных и сильносолёных питательных сред. Приготовленную питательную среду стерилизовали, охлаждали и затем вносили микроводоросли, выращенные на питательной среде Гисса. После стерилизации pH питательной среды составило 7,04.

Культивирование микроводорослей проводили на водном шейкере NewBrunswickScientificInnova 3100/C76(США) в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, варьируя температуру от 15 до 35 °С, при 140 об/мин в помещении с освещенностью 300 лм/м² в течение 12 часов и 12 часов без освещения в трех повторностях.

Физиологическую активность культивируемых микроводорослей контролировали по: изменению оптической плотности, проводя исследование на фотоэлектрическом калориметре КФК-2 при длине волны 540 нм; определению количества клеток (КК), используя принятую в микробиологии методику (Martins et al., 2023) изменению pH; потреблению РВ и накоплению биомассы (Martins et al., 2023). Определение pH культуральной жидкости проводили на приборе pH-150МИ (Россия). Подсчёт количества клеток проводился на микроскопе OlympusCX43 (Япония) с использованием счетной камеры Горяева. Определение содержания редуцирующих веществ (РВ) и расчёт удельной скорости роста культуры, времени генерации клеток, выхода биомассы микроводорослей проводили по методике, принятой в микробной биотехнологии (Patricia & Mariela, 2005) Количество синтезируемой биомассы определяли взвешиванием осадка, выделенного из культуральной жидкости центрифугированием при 8000 об./мин. в течение 15 минут и последующей сушкой. Содержание белка определялось методом Бредфорда (Watsuji et al., 2021) с использованием спектрофотометра Tecaninfinite M200 Pro(Австрия) при длине волны 595 нм.

Для анализа и аппроксимации полученных данных использовали полиномы 2-й степени, определяющие

тенденцию по изменению показаний РВ, КК и pH сред. Данный метод не определяет точное значение показаний, а лишь указывает на тенденцию динамических систем по абсциссам, как можно уточнить по данным работам (Box et al., 2015).

Полученные экспериментальные результаты и значения погрешностей обрабатывались в программе Microsoft® Excel® (вер.15.05.05501.1000).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что температура культивирования микроводорослей влияет на содержание РВ, оптическую плотность и pH культуральной жидкости (Таблица 1). Установлено, что варьирование температурой глубинного культивирования микроводорослей от 15 до 35 °С благоприятно влияет на ростовые характеристики культуры *D. salina* (Таблица 2). Полученные результаты сопоставимы с данными работами Halme A. (2015). Авторы культивировали *D.salina* на синтетической среде Conway при различных концентрациях NaCl и температуре. Была установлена зависимость концентрации клеток в культуральной жидкости, количество биомассы и количество синтезируемого микроводорослью хлорофилла от температуры и концентрации соли в субстрате. Исследования показали, что для данной питательной среды благоприятными условиями является температура, равная 18 °С и концентрация соли, равная 25 %.

Таблица 1

Влияние температуры культивирования *D. salina* на оптическую плотность, РВ и pH культуральной жидкости при внесении 10 % NaCl в питательную среду к массе мелассы. Продолжительность культивирования 240 ч.

Показатель	Температура культивирования, °С				
	15	20	25	30	35
РВ, %	0,27	0,50	0,36	0,33	0,32
A	0,12	0,13	0,15	0,15	0,15
pH	4,60	5,26	6,27	6,50	7,12

Результаты, представленные в Таблице 2, показывают, что при внесении хлорида натрия в питательную среду в количестве 10 % к массе мелассы с увеличением температуры культивирования увеличивается удельная скорость роста культуры и снижается время генерации клеток.

Данная зависимость прослеживается в работе Wu et al. (2016). Согласно полученным результатам в этой работе, благоприятной температурой культивирования микроводорослей *D. salina* является 25°С.

Таблица 2

Влияние температуры культивирования *D. salina* на питательной среде из мелассы на удельную скорость роста и время генерации клеток при внесении в питательную среду 10 % хлорида натрия к массе мелассы. Продолжительность культивирования 240 ч.

