

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.342
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-180-189>

Поступила в редакцию 12.12.2018
Received 12.12.2018

Н. В. Козел¹, М. С. Радюк¹, Т. В. Самович¹, И. А. Дремук¹, Л. С. Габриелян²

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА НИТРАТРЕДУКТАЗЫ В КЛЕТКАХ *SPIRULINA PLATENSIS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Аннотация. Исследовано влияние светодиодного освещения разного спектрального состава на продуктивность *Spirulina platensis*, накопление в ее клетках белка и экспрессию гена нитратредуктазы. Показано, что при светодиодном освещении с преобладанием красной составляющей в спектре излучения продуктивность водоросли на 9–29 % больше, чем при освещении люминесцентной лампой. Использование одного синего света существенно (на 83 %) уменьшает продуктивность *Spirulina platensis*, что, по-видимому, обусловлено отсутствием в спектральном составе осветителя желтой и красной составляющих, которые наиболее эффективно поглощаются фикоцианином. Выявлена положительная корреляция между возрастанием продуктивности водоросли и накоплением в ее клетках белка. Так, при использовании осветителя с красными светодиодами содержание белка увеличилось на 21 % в расчете на 1 г сухого веса и на 47 % в расчете на 1 л суспензии по отношению к контролю. Анализ экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках *Spirulina platensis*, не выявил прямой зависимости между накоплением белка и уровнем экспрессии гена *Nar* в наиболее перспективном (в плане выхода биомассы и накопления белка) варианте с использованием красных светодиодов. Это указывает на определяющую роль фотосинтетической активности клеток *Spirulina platensis* в увеличении продуктивности и синтеза белка.

Ключевые слова: *Spirulina platensis*, сухой вес, белок, нитратредуктаза, фотосинтетически активный свет, спектральный состав, светодиоды

Для цитирования: Накопление белка и экспрессия гена нитратредуктазы в клетках *Spirulina platensis* в зависимости от спектрального состава светодиодного излучения / Н. В. Козел [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 180–189. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-180-189>

N. V. Kozel¹, M. S. Radyuk¹, T. V. Samovich¹, I. A. Dremuk¹, L. S. Gabrielyan²

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Yerevan State University, Yerevan, Armenia

PROTEIN ACCUMULATION AND EXPRESSION OF THE NITRATE REDUCTASE GENE IN *SPIRULINA PLATENSIS* CELLS DEPENDING ON THE SPECTRAL COMPOSITION OF LED RADIATION

Abstract. The effect of LED lighting of different spectral composition on the productivity of *Spirulina platensis*, an accumulation of protein in alga cells and an expression of the nitrate reductase gene has been studied. It was shown that LED lighting with a predominance of the red component in the emission spectrum allows achieving 9–29 % higher alga productivity compared to using fluorescent lamp illumination. Illumination with single blue light resulted in significant (83 %) decrease in the productivity of *Spirulina platensis* which apparently was due to the absence of the yellow and red components in the illuminator spectral composition, which are most effectively absorbed by phycocyanin. A positive correlation between an increase in the productivity of alga and the accumulation of protein in its cells was found. So, by using an illuminator with red LEDs, the protein content increased by 21 % calculated per gram of dry weight and 47 % calculated per liter of suspension relative to the control. Analysis of the expression of the *Nar* gene encoding nitrate reductase in *Spirulina platensis* cells did not reveal a direct dependence between an increasing protein accumulation and an expression level of the *Nar* gene in the most promising in terms of biomass and protein yield sample of alga, growing under red LEDs. This indicates the crucial role of the photosynthetic activity of *Spirulina platensis* cells in increasing productivity and protein synthesis.

Keywords: *Spirulina platensis*, dry weight, protein, nitrate reductase, photosynthetically active light, the spectral composition of the LEDs

For citation: Kozel N. V., Radyuk M. S., Samovich T. V., Dremuk I. A., Gabrielyan L. S. Protein accumulation and expression of the nitrate reductase gene in *Spirulina platensis* cells depending on the spectral composition of led radiation. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 2, pp. 180–189 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2019-64-2-180-189>

