

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.344

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-331-340>

Поступила в редакцию 26.12.2024

Received 26.12.2024

Т. В. Самович¹, Е. В. Чепелева², Н. В. Козел^{3, 4}

¹Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

³ООО «Биотехнологический научный центр», индустриальный парк «Великий камень»,
Смолевичский район, Минская область, Республика Беларусь

⁴Крестьянское (фермерское) хозяйство «Серебряный ручей», Смолевичский район, Минская область,
Республика Беларусь

КАРОТИНОГЕНЕЗ В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA SALINA* ШТАММА IBCE D-1 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СРЕДАХ В УСЛОВИЯХ РАЗНОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ

Аннотация. Сочетанное действие дефицита биогенных элементов в среде культивирования *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1 и света высокой интенсивности более эффективно по сравнению с действием только дефицита биогенов для индукции накопления каротиноидов в клетках водоросли. При этом дефицит азота в среде приводит к большей продукции клетками β-каротина, нежели дефицит калия и фосфора. Установлено преимущественное подавление активности фотосистемы 2 (ФС2) в клетках *D. salina*, культивируемых на среде, дефицитной по азоту, по сравнению с контролем и вариантом с дефицитом калия и фосфора, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза в клетках водоросли β-каротина как антиоксиданта, предотвращающего избыточное накопление в хлоропластах активных форм кислорода, в частности синглетного молекулярного кислорода, генерация которого увеличивается при повреждении компонентов или нарушении функционирования комплексов ФС2.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, дефицит биогенных элементов, свет высокой интенсивности, каротиногенез, β-каротин

Для цитирования: Самович, Т. В. Каротиногенез в клетках *Dunaliella salina* штамма IBCE D-1 при культивировании на модифицированных средах в условиях разной освещенности / Т. В. Самович, Е. В. Чепелева, Н. В. Козел // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 331–340. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-331-340>

Tatsiana V. Samovich¹, Elizaveta V. Chepeleva², Nikolai V. Kozel^{3, 4}

¹V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Republic of Belarus

²Belarusian State University, Minsk, Belarus

³LLC “Biotechnological scientific center”, Industrial Park “Great Stone”, Smaliavichy District, Minsk Region,
Republic of Belarus

⁴Peasant (farm) economy “Serebryanyj ruchej”, Smaliavichy District, Minsk Region, Republic of Belarus

CAROTENOGENESIS IN *DUNALIELLA SALINA* CELLS IBCE D-1 STRAIN DURING CULTIVATION ON MODIFIED MEDIA UNDER CONDITIONS OF DIFFERENT ILLUMINATION

Abstract. The combined effect of nutrient deficiency in the cultivation medium of *Dunaliella salina* IBCE D-1 strain and high-intensity light is more effective than the effect of nutrient deficiency alone in inducing the accumulation of carotenoids in algae cells. At the same time, nitrogen deficiency in the nutrient medium leads to greater production of β-carotene by cells than potassium and phosphorus deficiency. A predominant suppression of photosystem 2 (PS2) activity was observed in *D. salina* cells cultured on a nitrogen-deficient medium was established in comparison with the control and variant with potassium and phosphorus deficiency. This may be a key factor in triggering increased synthesis of β-carotene in algae cells, as an antioxidant that prevents excessive accumulation of reactive oxygen species in chloroplasts, in particular, singlet molecular oxygen, the generation of which increases when components are damaged or the functioning of PS2 complexes is disrupted.

Keywords: *Dunaliella salina*, deficiency of nutrients, high light intensity, carotenogenesis, β-carotene

For citation: Samovich T. V., Chepeleva E. V., Kozel N. V. Carotenogenesis in *Dunaliella Salina* cells IBCE D-1 strain during cultivation on modified media under conditions of different illumination. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 331–340 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-331-340>

Введение. За последние три десятилетия биотехнология водорослей достигла больших успехов, и некоторые микроводоросли, такие как *Dunaliella*, *Chlorella*, *Haematococcus* и сине-зеленая микроводоросль (цианобактерия) *Spirulina*, теперь выращиваются для производства белков, витаминов, астаксантина, β -каротина, глицерина, незаменимых ненасыщенных жирных кислот, жидкого топлива, фармацевтических препаратов и других химических веществ [1].

Dunaliella salina представляет собой галофитную зеленую микроводоросль, которая способна расти и размножаться при уровне солености от 0,5 до 5,0 М NaCl. При благоприятных для роста условиях *D. salina* продуцирует β -каротин (провитамин А) в количествах, равных около 0,3 % сухой массы, аналогично содержанию β -каротина в листьях растений и других водорослях. Однако под действием стрессовых факторов накопление вторичного β -каротина (не связанного с фотосинтетическим аппаратом) может достигать 10 % от сухой массы, что является самым высоким содержанием β -каротина для любой известной водоросли, растения или другого микроорганизма [2].