Температура культивирования, °C	Удельная скорость роста культуры, ч ⁻¹	Время деления (генерации) клетки, ч
5	0,1 ± 0,08	6,93 ± 0,26
10	0,3 ± 0,08	2,31 ± 0,26
15	0,7 ± 0,08	0,99 ± 0,26
25	1,0 ± 0,08	0,69 ± 0,26
30	0,7 ± 0,08	0,99 ± 0,26

Исходя из полученных результатов, представленных в Таблице 2, дальнейшие исследования по определению влияния концентрации соли в питательной среде и продолжительности культивирования микроводорослей проводили при температуре 25°C. Следует отметить, что полученные значения согласуются с результатами, представленными в работе Hui et al. (2009), в которой установлено влияние температуры и продолжительности культивирования на ростовые показатели *D.salina*. При этом рекомендованной температурой культивирования *D.salina* в данной работе является 25 °C, обеспечивающей рост биомассы и числа клеток в культуральной жидкости.

На Рисунке 1 представлены результаты, отражающие влияние хлорида натрия и продолжительности культивирования микроводорослей *D. salina* на питательной среде, приготовленной из мелассы, на pH культуральной жидкости. С увеличением продолжительности культивирования до 240 ч наблюдается снижение pH питательной среды. Усвоение микроводорослями минерального и связанного с органическими веществами азота, присутствующего в питательной среде из мелассы, в период культивирования приводит к снижению pH с 7,04 до 4,70.

Взаимное влияние содержания солей в питательной среде из мелассы и продолжительности культивирования микроводорослей на pH культуральной жидкости описывается параболой с максимальным значением точки экстремума 6,05, что совпадает с графическим значением рассматриваемого показателя при продолжительности культивирования 48 ч.

Оптическая плотность культуральной жидкости в период культивирования микроводоросли до 240 ч снижается, что обусловлено ассимилированием микроводорослями красящих веществ (меланоидины и карамели (смеси продуктов, образующихся при термическом разложении сахарозы и моносахаров), присутствующих в питательной среде из мелассы (Рисунок 2).

По истечению 48–384 ч были исследованы полученные результаты значений pH, А, РВ и КК для образцов с концентрацией NaCl 0,5, 15 и 30 % (Рисунок 1, 2, 3 и 4).

В этот период культивирования наблюдается потребление микроводорослями редуцирующих веществ (Рисунок 3) и интенсивный рост микроводорослей, что подтверждается результатами определения КК, представленными на Рисунке 4.

При увеличении продолжительности культивирования микроводорослей более 240 ч наблюдается рост оптической плотности культуральной жидкости, что, видимо,

Рисунок 1

Влияние внесенного NaCl (0; 5; 15; 30 %) и продолжительности культивирования *D. salina* на питательной среде, приготовленной из мелассы, на pH культуральной жидкости при температуре 25 °C