Введение. Синезеленая водоросль (цианобактерия) *Spirulina platensis* (*S. platensis*) наряду с *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* и различными видами *Chlorella* является основным объектом промышленного культивирования микроводорослей и широко используется для получения биомассы, обогащенной биологически активными веществами – β -каротином, фикоцианином, полиненасыщенными жирными кислотами [1]. Известно, что *S. platensis*, клетки которой накапливают большое количество (до 70 % от сухого веса) белка [1, 2], является лидером по содержанию белка среди живых организмов, в 2 раза превосходя по этому показателю сою, содержание белка в которой составляет около 35 % [1]. Белок *S. platensis* содержит все незаменимые аминокислоты, которые не могут быть синтезированы животными организмами, но, в отличие от заменимых аминокислот, должны поступать с пищей. Эти аминокислоты необходимы для нормального роста и развития, а также для поддержания оптимального физиологического состояния организма человека и животных. Однако в зависимости от условий культивирования водоросли содержание белка в клетках *S. platensis* может существенно различаться. Наряду с такими важными факторами, как обеспеченность элементами минерального питания и температурные условия культивирования, ключевую роль в плане выхода биомассы и накопления в клетках *S. platensis* белка играет световой фактор. Причем важным является не только уровень освещенности водоросли, но и спектральный состав фотосинтетически активного света [3].

Существенную роль в накоплении белка в клетках многих фотосинтезирующих организмов играет также ассимиляция неорганического азота, который входит в состав белков и нуклеиновых кислот. Свободный азот воздуха растения (кроме бобовых) усваивать не могут. Большинство растительных организмов получают его в основном в виде нитратов. Ключевым ферментом в цепи восстановления нитрата до нитрита, а затем до аммония является нитратредуктаза. В отличие от высших растений, ассимиляция нитратов в клетках *S. platensis* изучена недостаточно. Остается неясным, каким образом клетки водоросли регулируют свой метаболизм, чтобы синтезировать такое большое количество белка. Возможно, это связано с тем, что нитратредуктаза *S. platensis* имеет большую специфическую активность и стабильность, чем нитратредуктаза высших растений, в частности риса [4]. Кроме того, при недостатке в среде обитания нитратов клетки *S. platensis* в большей степени, чем другие организмы, способны к утилизации всех доступных источников азота (нитритов и аммония) [5]. В литературе имеются данные о транскрипционной и посттрансляционной регуляции в высших растениях нитратредуктазы внешними стимулами, в том числе и светом [6]. По нашему мнению, и в клетках фототрофных микроорганизмов, в частности *S. platensis*, при существенном изменении спектрального состава освещения могут проявляться подобные регуляторные механизмы, направленные на адаптацию системы ассимиляции неорганического азота к изменяющимся условиям окружающей среды. Так как с процессами превращения азота в клетках растительных организмов, в том числе и водорослей, непосредственно связана их продуктивность, выяснение влияния светодиодного освещения разного спектрального состава на систему ассимиляции неорганического азота представляется весьма актуальным.

Следует отметить, что промышленное культивирование *S. platensis* в климатических условиях Беларуси связано с большими затратами на освещение. В то же время использование в процессе выращивания этой водоросли энергоэффективных источников света на основе светодиодов позволит снизить затраты на производство *S. platensis*, а подбор оптимального спектрального состава осветителей даст возможность получать больше продукции, обладающей высокой питательной ценностью. Светодиодные источники освещения являются наиболее перспективными для выращивания фотосинтезирующих организмов, в том числе и водорослей [7, 8]. Это обусловлено низким энергопотреблением, высоким коэффициентом светоотдачи и длительным сроком службы таких источников, а кроме того, светодиоды позволяют сконструировать осветители с определенным спектральным составом излучения, что крайне важно при разработке высокоэффективного источника фотосинтетически активного света.

Цель данной работы – выявление особенностей накопления белка, а также экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу, в клетках *S. platensis* в условиях светодиодного освещения разного спектрального состава.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали трихомную синезеленую водоросль (цианобактерию) *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler (штамм IBCE S-2 из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси) [9]. Водоросль выращивали на стандартной среде Заррука [1] по методу, модифицированному согласно работе [10], в стеклянных емкостях в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре 27 ± 2 °С в течение 96 ч. Для выращивания *S. platensis* использовали осветители, содержащие красный и синий светодиоды и их комбинации (красный:синий – 2:1 по энергии излучения), а также осветитель, в спектре излучения которого содержался дополнительно желтый и голубой свет (красный:желтый:голубой:синий – 3:3:1:1 по энергии излучения). В качестве контроля использовали энергосберегающую люминесцентную лампу Philips PL-S 11W/827. Интенсивности световых потоков лампы и светодиодных осветителей изначально были выравнены по плотности потока фотонов (100 мкмоль квантов/($m^2 \cdot c$)).