Способность *D. salina* к накоплению β -каротина широко используется в различных отраслях производства, таких как пищевая (производство кормов и пищевых добавок) и косметическая промышленность (выпуск косметических средств), фармакология (изготовление лекарственных препаратов).

Наличие у β -каротина выраженного антиоксидантного и иммуномодулирующего действия привело к более активным исследованиям по его применению в профилактике онкологии человека [1, 3]. Пигмент используется для лечения различных расстройств, таких как эритропоэтическая протопорфирия, снижает риск возникновения рака молочной железы у женщин и возрастной дегенерации желтого пятна [4].

Когда было обнаружено, что β -каротин *D. salina* более эффективен в фармакологическом плане по сравнению с пигментом, выделенным из других фотосинтезирующих организмов, интерес к нему существенно возрос. В природе, как правило, каротиноиды находятся в *транс*-форме. Однако при их накоплении (каротиногенезе), индуцированном стрессорами разной природы, клетки *D. salina* могут синтезировать *цис*-изомеры, обладающие повышенным фармакологическим эффектом [5].

Исследования дуналиеллы носят как фундаментальный, так и прикладной характер и сосредоточены чаще всего на организации эффективного производства β -каротина. В Республике Беларусь также имеется коллекция водорослей, в которой присутствует дуналиелла (*D. salina* штамм IBCE D-1) [6]. Этот штамм как продуцент β -каротина изучен недостаточно. В работе предполагается исследовать влияние модификации состава питательной среды на продукцию клетками *D. salina* штамма IBCE D-1 β -каротина.

Цель данной работы – изучить особенности изменения пигментного состава, а также фотохимической активности фотосистем в клетках *D. salina* штамма IBCE D-1 при культивировании на средах, дефицитных по биогенным элементам (N, K + P), в условиях разной освещенности.

Объект и методы исследования. В качестве объекта исследования в работе использовали галофитную зеленую микроводоросль *D. salina* штамм IBCE D-1 из альгологической коллекции Республиканского центра альгологии Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [6].

Для опытов микроводоросль *D. salina* выращивали в стеклянных колбах с рабочим объемом 50 мл на стандартной питательной среде Артари (А) (табл. 1) при светодиодном освещении белого дневного света (цветовая температура 4000 К) с интенсивностью 20 мкмоль квантов/(м² · с) (свет низкой интенсивности, low light, LL) и 200 мкмоль квантов/(м² · с) (свет высокой интенсивности, high light, HL) и фотопериодом 14 ч света/10 ч темноты. Эксперимент проводили в строго контролируемых условиях: температура в световом периоде составляла 23 ± 1 °С, относительная влажность воздуха – 50 %.

Для выяснения влияния модификации состава питательной среды, а именно удаления из нее биогенов (N и K + P), использовали среду, дефицитную по азоту (табл. 2), и среду, дефицитную по калию и фосфору (табл. 3). Микроэлементы готовили по Арнону – H₃BO₃ – 2,86 г/л, MnCl₂ · 4H₂O – 1,81 г/л, ZnSO₄ · 7H₂O – 0,222 г/л, MoO₃ – 176,4 мг/10 л, NH₄VO₃ – 229,6 мг/10 л [6].

Т а б л и ц а 1. Состав контрольной среды (А)

T a b l e 1. Composition of control medium (A)

Компоненты	На 1 л	На 250 мл
NaCl	116 г	29 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	50 г	12,5 г
KNO ₃	2,5 г	0,625 г
K ₂ HPO ₄	0,2 г	0,05 г
NaHCO ₃	1 г	0,25 г
Микроэлементы	2 мл	0,5 мл

Т а б л и ц а 2. Состав среды, дефицитной по азоту (А-N)

T a b l e 2. Composition of nitrogen-deficient medium (A-N)

Компоненты	На 1 л	На 250 мл
NaCl	116 г	29 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	50 г	12,5 г
K ₂ HPO ₄	0,2 г	0,05 г
NaHCO ₃	1 г	0,25 г
Микроэлементы	2 мл	0,5 мл

Т а б л и ц а 3. Состав среды, дефицитной по калию и фосфору (А-KP)

T a b l e 3. Composition of potassium and phosphorus deficient medium (A-KP)

Компоненты	На 1 л	На 250 мл
NaCl	116 г	29 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	50 г	12,5 г
NaNO ₃	2,1 г	0,525 г
NaHCO ₃	1 г	0,25 г
Микроэлементы	2 мл	0,5 мл

Закладку опытов осуществляли следующим образом: суспензию *D. salina* известной оптической плотности центрифугировали 10 мин при 4000 g на центрифуге Sigma 3-18KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия), супернатант удаляли, осадок промывали раствором NaCl (116 г/л) и снова центрифугировали 10 мин при 4000 g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 30 мл питательной среды, после чего суспензию помещали в колбы, контролируя в каждой из них оптическую плотность.