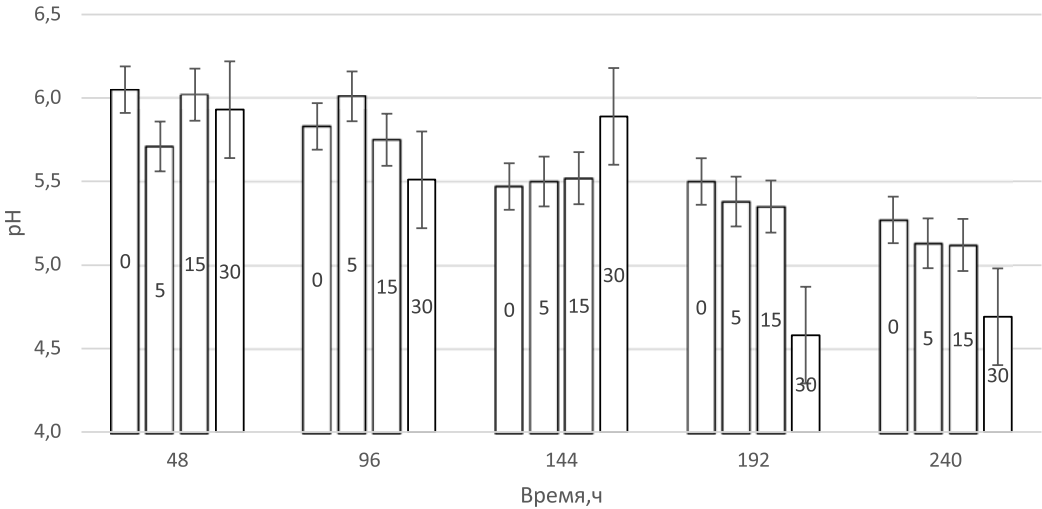
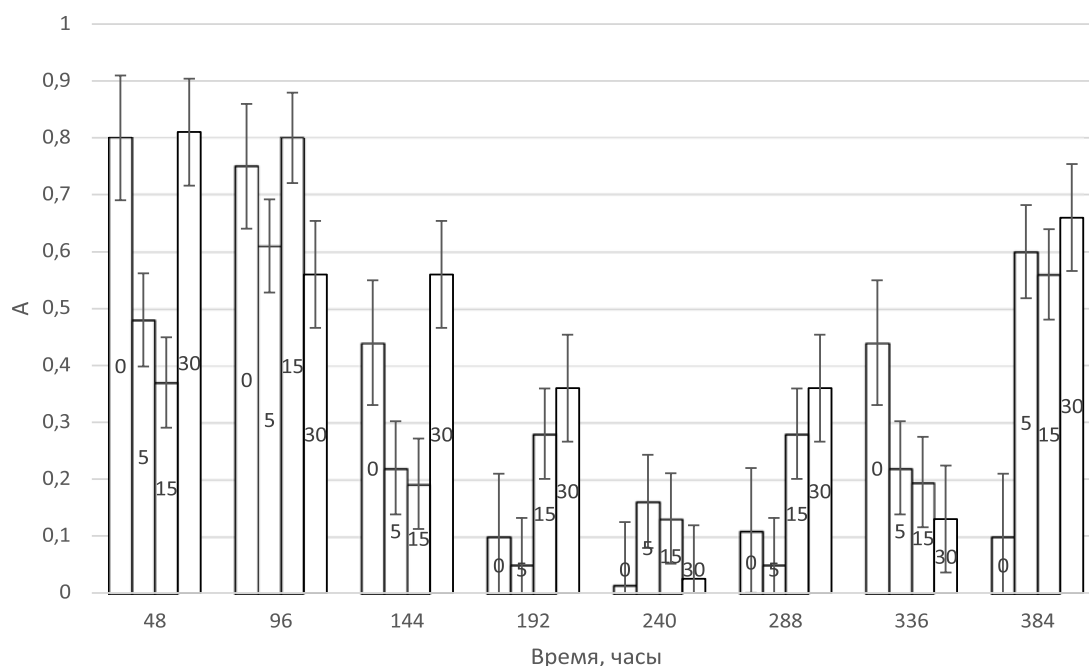


Рисунок 2

Влияние внесенного NaCl (0; 5; 15; 30 %) и продолжительности культивирования на оптическую плотность культуральной жидкости при температуре 25°C



связано с продолжением роста микроводорослей и выделением внеклеточных белковых веществ, в частности, ферментов, гидролизующих углеводы, присутствующие в мелассе.

На биокаталитические реакции гидролиза углеводов в питательной среде из мелассы ферментами, выделяемыми микроводорослями, указывает рост значения РВ в культуральной жидкости (Рисунок 3).

Взаимное влияние содержания соли в питательной среде из мелассы и продолжительности культивирования микроводорослей на оптическую плотность, количество редуцирующих веществ и синтез КК описывается полиномиальными зависимостями, имеющими минимальные и максимальные значения этих показателей при продолжительности культивирования 192 и 384 ч. Полиномиальные зависимости, были использованы для предска-

Рисунок 3

Влияние внесенного NaCl (0; 5; 15; 30 %) и продолжительности культивирования *D. salina* на питательной среде, приготовленной из мелассы, на содержание РВ в культуральной жидкости при температуре 25°C