Продуктивность *S. platensis* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензии в зеленой области спектра при 560 нм на спектрофотометре Solar PB2201 (Беларусь). Поглощение при 560 нм соответствует минимуму поглощения пигментов *S. platensis* (рис. 1), поэтому ослабление светового потока в этой области спектра практически полностью обусловлено лишь самой массой клеток. Для количественного расчета сухой биомассы *S. platensis* использовали формулу, предложенную Ken Sasaki с соавт. [11].

Для определения белка суспензию *S. platensis* осаждали путем центрифугирования на центрифуге Sigma 1-15K (Германия) при 18 000 g, к осадку приливали 0,4 мл 1 н NaOH, встряхивали на вортексе и нагревали на термошейкере Eppendorf (Германия) при температуре 80 °С и постоянном перемешивании. Далее объем доводили дистиллированной водой до 2 мл и центрифугировали при температуре 4 °С и 18 000 g (центрифуга Sigma 1-15K). Надосадочную жидкость переносили в мерные пробирки. Осадок ресуспендировали с 0,2 мл 1 н NaOH и нагревали на термошейкере при температуре 80 °С и постоянном перемешивании. Процедуру повторяли несколько раз до полного извлечения белка [12, 13]. Количество белка определяли

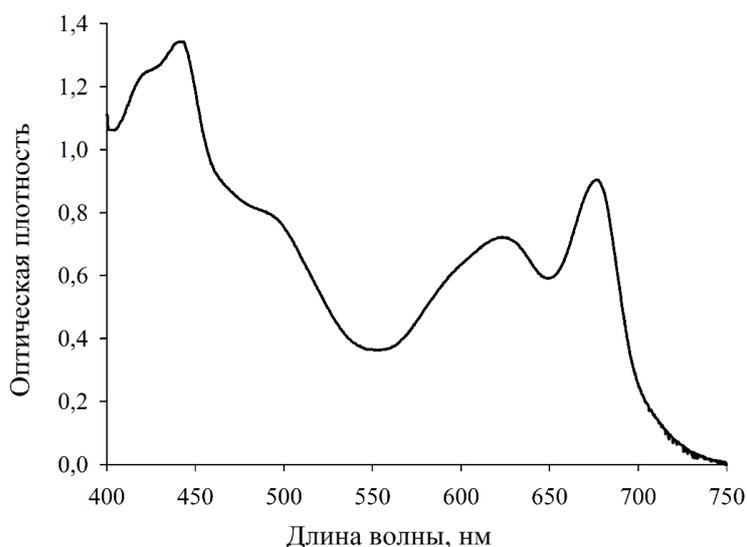


Рис. 1. Спектр поглощения нативной культуры *S. platensis*, полученный на спектрофотометре с интегрирующей сферой СФ-14 («ЛОМО», Россия)

Fig. 1. Absorption spectrum of native culture of *S. platensis*, obtained on a spectrophotometer with integrating sphere SF-14 (LOMO, Russia)

по методу Бредфорд [14]. Для этого к 0,01 мл щелочного раствора белка добавляли 1 мл реактива, содержащего ортофосфорную кислоту и краситель кумасси G-250 (Sigma-Aldrich, США), растворенный в этаноле, и определяли оптическую плотность при 595 и 720 нм. По калибровочной кривой, которую строили с использованием бычьего сывороточного альбумина производства Sigma-Aldrich известной концентрации, определяли количество белка. Уравнение калибровочной кривой: $y = 0,0294x + 0,0049$, $r^2 = 0,9937$, где y – оптическая плотность; x – содержание белка, мкг; r^2 – коэффициент детерминации.

Для анализа экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках *S. platensis*, выращенной при светодиодном освещении с различным спектральным составом, выделяли РНК, на матрице которой синтезировали кДНК. Для выделения РНК использовали TRI Reagent® согласно протоколу фирмы Sigma-Aldrich (sigma-aldrich.com). Синтез кДНК проводили согласно протоколу фирмы ThermoFisher Scientific (thermofisher.com) с помощью RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit в амплификаторе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Полученную кДНК использовали для ПЦР-анализа уровня экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках *S. platensis*, в зависимости от спектрального состава светодиодного освещения.

Подбор праймеров, специфичных к гену *Nar* и гену-нормализатору *16SrRNA*, осуществляли, используя последовательности мРНК выбранных генов, найденных в базе данных Nucleotide (NCBI). Далее при помощи программы Primer Blast NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) подбирали несколько пар специфичных к выбранным генам праймеров с наименьшим количеством шпилек, дуплексов, оптимальным соотношением GC пар и минимальной разницей между температурами плавления. Праймеры синтезировали в лаборатории ДНК-праймеров Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (табл. 1).