Для проведения биохимических анализов 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 –24 °С.

Продуктивность микроводоросли оценивали по количеству клеток в единице объема суспензии. Подсчет осуществляли с помощью камеры Горяева на микроскопе Nikon Eclipse TS100 (Япония) [7].

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 [8] согласно работам [9–11]. Хлорофиллы и каротиноиды регистрировали с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Shimadzu Prominence LC-20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия) и спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu, Япония).

В работе использовали стандарты фотосинтетических пигментов производства Sigma-Aldrich (Германия).

Параметры, характеризующие активность работы ФС2 и ФС1, рассчитывали с применением метода индукции флуоресценции хлорофилла для нативной культуры *D. salina*, адаптированной в течение 15 мин к темноте. Для определения параметров индукции флуоресценции хлорофилла использовали ПАМ-флуориметр DUAL-PAM-100 (Heinz Walz, Германия) с модулем регистрации флуоресценции ФС2 и двухволновым (830/875 нм) модулем регистрации сигнала P700 (реакционного центра ФС1). Данный прибор позволяет возбуждать модулированным светом низкой интенсивности ($0,048 \text{ мкмоль квантов}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, длина волны возбуждающего света – 635 нм) фоновую флуоресценцию хлорофилла F_0 . При включении актиничного света с интенсивностью 150 мкмоль квантов/ $(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ интенсивность флуоресценции достигает максимального уровня F_m , после чего за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному пути снижается.

Применение вспышки насыщающего света ($10\,000 \text{ мкмоль квантов}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, 635 нм) на фоне действия актиничного увеличивает интенсивность флуоресценции с уровня F до F_m .

По полученным значениям 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 ФС2:

$$F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m,$$

эффективный квантовый выход фотохимических реакций ФС2:

$$Y(\text{II}) = (F_m - F) / F_m,$$

а также величину фотохимического и нефотохимического тушения:

$$\begin{aligned} qP &= (F_m' - F) / (F_m' - F_0), \\ qN &= (F_m - F_m') / (F_m - F_0'), \\ NPQ &= F_m / F_m' - 1. \end{aligned}$$

Эффективность функционирования электротранспортной цепи или скорость транспорта электронов рассчитывали по формуле:

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

где PAR – интенсивность фотосинтетически активной радиации (в нашем случае 150 мкмоль квантов/ $(\text{м}^2 \cdot \text{с})$), c – часть поглощенного света (обычно 0,84, т. е. 84 %), 0,5 – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на ФС2 [12–14].

Также определяли согласно [12, 13] квантовые выходы регулируемой и нерегулируемой диссипации энергии – $Y(\text{NPQ})$ и $Y(\text{NO})$ соответственно. Параметры P_m , $Y(\text{I})$ и $\text{ETR}(\text{I})$ характеризуют состояние и активность ФС1, аналогичны таковым для ФС2 и определяются согласно [13]. Квантовые выходы фотохимических реакций ФС1, $Y(\text{ND})$ и $Y(\text{NA})$ характеризуют донорные и акцепторные свойства P700 [13].

Эксперименты были проведены в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

В работе приведены средние значения из 3–5 экспериментов и их стандартные отклонения. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2019, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было показано, что дефицит биогенных элементов существенно влияет на пигментный состав клеток *D. salina*, при этом накопление β -каротина