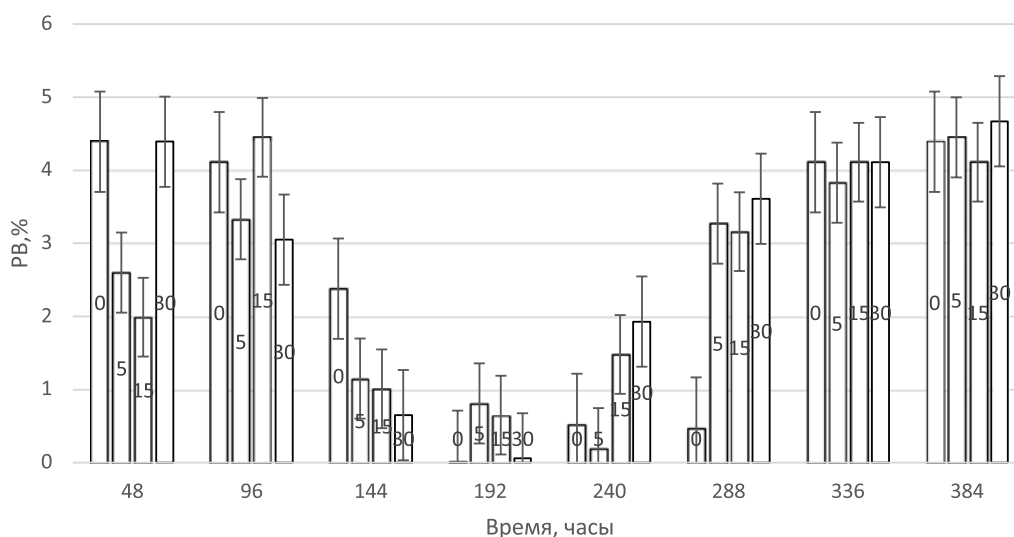
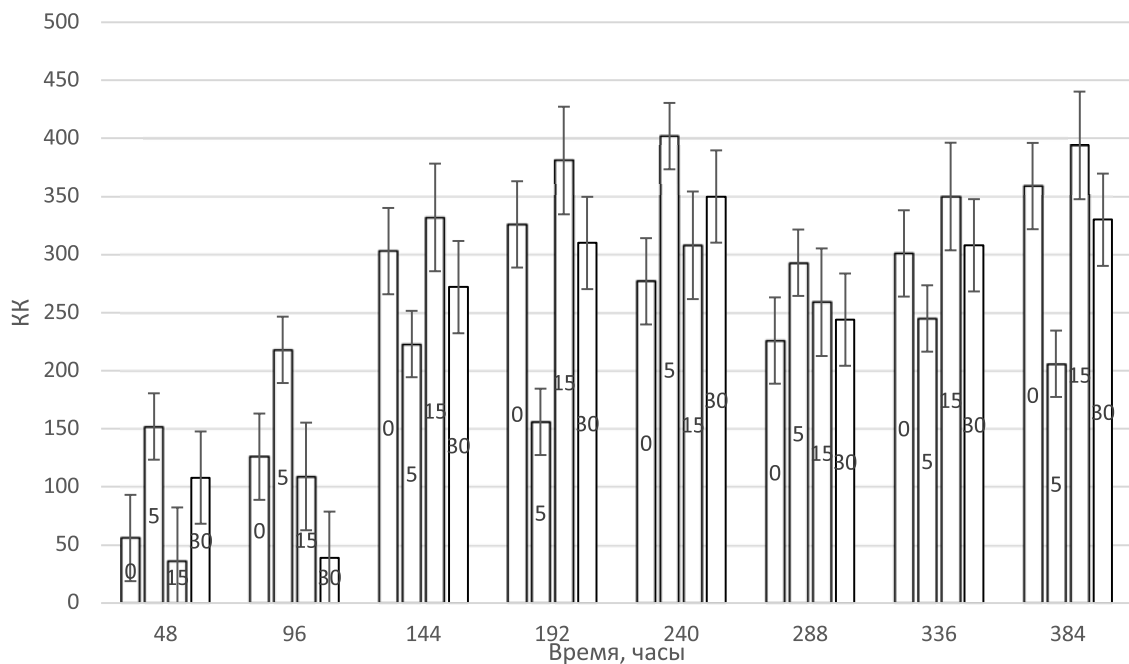


Рисунок 4
Влияние внесенного NaCl (0; 5; 15; 30 %) и продолжительности культивирования *D. salina* на питательной среде из мелассы на значение количества клеток в культуральной жидкости



зания дальнейшего изменения значения при постоянных значениях времени проведения эксперимента.