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность прямых (F) и обратных (R) праймеров, используемых для анализа экспрессии генов *Nar* и *Sp16S rRNA* в клетках *S. platensis*

Table 1. Nucleotide sequence of forward (F) and reverse (R) primers used to analyze the expression of *Nar* and *Sp16S rRNA* genes in *S. platensis* cells

Ген	Белок	Праймеры	Температура отжига, °C	Продукт, п. н.
<i>Nar</i>	Нитратредуктаза <i>S. platensis</i>	F-ACAAGCTAAACCCGACTGGG R-CGGTTTCGGTCTCAGGACAA5'→3'	62	206
<i>Sp16S rRNA</i>	16S субъединица рибосомы <i>S. platensis</i>	F-AAGTCATCATGCCCTTACG R-AGCGATTCCTCCTTCATGC5'→3'	60	158

ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini Thermal Cycler в следующих условиях: 1) предварительная денатурация – при 95 °C 3 мин; 2) плавление – при 94 °C 30 с; отжиг – при 56–62 °C 45 с; элонгация – при 72 °C 45 с (34 цикла); 3) конечная элонгация – при 72 °C 15 мин; 4) охлаждение – при 5 °C 20 мин. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле, в ТАЕ-буфере (0,04 М Трис-ацетат, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) при напряжении 110 В и токе 144 мА в течение 45–50 мин. Визуализацию геля осуществляли под ультрафиолетовым светом при помощи системы гель-документирования GelDoc 2000 (Bio-Rad, США). Для проверки соответствия линейных размеров полученного ПЦР-продукта теоретически рассчитанным проводили сравнение соответствующих электрофоретических зон с маркером линейных размеров ДНК. Количество белков рассчитывали в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу TotalLab 2.01.

В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее, стандартное отклонение среднего, достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$). Представлены данные 5 опытов в трехкратной биологической повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2016, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [15].

Результаты и их обсуждение. Структура фотосинтетического аппарата *S. platensis* по сравнению с таковой у высших растений и некоторых других видов водорослей имеет ряд отличительных особенностей, например: отсутствие в составе фотосинтетических пигментов хлорофилла *b*, высокое содержание β -каротина, наличие в клетках *S. platensis* большого количества фикоцианина, характерного для синезеленых водорослей, который активно участвует в процессах сбора энергии света, а также в защитных реакциях при окислительном воздействии [16]. Указанные отличительные особенности структуры фотосинтетического аппарата водоросли могут играть ключевую роль в адаптации *S. platensis* к изменению спектрального состава фотосинтетически активного света. В связи с этим для выращивания *S. platensis*, содержащей большое количество фикоцианина и β -каротина, кроме классических красного и синего светодиодов и их комбинации (красный:синий – 2:1 по энергии излучения) нами использован осветитель более сложной конструкции, в спектре излучения которого дополнительно имелись как желтый, так и голубой свет, активно поглощаемые фикоцианином и β -каротином соответственно. В качестве контроля использовали энергосберегающую люминесцентную лампу Philips PL-S 11W/827/2P с цветовой температурой 2700 К (теплого свечения с преобладанием красной полосы испускания). Для корректности проведения сравнительного анализа о влиянии спектрального состава освещения на клетки *S. platensis* показатели интенсивности световых потоков всех источников освещения были выравнены по плотности потока фотонов, которая составляла 100 мкмоль квантов/(м²·с).

Установлено, что при использовании всех вариантов светодиодного освещения, за исключением синего, продуктивность *S. platensis* увеличивалась по сравнению с освещением люминесцентной лампой (контроль) (табл. 2). В частности, при использовании осветителя с красными светодиодами продуктивность водоросли увеличилась на 29 %, а в варианте с совместным использованием красных и синих светодиодов – на 21 % по сравнению с освещением люминесцентной лампой. Наименьший положительный эффект был достигнут в варианте «красный + желтый + голубой + синий» (3:3:1:1 по энергии излучения) – увеличение продуктивности составило 9 % по сравнению с контролем. При использовании одного синего света наблюдалось существенное уменьшение (на 83 %) продуктивности водоросли, основной причиной которого может быть снижение фотосинтетической активности клеток *S. platensis* в связи с отсутствием в спектральном составе освещения желтого и красного света, наиболее эффективно поглощаемого фикоцианином (максимум поглощения фикоцианина – 620 нм). Кроме того, не исключена вероятность и более сложного, не связанного с трансформацией световой энергии в фотосинтетическом аппарате *S. platensis* участия фикоцианина в возбужденном состоянии в регуляции внутриклеточных процессов, что также может быть причиной ингибирования роста водоросли под синим светом.