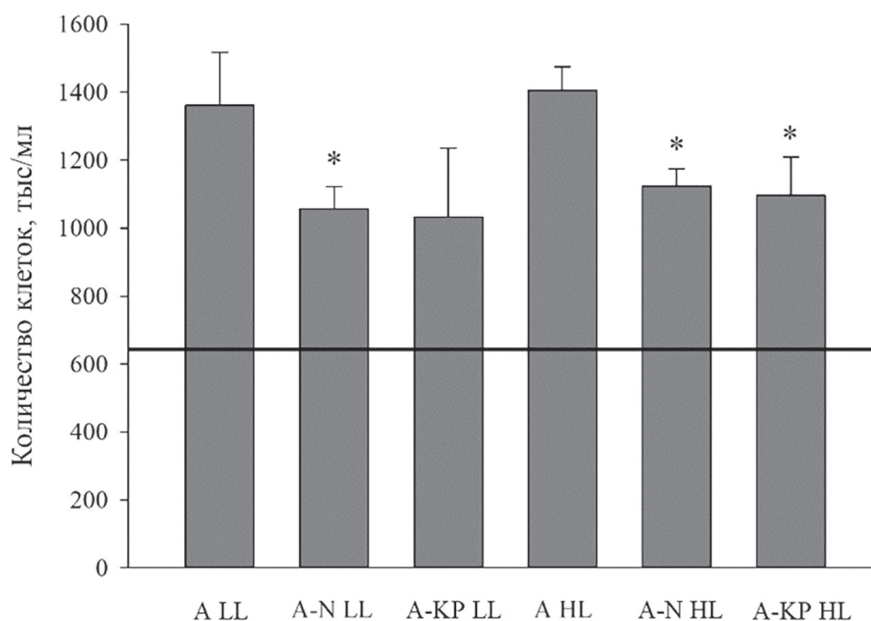


Рис. 1. Количество клеток в суспензии *D. salina* при культивировании на модифицированных средах при разной интенсивности освещения (* – различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$, исходное количество клеток представлено базовой линией)

Fig. 1. Number of cells in *D. salina* suspension when cultured on modified media at different light intensities (* – differences compared to the control are significant, $p \leq 0.05$, the initial cell count is represented by the baseline)

в клетках микроводоросли в условиях дефицита азота более эффективно по сравнению с контролем, а также дефицитом калия и фосфора [15]. Однако недостаток питательных веществ при культивировании дуналиеллы является легким стрессом по сравнению с действием света высокой интенсивности. Мы предполагаем, что при сочетании нескольких факторов стресса можно добиться максимального эффекта в накоплении вторичных метаболитов, в частности β -каротина. В связи с этим в данной работе мы проанализировали влияние сочетанного действия дефицита биогенных элементов и света высокой интенсивности на продуктивность и пигментный состав клеток *D. salina*.

Оценка продуктивности *D. salina* осуществлялась по количеству клеток в объеме суспензии после выращивания в течение 3 недель на модифицированных средах при разной интенсивности света. Результаты подсчета клеток представлены на рис. 1.

Из полученных данных видно, что на полной питательной среде количество клеток в среднем увеличилось в 2,1 (A LL) и 2,2 (A HL) раза по сравнению с исходным значением. В среде, дефицитной по азоту, количество клеток увеличилось в 1,7 (A-N LL) и 1,8 (A-N HL) раза, а в среде, дефицитной по калию и фосфору, – в 1,6 (A-KP LL) и 1,7 (A-KP HL) раза по сравнению с контролем при низкой (20 мкмоль квантов/(м² · с), LL) и высокой (200 мкмоль квантов/(м² · с), HL) интенсивности освещения соответственно.

Методом ВЭЖХ был проанализирован качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов клеток *D. salina* при культивировании на модифицированных средах при разной интенсивности освещения. Анализ пигментных экстрактов позволил выявить в исследуемых вариантах наличие каротиноидов неоксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина, а также хлорофиллов *a* и *b* [16]. Анализ количественного состава фотосинтетических пигментов показал, что во всех вариантах опыта содержание β -каротина увеличилось относительно контроля, а в наибольшей степени – в опытных пробах *D. salina*, культивируемой на среде без азота в условиях действия света высокой интенсивности, где наблюдалось 5-кратное увеличение продукции клетками *D. salina* β -каротина по сравнению с контролем, выращенным на свету высокой интенсивности (табл. 4).

Таблица 4. Содержание фотосинтетических пигментов в клетках *D. salina* при культивировании на модифицированных средах при разной интенсивности освещенияTable 4. Content of photosynthetic pigments in *D. salina* cells when cultured on modified media at different light intensities

Пигмент	Вариант					
	A LL	A-N LL	A-KP LL	A HL	A-N HL	A-KP HL
Содержание пигментов, пг/кл (в скобках – % к контролю)						
Неоксантин	1,11 ± 0,11	0,67 ± 0,04* (61)	0,71 ± 0,14* (64)	0,62 ± 0,07	н. о.	0,47 ± 0,07* (75)
Виолаксантин	0,49 ± 0,06	0,18 ± 0,01* (38)	0,45 ± 0,09 (93)	0,33 ± 0,04	н. о.	0,20 ± 0,03* (61)
Лютеин	3,06 ± 0,19	2,84 ± 0,09 (93)	2,29 ± 0,44* (75)	2,10 ± 0,24	2,25 ± 0,09 (107)	1,68 ± 0,35* (80)
Хлорофилл <i>b</i>	5,99 ± 0,31	4,00 ± 0,04* (67)	4,22 ± 1,04* (70)	3,50 ± 0,33	2,79 ± 0,06* (80)	2,18 ± 0,49* (62)
Хлорофилл <i>a</i>	14,71 ± 0,95	10,61 ± 0,07* (53)	11,24 ± 2,59* (76)	9,02 ± 0,85	7,22 ± 0,05* (80)	6,00 ± 1,24* (67)
β-каротин	4,37 ± 0,59	9,26 ± 1,45* (212)	6,01 ± 0,85* (138)	4,55 ± 0,36	21,89 ± 0,23* (481)	9,44 ± 0,35* (207)

Примечание. * – различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$; н. о. – не обнаружено.