Расчеты показывают, что на значение величин удельной скорости роста культуры и времени деления клеток оказывает влияние содержание хлорида натрия, внесенного в питательную среду (Таблица 3). Однако, как видно из представленных результатов, культура растет на питательной среде из мелассы без внесения хлорида натрия. Видимо, его присутствие в мелассе положительно сказывается на жизнедеятельности микроводорослей *D. salina*. При этом рассматриваемая культура проявляет галотолерантные свойства без внесения и с внесением 5 % NaCl в питательную среду.

Взаимное влияние содержания соли и времени культивирования на количество синтезируемых клеток, РВ и рН можно описать полиномиальной зависимостью полученных при обработке результатов экспериментов по программе Microsoft® Excel® (вер.15.05.05501.1000). Данные уравнения позволяют обозначить зависимость переменной, выбранной для изучения, и независимой переменной, представленной в данной работе в виде времени культивирования. На Рисунках 1 и 2 формулы имеют квадратичные степени полиномиальных уравнений, что означает увеличение показателей оптической плотности и рН, соответственно, за счет изменения значения каждой зависимой переменной (концентрации NaCl и времени культивирования). В формуле Рисунка 3 виден полином 3-ей степени, где ожидаемое значение РВ

будет меняться на значения, представленные скалярной переменной. Полученные уравнения можно использовать для прогнозирования результатов культивирования *D.salina*, не прибегая к экспериментам.

Таблица 3
Влияние внесенного количества NaCl на удельную скорость роста и время генерации *D. salina* на питательной среде из мелассы при температуре 25°C

Количество внесенного в питательную среду хлорида натрия, %	Удельная скорость роста культуры, ч ⁻¹	Время деления (генерации) клетки, ч
0	0,35 ± 0,06	1,98 ± 0,2
5	0,50 ± 0,06	1,38 ± 0,2
15	0,22 ± 0,06	3,15 ± 0,2
30	0,40 ± 0,06	1,73 ± 0,2

С увеличением содержания хлорида натрия в питательной среде культура *D. salina* проявляет галофильные свойства. Внесение 15 % NaCl вызывает снижение удельной скорости роста и увеличение времени генерации клеток. Данный эффект связан с переходной осмотической адаптацией ввиду синтеза глицерина *D.salina* при увеличении концентрации NaCl в питательной среде, что и обуславливает изменение кинетических характеристик роста микроводоросли по сравнению с экспериментами, в которых концентрация NaCl была 0,5 и 30 %.

Полученные в работе результаты согласуются с установленными зависимостями в работе А. Орен (2014), в которой указывается изменение КОЕ в зависимости от концентрации соли в питательной среде и времени культивирования. Улучшению кинетических характеристик культуры способствует увеличение содержания хлорида натрия в питательной среде до 30 %, что приводит к переходу культуры из галотолерантной в галофильную физиологическую активность. Однако, наилучшие кинетические характеристики роста культуры *D. salina* проявляются в галотолерантной физиологической активности.

Следует отметить, что выход биомассы микроводорослей *D. salina* при культивировании на питательной среде без внесения и при внесении в питательную среду из мелассы 5 % NaCl выше по сравнению с внесением в питательную среду 15 и 30 % NaCl. В то же время содержание белка в культуральной жидкости ниже по сравнению с содержанием белка в культуральной жидкости, в которую вносили 15 и 30 % NaCl (Таблица 4).