Отметим, что нами уже отмечалось положительное влияние светодиодного освещения на продуктивность *S. platensis* [17]. Однако полученная нами ранее в экспериментах скорость роста водоросли была достаточно низкой (не более 111 мг сухого веса/л суспензии в сутки) из-за относительно невысокой интенсивности света первых сконструированных нами светодиодных осветителей (75 мкмоль квантов/(м²·с)). Для улучшения светообеспеченности культуры *S. platensis* интенсивность светового потока источников света была увеличена нами на 30 %, а кроме того, путем изменения формы культуральных сосудов была увеличена площадь поверхности суспензии, на которую падает свет, и уменьшена глубина жидкости. Такой подход позволил практически в 3 раза увеличить скорость роста *S. platensis* – до 320 мг сухого веса/л суспензии в сутки (или 2,24 г сухого веса/л суспензии в неделю) (табл. 2), что соответствует литературным данным, полученным для культур с высокой интенсивностью роста [1, 18].

На рис. 2 представлена динамика роста *S. platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips. Уже после 24 ч культивирования наблюдались тенденция к увеличению продуктивности водоросли при использовании красного света и существенное замедление роста на синем свету. Спустя 48 ч культивирования эти различия

стали более существенными и уже достоверно регистрировалась интенсификация роста *S. platensis* при использовании светодиодного освещения с преобладанием красной составляющей в спектре излучения. При дальнейшем культивировании водоросли данный эффект сохранялся.

Таблица 2. Продуктивность и скорость роста *S. platensis* при выращивании водоросли под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль) в течение 96 ч

Table 2. Productivity and growth rate of *S. platensis* during algal growth under LED illuminators and a fluorescent Philips lamp (control) for 96 h

Показатель	Свет				
	Белый (контроль)	Красный	Синий	Красный + синий	Красный + желтый + голубой + синий
Продуктивность, мг сухого веса/л суспензии	992,7 ± 36,8	1281,9 ± 29,7*	168,9 ± 19,0*	1202,2 ± 40,0*	1086,3 ± 30,1*
Скорость роста, мг сухого веса/л суспензии в сутки	248,2 ± 9,2	320,5 ± 7,4*	42,5 ± 4,8*	300,6 ± 10,0*	271,6 ± 7,6*

Примечание. * – различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0,05$. То же в табл. 3.

При существенном увеличении продуктивности водоросли в условиях светодиодного освещения несомненный интерес представляет исследование изменения питательной ценности биомассы, в частности изменение количества белка в клетках *S. platensis* при интенсивном ее росте. Анализ содержания белка в клетках *S. platensis* позволил выявить увеличение его синтеза во всех опытных вариантах по отношению к контролю, за исключением варианта с использованием синего света (табл. 3). Так, при использовании осветителя с красными светодиодами содержание белка увеличилось на 21 %, в варианте с совместным использованием красных и синих светодиодов – на 13 %, а в варианте «красный + желтый + голубой + синий» – на 11 % по сравнению с освещением люминесцентной лампой. При использовании красного света

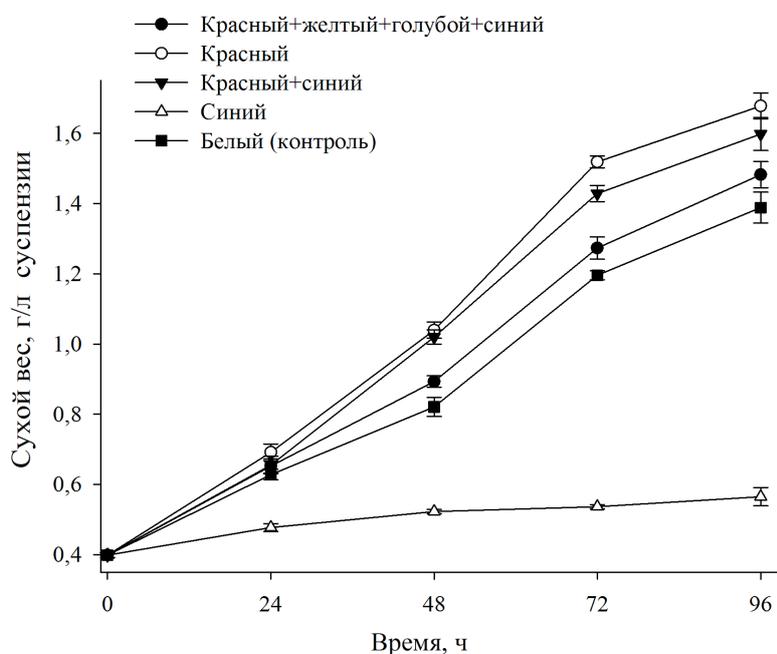


Рис. 2. Динамика накопления биомассы *S. platensis* при выращивании водоросли под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль), $p \leq 0,05$