В абсолютном выражении количество β-каротина составляло в варианте A-N HL 21,89 пг/кл – это наибольшее зафиксированное нами содержание пигмента во всех проведенных экспериментах, оно в 2,3 раза выше значения, полученного для варианта, где отсутствовало дополнительное воздействие светом высокой интенсивности. Также следует отметить, что в образце A-N HL не детектировались неоксантин и виолаксантин, что, видимо, связано с регуляцией биосинтеза каротиноидов в клетках *D. salina* в стрессовых условиях, а также снизилось в 2 раза содержание хлорофиллов, что может быть следствием их фотодеструкции и (или) снижения синтеза.

Для выяснения механизмов, лежащих в основе разного накопления β-каротина в клетках водоросли, с помощью РАМ-флуориметрии исследовали влияние состава питательной среды и интенсивности освещения на функциональную активность фотосинтетического аппарата *D. salina*.

Анализ результатов РАМ-флуориметрии (табл. 5) показал снижение потенциального и эффективного квантовых выходов фотохимии ФС2, а также эффективность переноса электронов в пределах ФС2 (показатели F_v/F_m , $Y(II)$ и $ETR(II)$ соответственно) в вариантах с отсутствием азота по сравнению с контрольными, в то время как дефицит калия и фосфора не приводил к таким нарушениям фотохимической активности ФС2. Более того, в варианте A-KP мы наблюдали увеличение на свету высокой интенсивности константы фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла qP на фоне снижения показателей регулируемого нефотохимического тушения ($Y(NPQ)$, NPQ), что указывает на относительно нормальное функционирование ФС2 при дефиците калия и фосфора в отличие от дефицита азота. При этом отметим существенное снижение эффективности переноса электронов в пределах ФС1, а также других параметров эффективности функционирования ФС1 в вариантах с дефицитом калия и фосфора. Достоверного влияния дефицита азота на фотохимическую активность ФС1 не выявлено.

Таблица 5. Параметры функционирования фотосинтетического аппарата клеток *D. salina* при культивировании на модифицированных средахTable 5. Parameters of functioning of photosynthetic apparatus of *D. salina* cells during cultivation on modified media

Параметр	Вариант					
	A LL	A-N LL	A-KP LL	A HL	A-N HL	A-KP HL
F_o	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,16 ± 0,01*	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01*
F_m	0,51 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,37 ± 0,05*	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,02*
F_v/F_m	0,59 ± 0,01	0,52 ± 0,01*	0,54 ± 0,04	0,46 ± 0,01	0,38 ± 0,02*	0,38 ± 0,02*
$Y(II)$	0,32 ± 0,04	0,26 ± 0,01*	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,24 ± 0,01*	0,28 ± 0,01
$ETR(II)$	22,01 ± 2,91	14,50 ± 0,67*	17,63 ± 1,64	14,85 ± 1,50	13,05 ± 0,46*	15,53 ± 0,59

Окончание табл. 5

Параметр	Вариант					
	A LL	A-N LL	A-KP LL	A HL	A-N HL	A-KP HL
Y(NO)	0,61 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,61 ± 0,04	0,66 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,70 ± 0,01
Y(NPQ)	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,01*
NPQ	0,12 ± 0,04	0,23 ± 0,05*	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,08	0,09 ± 0,05	0,03 ± 0,01*
qN	0,14 ± 0,04	0,25 ± 0,05*	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,08	0,11 ± 0,05	0,04 ± 0,01*
qP	0,56 ± 0,07	0,56 ± 0,03	0,63 ± 0,02	0,62 ± 0,04	0,68 ± 0,02	0,76 ± 0,03*
1-qP	0,44 ± 0,05	0,44 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,32 ± 0,02	0,24 ± 0,03*
P_m	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,02*	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01*
$P_{m'}$	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01*	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01*
Y(I)	0,52 ± 0,08	0,50 ± 0,07	0,33 ± 0,08*	0,53 ± 0,13	0,37 ± 0,12	0,38 ± 0,05*
ETR(I)	36,30 ± 4,08	27,50 ± 3,87	18,23 ± 4,27*	31,45 ± 5,59	26,63 ± 6,41	21,08 ± 2,74*
Y(ND)	0,25 ± 0,07	0,18 ± 0,07	0,41 ± 0,13*	0,30 ± 0,07	0,25 ± 0,08	0,27 ± 0,08
Y(NA)	0,28 ± 0,11	0,32 ± 0,09	0,30 ± 0,12	0,22 ± 0,06	0,38 ± 0,10	0,35 ± 0,10

Примечание. Представлены результаты трех независимых опытов; * – различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$.