Таблица 4

Влияние внесенного количества NaCl на выход биомассы и синтез белка при температуре культивирования *D. salina* 25°C

Количество внесенного в питательную среду хлорида натрия, %	Выход биомассы, %	Содержание белка, мг/мл
0	48 ± 3,5	0,61 ± 0,09
5	58 ± 3,5	0,56 ± 0,09
15	42 ± 3,5	0,63 ± 0,09
30	31 ± 3,5	0,80 ± 0,09

Из полученных результатов следует, что значения времени генерации и скорость роста культуры меньше, чем значения данных параметров у экспериментов, полученных при изучении влияния температуры на рост культуры. Это можно объяснить тем, что влияние температуры на кинетические параметры имеет более выраженный характер, чем влияния концентрации NaCl на рост культуры. По результатам, представленным в Таблице 2, видно, что значения удельного роста культуры после 25°C имеют схожие параметры как при 15°C, поэтому можно указывать на целесообразную температуру культивирования 25°C. По представленным графикам с полиномиальными моделями можно выразить зависимости исследуемых параметров от зафиксированных параметров культивирования.

Показано, что при увеличении продолжительности культивирования микроводорослей *D. salina* свыше 240 ч в питательной среде из мелассы наблюдается увеличение редуцирующих веществ. Видимо, это обусловлено

присутствием в культуральной жидкости специфических белков, в частности, фермента β-фруктозидазы. Это подтверждается определением β-фруктозидазной активности культуральной жидкости после окончания культивирования микроводорослей (Таблица 5).

Таблица 5

Влияние внесенного количества NaCl в питательную среду из мелассы на ферментативную активность *D. salina* при температуре 25°C

Количество внесенного в питательную среду хлорида натрия, %	β-фруктозидазная активность, мкмоль/мл
0	1,7 ± 0,02
5	3,3 ± 0,02
15	1,6 ± 0,02
30	3,0 ± 0,02

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что внесение хлорида натрия в питательную среду из свекловичной мелассы для культивирования *D. salina* влияет на рост биомассы и синтез белковых веществ.

Внесение хлорида натрия в питательную среду из мелассы влияет на физиологическую активность микроводорослей *D. salina*, выделенных из Кояшского озера. При этом создание условий для проявления культурой *D. salina* галотолерантных свойств предпочтительней, так как при культивировании на питательной среде из мелассы наблюдается более высокая удельная скорость роста культуры, достигающая (0,5 ч⁻¹), меньшее значение времени генерации клеток (1,38 ч) и больший выход биомассы (58 %) по сравнению с проявлением этой культурой галофильных свойств. Установлено, что концентрация NaCl влияет на показатели усвояемости углеводов свекловичной мелассы при большей концентрации соли и при значениях температуры 15–25 °C.

Культивирование микроводорослей *D. salina* на питательной среде из мелассы сопровождается ассимилированием всех источников углерода, присутствующих в мелассе: красящие вещества, меланоидины, карамели, сахара и другие углеводсодержащие вещества и, соответственно, увеличением концентрации клеток до 4·10⁷ кл/мл в культуральной жидкости, которые необходимо контролировать подсчетом. Косвенный метод оценки количества клеток по оптической плотности культуральной жидкости не пригоден в связи с присутствием красящих веществ, которые усваиваются микроводорослями.

При культивировании на питательной среде из мелассы микроводоросли *D. salina* синтезируют вторичные продукты метаболизма — внеклеточные белки со специфическими свойствами, в частности, фермент с β -фруктозидазной активностью 3,0 мкмоль/мл, который способствует образованию редуцирующих веществ в питательной среде из сахарозы.

Полученные результаты исследований показывают возможность использования мелассы свекловичной в присутствии хлорида натрия до 30 % в качестве источника углерода и веществ, стимулирующих рост *D. salina*. При этом выход биомассы может достигать до 58 % и концентрации белковых веществ в культуральной жидкости до 0,8 мг/мл.

ВКЛАД АВТОРОВ

Иксанов Р. А.: применение статистических, математических или других формальных методов для анализа или

синтеза данных исследования, разработка или проектирование методологии исследования, подготовка и создание черновика рукописи, в частности написание первоначального текста рукописи.

Канарский А. В.: концептуализация, разработка методологии исследования, валидация данных, предоставление учебных материалов, реагентов, материалов, пациентов, лабораторных образцов, животных, приборов, вычислительных ресурсов или других инструментов анализа.

Канарская З. А.: визуализация/представление данных, подготовка и создание рукописи, её комментирование или пересмотр, включая этапы до или после публикации рукописи.

Гематдинова В. М.: отслеживание воспроизводимости результатов/экспериментов и других результатов исследований, надзор и руководство за планированием и выполнением исследовательской деятельности, включая наставничество.