Fig. 2. Dynamics of *S. platensis* biomass accumulation during algal growth under LED illuminators and Philips fluorescent lamp (control), $p \leq 0.05$

достигнутый нами уровень содержания белка составил 548,8 мг/г сухого веса (т. е. практически 55 % белка от сухого веса), что близко к значениям, получаемым при промышленном культивировании *S. platensis* в условиях естественного освещения [1]. В расчете на 1 л суспензии увеличение количества белка в вариантах со светодиодным освещением с преобладанием красной составляющей в спектре излучения было, соответственно, еще более высоким и достигло 47 % (вариант с красными светодиодами) относительно контроля. Расчет содержания ценных веществ на 1 л суспензии представляет интерес с точки зрения промышленного культивирования водорослей и показывает перспективность направленной модификации спектрального состава фотосинтетически активного света с целью получения суспензии *S. platensis* с высоким содержанием белка.

Таблица 3. Содержание белка и экспрессия гена *Nar* в клетках *S. platensis* при выращивании водоросли под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль) в течение 96 ч

Table 3. Protein content and *Nar* gene expression in *S. platensis* cells during algal growth under LED illuminators and a fluorescent Philips lamp (control) for 96 h

Показатель	Свет				
	Белый (контроль)	Красный	Синий	Красный + синий	Красный + желтый + голубой + синий
Белок, мг/г сухого веса	452,0 ± 22,2	548,8 ± 24,7*	423,2 ± 7,4*	512,5 ± 35,1*	500,1 ± 15,6*
Белок, мг/л суспензии	627,7 ± 30,8	920,8 ± 41,4*	239,1 ± 4,2*	819,1 ± 56,1*	741,3 ± 23,1*
Экспрессия гена <i>Nar</i> , отн. ед.	1,0	1,03 ± 0,06	1,14 ± 0,06*	1,10 ± 0,05*	1,01 ± 0,04

Для выяснения роли нитратредуктазы в увеличении содержания белка в клетках *S. platensis* и возможной регуляции синтеза фермента светом с модифицированным спектральным составом нами проанализирована экспрессия гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках водоросли. Так, осуществлен подбор праймеров, специфичных к гену *Nar* и гену-нормализатору *16SrRNA*, оптимизирован протокол ПЦР-анализа для указанных праймеров и проведен ПЦР-анализ уровня экспрессии гена *Nar* в клетках *S. platensis*, выращенной при разных комбинациях светодиодов. Полученные средние уровни экспрессии гена *Nar* в клетках *S. platensis*, выращенной в условиях светодиодного освещения с разным спектральным составом, представлены в табл. 2. За 1,0 принят уровень экспрессии гена *Nar* в клетках *S. platensis*, выращенной под белым светом (контроль).

Выявлена тенденция к увеличению экспрессии гена *Nar* во всех опытных вариантах по отношению к контролю. Наиболее высокий уровень экспрессии гена *Nar* в клетках *S. platensis* зафиксирован в варианте с использованием только синего света в качестве фотосинтетически активного (на 14 % больше по сравнению с контролем), а также в варианте с использованием совместно красного и синего светодиодов (на 10 % больше контроля). Возможно, такая стимуляция экспрессии гена *Nar* синим светом связана с наличием в составе нитратредуктазы флавина, который активно поглощает свет в этой области спектра [19]. Отсутствие прямой корреляции между экспрессией гена *Nar* и накоплением белка при использовании только синего света, видимо, связано с существенным снижением фотосинтетической активности клеток *S. platensis* из-за отсутствия в спектральном составе освещения желтого и красного света, наиболее эффективно поглощаемого фикоцианином, что является лимитирующим фактором, ограничивающим накопление белка в клетках водоросли. Кроме того, следует отметить, что при использовании осветителя с красными светодиодами достоверного увеличения экспрессии гена *Nar* нами не зафиксировано, несмотря на то что этот вариант освещения позволил добиться максимального увеличения продуктивности и накопления белка в клетках *S. platensis*. Этот экспериментальный факт также указывает на определяющую роль фотосинтетической активности клеток *S. platensis* в увеличении продуктивности и синтеза белка.