Более выражено снижение фотохимической активности ФС2 при дефиците азота видно на световых кривых, представленных на рис. 2, которые демонстрируют изменение эффективности работы электронтранспортной цепи в зависимости от интенсивности актиничного света. Параметр ETR(II) существенно снижался для клеток *D. salina*, выращенных на азотдефицитной среде как при низкой, так и при высокой освещенности. Подавление фотохимической активности ФС2 в условиях недостатка азота может быть следствием нарушения биосинтеза основных структурных белков фотосинтетического аппарата, в частности белков реакционного центра ФС2 [17].

Достоверных различий между контрольными и опытными вариантами для показателя ETR(I) ФС1 зафиксировано не было (рис. 3).

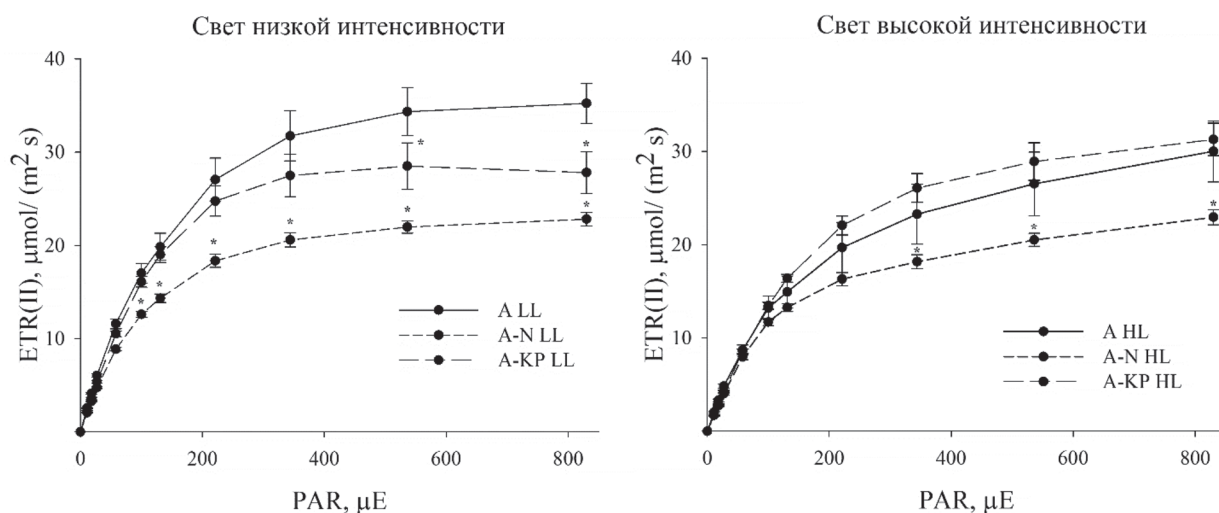


Рис. 2. Световые кривые, демонстрирующие изменение эффективности работы электронтранспортной цепи ФС2 *D. salina* в зависимости от интенсивности актиничного света при модификации питательных сред (* – различия по сравнению с контролем достоверны, $p \leq 0,05$)

Fig. 2. Light curves showing changes in the efficiency of the electron transport chain of *D. salina* PS2 as a function of actinic light intensity during modification of nutrient media (* – differences compared to the control are significant, $p \leq 0.05$)