ЛИТЕРАТУРА

- Али-заде, Г. И., Сулейманова, Л. М., & Джалилова, А. Р. (2020). Биосинтез пигментов в клетках *Dunaliella Salina* IPPAS D-294, модифицированных ионолом при высокой солёности в оптимальном и низкотемпературном режимах культивирования. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, (2), 9–14.
- Баймурзаев, Е. Н., Тонких, А. К., & Верушкина, О. А. (2022). Особенности культивирования аральского штамма *Dunaliella salina* AR-1 на открытом воздухе. *Universum: химия и биология*, 11, 39–42. <http://dx.doi.org/10.32743/2022.101.11.14493>
- Боровков, А. Б., & Гудвиллович, И. Н. (2012). Ростовые и биохимические показатели квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina*. *Biotechnology. Acta*, 5(3), 105–111.
- Боровков, А. Б., & Гудвиллович, И. Н. (2019). Апробация двухстадийного выращивания *Dunaliella salina* в Севастопольском регионе. *Вопросы современной альгологии*, (2), 211–220. <http://dx.doi.org/10.18470/1992-1098-2019-2-211-220>
- Рязанцев, К. О., & Муратов, А. В. (2021). Исследование антиоксидантной активности биомассы водоросли *Dunaliella salina*. В *Горизонты биофармацевтики* (с. 116–118). Курский государственный медицинский университет.
- Ха, З. Т., Канарский, А. В., Канарская, З. А., Щербаков, А. В., & Щербакова, Е. Н. (2019). Эффективность культивирования бактерий рода *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде на основе сахарозы. Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств», 3, 62–72.
- Ха, Т. З., Канарский, А. В., & Канарская, З. А. (2020). Эффективность культивирования бактерий *Paenibacillus* на ферментализатах клетчатки рисовой шелухи. *Химия растительного сырья*, (2), 271–282. <http://dx.doi.org/10.14258/jcprm.2020026687>
- Akpolat, C., Ventosa, A., Birbir, M., Sánchez-Porro, C., & Caglayan, P. (2015). Molecular identification of moderately halophilic bacteria and extremely halophilic archaea isolated from salted sheep skins containing red and yellow discolorations. *Journal of American Leather Chemists Association*, 100(7), 211–226.
- Alva, M., Norena-Barroso, E., Guerra-Castro, E., Albarrán, I., Barreto, A., & Gaxiola, G. (2022). Fatty acid profile and productivity variation during the growth of *Dunaliella* sp. under different photon flux densities and glycerol concentrations. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 50, 236–250. <http://dx.doi.org/10.3856/vol50-issue2-fulltext-2815>
- Baati, H., Mariam, S., Azri, C., Ammar, E., & Trigui, M. (2022). Hydrolytic enzyme screening and carotenoid production evaluation of halophilic archaea isolated from highly heavy metal-enriched solar saltern sediments. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53, 1893–1906. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-022-00855-6>
- Borovkov, A. B., Gudvilovich, I. N., & Avsiyan, A. L. (2020). Scale-up of *Dunaliella salina* cultivation: from strain selection to open ponds. *Journal of Applied Phycology*,