Заклученне. Таким образом, показано, что светодиодное освещение с преобладанием красной составляющей в спектре излучения позволяет достичь на 9–29 % большей продуктивности водоросли по сравнению с освещением люминесцентной лампой. Использование одного синего света приводило к существенному уменьшению (на 83 %) продуктивности *S. platensis*, что, по-видимому, обусловлено отсутствием в спектральном составе осветителя желтой и красной составляющих, которые наиболее эффективно поглощаются фикоцианином. Выявлена положительная корреляция между возрастанием продуктивности водоросли и накоплением в ее клетках белка. Так, при использовании осветителя с красными светодиодами содержание белка увеличилось на 21 % в расчете на 1 г сухого веса и на 47 % в расчете на 1 л суспензии по отношению к контролю. Анализ экспрессии гена *Nar*, кодирующего нитратредуктазу в клетках *S. platensis*, не выявил прямой зависимости между накоплением белка и уровнем экспрессии гена *Nar* в наиболее перспективном (в плане выхода биомассы и белка) варианте с использованием красных светодиодов. Это указывает на определяющую роль фотосинтетической активности клеток *S. platensis* в увеличении продуктивности и синтеза белка. В целом полученные результаты показали перспективность направленной модификации спектрального состава фотосинтетически активного света с целью увеличения продукции белка клетками водорослей.

Список использованных источников

1. Soni, R. A. *Spirulina* – from growth to nutritional product: a review / R. A. Soni, K. Sudhakar, R. S. Rana // Trends Food Sci. Technol. – 2017. – Vol. 69. – P. 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
2. Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis* / T. Zhou [et al.] // Bioresource Technol. – 2018. – Vol. 269. – P. 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.131>
3. Продуктивность спирулины при использовании источников света разного типа / С. С. Мельников [и др.] // Вест. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2011. – № 3. – С. 41–45.
4. *Spirulina* nitrate-assimilating enzymes (NR, NiR, GS) have higher specific activities and are more stable than those of rice / A. Ali [et al.] // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2008. – Vol. 14, N 3. – P. 179–182. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0017-z>
5. Jha, P. Nitrate induction of nitrate reductase and its inhibition by nitrite and ammonium ions in *Spirulina plantensis* / P. Jha, A. Ali, N. Raghuram // Physiol. Mol. Biol. Plants. – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. 163–167.
6. Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site / K. Fischer [et al.] // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17, N 4. – P. 1167–1179. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029694>
7. Применение светодиодных светильников для освещения теплиц: реальность и перспективы / И. Бахарев [и др.] // Современные технологии автоматизации. – 2010. – № 2. – С. 76–82.
8. Фотосинтез и продуктивность растений картофеля в условиях различного спектрального облучения / Ю. Ц. Мартиросян [и др.] // С.-х. биология. – 2013. – № 1. – С. 107–112.
9. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / Нац. акад. наук Беларусі, Ин-т биологии и клеточной инженерии; сост.: С. С. Мельников [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 101 с.
10. Пиневиц, В. В. Изучение *Spirulina platensis* – нового объекта для высокоинтенсивного культивирования / В. В. Пиневиц, Н. Н. Верзилин, А. А. Михайлов // Физиол. раст. – 1970. – № 5. – С. 1037–1046.
11. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* / K. Sasaki [et al.] // J. of Fermentation and Bioengineering. – 1995. – Vol. 79, N 5. – P. 453–457. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)91261-3](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)91261-3)
12. Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis* / B. Wang [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, N 9. – P. e106679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106679>
13. Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content / N. Parimi [et al.] // Front. Energy Res. – 2015. – Vol. 3. – Art. 30. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00030>
14. Bradford, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. A. Bradford // Analyt. Biochem. – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
15. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – 3-е изд., испр. – Минск: Вышэйш. шк., 1973. – 320 с.
16. Fernández-Rojas, B. Nutraceutical properties of phycocyanin / B. Fernández-Rojas, J. Hernández-Juárez, J. Pedraza-Chaverri // J. Functional Foods. – 2014. – Vol. 11. – P. 375–392. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>
17. Влияние спектрального состава светодиодного излучения на структуру фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis* / Н. В. Козел [и др.] // Вест. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 2. – С. 44–48.
18. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine / Y. Chang [et al.] // Appl. Energy. – 2013. – Vol. 102. – P. 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.024>
19. Кузнецов, В. В. Физиология растений / В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева. – 2-е изд. – М.: Высш. шк., 2006. – 742 с.