- 32, 1545–1558. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-020-02104-5>
- Borovkov, A. B., Gudvilovich, I. N., Avsiyan, A. L., & Lantushenko, A. O. (2021). Light supply and mineral nutrition conditions as optimization factors for outdoor mass culture of carotenogenic microalga *Dunaliella salina*. *Aquaculture Research*, 52, 6098–6106. <http://dx.doi.org/10.1111/are.15471>
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of royal statistical society series B*, 13, 1–38.
- Cakmak, Y. S., Kaya, M., & Asan-Ozusaglam, M. (2014). Biochemical composition and bioactivity screening of various extracts from *Dunaliella salina*, a green microalga. *EXCLI Journal*, 13, 679–690. <http://dx.doi.org/10.17877/DE290R-6669>
- Chen, H., Jiang, J. G., & Wu, G.H. (2009). Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Journal Agric Food Chemistry*, 57, 6178–82. <https://doi.org/10.1021/jf900447r>
- Gastelum-Franco, J. J., Esparza-Leal, H. M., García-Ulloa, M., López-Álvarez, E. S., Muy-Rangel, M. D., Pérez-Rubio, V., Ulloa-Mercado, R. G., & Montiel-Montoya, J. (2021). Preliminary evaluation of the green microalga *Dunaliella salina* as a potential feedstock for biodiesel: effect of molasses on growth and lipid profile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49, 763–772. <http://dx.doi.org/10.3856/vol49-issue5-fulltext-2755>
- Gómez, P. I., & González, M. A. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological research*, 38(2–3), 151–162. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602005000200005>
- Gonabadi, E., Samadlouie, H. R., & Shafari Zenoozian, M. (2022). Optimization of culture conditions for enhanced *Dunaliella salina* productions in mixotrophic culture. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52, 154–162. <http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2021.1922917>
- Halme, A. (2015). Polynomial operators for nonlinear systems analysis. *Mathematics and Computer Machine Series*, (24). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4970.8649>
- Jungmann, L., Hoffmann, S. L., Lang, C., De Agazio, R., Becker, J., Kohlstedt, M., & Wittmann, Ch. (2022). High-efficiency production of 5-hydroxyectoine using metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 274. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-022-02003-z>
- Kalaitzidou, M. P., Alvanou, M. V., Papageorgiou, K. V., Lattos, A., Sofia, M., Kritas, S. K., Petridou, E., & Giantsis, I. A. (2022). Pollution indicators and HAB-associated halophilic bacteria alongside harmful cyanobacteria in the largest mussel cultivation area in Greece. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9), 5285. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph19095285>
- Khayyal, M. T., El-Baz, F. K., Meselhy, M. R., Ali, G. H., & El-Hazek, R. M. (2019). Intestinal injury can be effectively prevented by *Dunaliella salina* in gamma-irradiated rats. *Heliyon*, 5(5), e01814. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01814>
- Kumudha, A., & Sarada, R. (2016). Characterization of vitamin B12 in *Dunaliella salina*. *Journal Food Science Technology*, 53, 888–894. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-015-2005-y>
- Martínez, G. M., Pire, C., & Martínez-Espinosa, R. M. (2022). Hypersaline environments as natural sources of microbes with potential applications in biotechnology: The case of solar evaporation systems to produce salt in Alicante County (Spain). *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100136>
- Martins, A., Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., & Pedrosa, R. (2023). Sulfated polysaccharides from macroalgae – a simple roadmap for chemical characterization. *Polymers*, 15(2), 399. <http://dx.doi.org/10.3390/polym15020399>
- Moghaieb, R., Abdallah, A., Sharaf, A., Abdallah, N., Samra, B., & Al-Gozyer, R. (2018). Characterization of salt tolerance in four halophytic bacteria strain isolated from solar saltern at Alexandria-Egypt. *Bioscience Research*, 15, 1905–1916. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.32083.12322>
- Oren, A. (2014). The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21, 23. <https://doi.org/10.1186/s40709-014-0023-y>
- Silva, M. R., Moura, A. S., Converti, A., Porto, A., Viana, D., & Bezerra, R. P. (2021). Assessment of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: A systematic review. *Algal Research*, 8(1), 102396. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2021.102396>
- Watsuji, T., Naka, A., & Morita, Y. (2021). Effect of temperature and dissolved oxygen on gravity sedimentation of the unicellular alga *Dunaliella salina*. *Annals of Microbiology*, 71, 25. <https://doi.org/10.1186/s13213-021-01636-6>
- Wu, Z., Promchup, D., Pu, Z., Nirani, J., & Chunhong, M. (2016). The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur Journal Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.5812/jjm.26732>
- Xi, Y., Zhang, J., Kong, F., Chi J., & Chi Z. (2022). Kinetic modeling and process analysis for photo-production of β -carotene in *Dunaliella salina*. *Bioresources and Bioprocess*, 9, 4. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-1017195/v1>
- Xu, Y., & Harvey, P. J. (2019). Carotenoid production by *Dunaliella salina* under red light. *Antioxidants*, 8(5), 123. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox8050123>