References

1. Soni R. A., Sudhakar K., Rana R. S. *Spirulina* – from growth to nutritional product: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 2017, vol. 69, pp. 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
2. Zhou T., Wang J., Zheng H., Wu X., Wang Y., Liu M., Xiang S., Cao L., Ruan R., Liu Y. Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 2018, vol. 269, pp. 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.131>
3. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Samovich T. V., Budakova E. A., Shalygo N. V. *Spirulina's* productivity when using different types of light sources. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2011, no. 3, pp. 41–45 (in Russian).
4. Ali A., Jha P., Sandhu K. S., Raghuram N. *Spirulina* nitrate-assimilating enzymes (NR, NiR, GS) have higher specific activities and are more stable than those of rice. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2008, vol. 14, no. 3, pp. 179–182. <https://doi.org/10.1007/s12298-008-0017-z>
5. Jha P., Ali A., Raghuram N. Nitrate induction of nitrate reductase and its inhibition by nitrite and ammonium ions in *Spirulina plantensis*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2007, vol. 13, no. 2, pp. 163–167.
6. Fischer K., Barbier G. G., Hecht H.-J., Mendel R. R., Campbell W. H., Schwarz G. Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site. *Plant Cell*, 2005, vol. 17, no. 4, pp. 1167–1179. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029694>
7. Bakharev I., Prokof'ev A., Turkin A., Yakovlev A. The use of LED lamps for lighting greenhouses: reality and prospects. *Sovremennyye tekhnologii avtomatizatsii* [Modern automation technology], 2010, no. 2, pp. 76–82 (in Russian).
8. Martirosyan Yu. Ts., Polyakova M. N., Dilovarova T. A., Kosobryukhov A. A. Photosynthesis and productivity of potato plants under different spectral irradiation. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural biology], 2013, no. 1, pp. 107–112 (in Russian).
9. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A., Shalygo N. V. (compl.). *Catalog of the genetic fund of economically useful algae species*, Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
10. Pinevich V. V., Verzilin N. N., Mikhailov A. A. The study of *Spirulina platensis* – a new facility for high-intensity cultivation. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 1970, no. 5, pp. 1037–1046 (in Russian).
11. Sasaki K., Marquez F. J., Nishio N., Nagai S. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, vol. 79, no. 5, pp. 453–457. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)91261-3](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)91261-3)
12. Wang B., Zhang Z., Hu Q., Sommerfeld M., Lu Y., Han D. Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 9, p. e106679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106679>
13. Parimi N., Singh M., Kastner J. R., Das K. C., Forsberg L. S., Azadi P. Optimization of protein extraction from *Spirulina platensis* to generate a potential co-product and a biofuel feedstock with reduced nitrogen content. *Frontiers in Energy Research*, 2015, vol. 3, art. 30. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00030>
14. Bradford M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
15. Rokitskii P. F. *Biological statistics. 3rd ed.* Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 320 p. (in Russian).
16. Fernández-Rojas B., Hernández-Juárez J., Pedraza-Chaverri J. Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 2014, vol. 11, pp. 375–392. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>
17. Kozel N. V., Domanskii V. P., Manankina E. E., Adamchik K. O., Dremuk I. A., Savina S. M. The influence of the spectral composition of LED radiation on the structure of the photosynthetic apparatus *Spirulina platensis*. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2015, no. 2, pp. 44–48 (in Russian).
18. Chang Y., Wu Z., Bian L., Feng D., Leung D. Y. C. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine. *Applied Energy*, 2013, vol. 102, pp. 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.024>
19. Kuznetsov V. V., Dmitrieva G. A. *Plant physiology. 2nd ed.* Moscow, Vysshaya shkola Publ., 2006. 742 p. (in Russian).

Информация об авторах

Козел Николай Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

Радюк Мечислав Степанович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: radmes@mail.ru

Information about the authors

Nikolai V. Kozel – Ph. D. (Biol.), Leading researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

Mechislav S. Radyuk – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: radmes@mail.ru

Самович Татьяна Викторовна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: samovich77@gmail.com

Дремук Ирина Александровна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irinadremuk@yandex.by

Габриелян Лилит Сергеевна – канд. биол. наук, доцент. Ереванский государственный университет (ул. Алека Манукяна, 1, 0025, г. Ереван, Армения). E-mail: lgabrielyan@ysu.am

Tatsiana V. Samovich – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: samovich77@gmail.com

Irina A. Dremuk – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irinadremuk@yandex.by

Lilit S. Gabrielyan – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Yerevan State University (1 Alex Manukyan St, Yerevan 0025, Armenia). E-mail: lgabrielyan@ysu.am