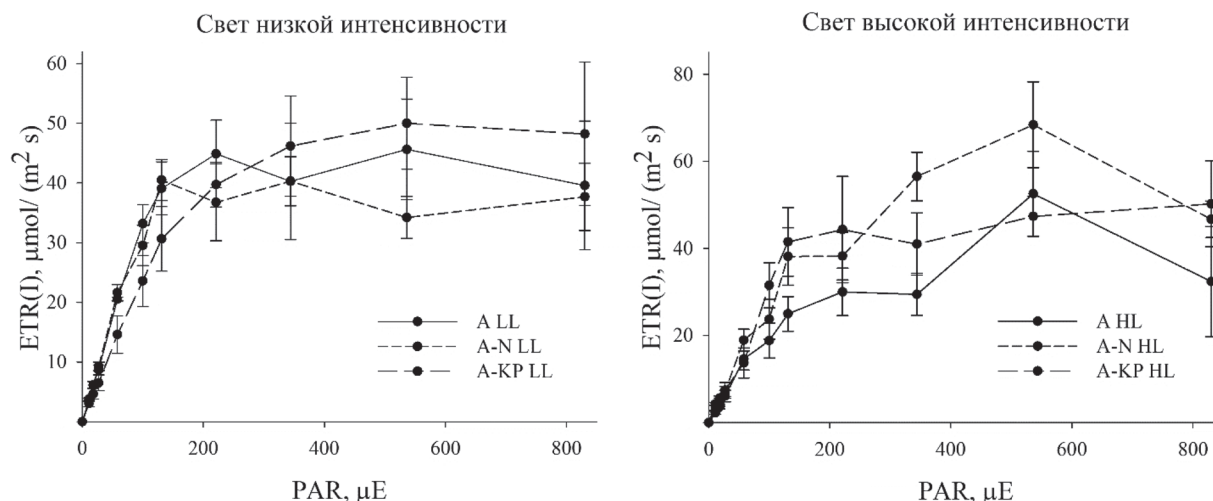


Рис. 3. Световые кривые, демонстрирующие изменение эффективности работы электронтранспортной цепи ФС1 *D. salina* в зависимости от интенсивности актиничного света при модификации питательных сред

Fig. 3. Light curves showing the change in the efficiency of the electron transport chain of *D. salina* PS1 as a function of actinic light intensity during the modification of nutrient media

Закключение. Таким образом, показано, что сочетанное действие дефицита биогенных элементов в среде культивирования *D. salina* и света высокой интенсивности более эффективно по сравнению с действием только дефицита биогенов для индукции накопления каротиноидов в клетках водоросли. При этом дефицит азота в среде приводит к большей продукции клетками β-каротина, нежели дефицит калия и фосфора.

Выявлено преимущественное подавление активности ФС2 в клетках *D. salina*, культивируемых на среде, дефицитной по азоту, что может быть ключевым фактором запуска повышенного синтеза в клетках водоросли β-каротина как антиоксиданта, предотвращающего избыточное накопление в хлоропластах активных форм кислорода, в частности синглетного молекулярного кислорода, генерация которого увеличивается при повреждении компонентов или нарушении функционирования комплексов ФС2. Полученный результат не только раскрывает механизм увеличения синтеза β-каротина в клетках *D. salina*, но и показывает перспективность использования дефицитных по азоту сред при культивировании водоросли с целью получения β-каротина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Raja, R. Exploitation of *Dunaliella* for β-carotene production / R. Raja, S. Hemaiswarya, R. Rengasamy // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Vol. 74, N 3. – P. 517–523. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0777-8>
2. Индукция вторичного каротиногенеза у новых галофильных микроводорослей из рода *Dunaliella* (Chlorophyceae) / А. Е. Соловченко, Е. А. Селиванова, К. А. Чеканов [и др.] // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 11. – С. 1724–1730.
3. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор / Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, Н. В. Терентьева // Морський екологічний журнал. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 5–23.
4. Al-Muhteseb, S. I. Producing Natural Mixed Carotenoids from *Dunaliella salina* / S. I. Al-Muhteseb, S. Emeish // Journal of Natural Sciences Research. – 2015. – Vol. 5, N 10. – P. 53–59.
5. Shariati, M. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella* / M. Shariati, M. Reza Hadi // Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications, Isfahan, 1 August 2011 / University of Isfahan; ed.: A. Carpi [et al.]. – Isfahan, 2011. – P. 483–506. <https://doi.org/10.5772/19046>
6. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников, Е. Е. Мананкина, Е. А. Будакова, Н. В. Шалыго. – Мн.: Беларус. навука, 2011. – 101 с.
7. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л. А. Сиренко, А. И. Сакевич, Л. Ф. Осипов [и др.]. – Киев: Наукова думка, 1975. – 248 с.
8. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. / K. Azarin, A. Usatov, M. Makarenko [et al.] // Plant Molecular Biology. – 2020. – Vol. 103, N 4–5. – P. 373–389. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00997-x>
9. Forni, E. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas / E. Forni, M. Ghezzi, A. Polesello // Chromatography. – 1988. – Vol. 26, N 1. – P. 120–124. <https://doi.org/10.1007/bf02268135>

10. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies / S. M. Milenković, J. B. Zvezdanović, T. D. Anđelković, D. Z. Marković // *Advanced technologies*. – 2012. – Vol. 1, N 1. – P. 16–24.
11. Rodriguez-Amaya, D. B. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis* / D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura. – Washington: International Food Policy Research Institute, 2004. – 63 p.
12. Корнеев, Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции / Д. Ю. Корнеев. – Киев: Альтерпрес, 2002. – 188 с.
13. Dual-PAM-100 Measuring system for simultaneous assessment of p700 and chlorophyll fluorescence / Heinz Walz GmbH. – Germany, 2009. – URL: http://www.walz.com/downloads/manuals/dual-pam-100/Dual-PAM_1e.pdf (date of access: 11.04.2020).
14. Govindjee. Sixty-three years since Kautsky chlorophyll *a* fluorescence / Govindjee // *Australian Journal of Plant Physiology*. – 1995. – Vol. 22, N 2. – P. 131–160. <https://doi.org/10.1071/pp9950131>
15. Чепелева, Е. В. Пигментный состав *Dunaliella salina* при культивировании на модифицированных средах / Е. В. Чепелева, Т. В. Самович, Н. В. Козел // Биологически-активные вещества природного происхождения в регуляции процессов жизнедеятельности: сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию Ин-та биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, 5–6 окт. 2021 г., г. Гродно, Республика Беларусь / Ин-т биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси. – Гродно, 2021. – С. 569–573.
16. Каляга, Т. Г. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар / Т. Г. Каляга, Н. В. Козел // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2020. – № 3. – С. 46–53.
17. Transcription strategies related to photosynthesis and nitrogen metabolism of wheat in response to nitrogen deficiency / X. Liu, Ch. Yin, L. Xiang [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2020. – Vol. 20. – Art. 448. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02662-3>

References

1. Raja R., Hemaiswarya S., Rengasamy R. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 74, no. 3, pp. 517–523. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0777-8>
2. Solovchenko A. E., Selivanova E. A., Chekanov K. A., Sidorov R. A., Nemtseva N. V., Lobakova E. S. Induction of secondary carotenogenesis in new halophile microalgae from the genus *Dunaliella* (Chlorophyceae). *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, no. 11, pp. 1508–1513 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0006297915110139>
3. Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N., Terent'eva N. V. Unicellular algae as a renewable resource. *Mors'kii ekologichnii zhurnal* [Marine ecological journal], 2008, vol. 7, no. 2, pp. 5–23 (in Russian).
4. Al-Muhteseb S. I., Emeish S. Producing Natural Mixed Carotenoids from *Dunaliella salina*. *Journal of Natural Sciences Research*, 2015, vol. 5, no. 10, pp. 53–59.
5. Shariati M., Reza Hadi M. Microalgal Biotechnology and Bioenergy in *Dunaliella*. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*, Isfahan, 1, August 2011. Isfahan, 2011, pp. 483–506. <https://doi.org/10.5772/19046>
6. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A., Shalygo N. V. *Catalogue of the genetic fund of economically useful algae species*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
7. Sirenko L. A., Sakevich A. I., Osipov L. F., Lukina L. F., Kuz'menko M. I., Kozitskaya V. N., Velichko I. M., Myslovich V. O., Gavrilenko M. Ya., Arendarchuk V. V., Kirpenko Yu. A. *Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological practice*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1975. 248 p. (in Russian).
8. Azarin K., Usatov A., Makarenko M., Kozel N., Kovalevich A., Dremuk I., Yemelyanova A., Logacheva M., Fedorenko A., Averina N. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll *a* apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. *Plant Molecular Biology*, 2020, vol. 103, no. 4–5, pp. 373–389. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00997-x>
9. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatography*, 1988, vol. 26, no. 1, pp. 120–124. <https://doi.org/10.1007/bf02268135>
10. Milenković S. M., Zvezdanović J. B., Anđelković T. D., Marković D. Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 16–24.
11. Rodriguez-Amaya D. B., Kimura M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. Washington, International Food Policy Research Institute, 2004. 63 p.
12. Korneev D. Yu. *Information capabilities of the fluorescence induction method*. Kiev, Al'terpres Publ., 2002, 188 p. (in Russian).
13. Dual-PAM-100 Measuring system for simultaneous assessment of p700 and chlorophyll fluorescence. Heinz Walz GmbH. Germany, 2009. Available at: http://www.walz.com/downloads/manuals/dual-pam-100/Dual-PAM_1e.pdf (accessed 11.04.2020).
14. Govindjee. Sixty-three years since Kautsky chlorophyll *a* fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1995, vol. 22, no. 2, pp. 131–160. <https://doi.org/10.1071/pp9950131>
15. Chepeleva E. V., Samovich T. V., Kozel N. V. The pigment composition of *Dunaliella salina* during cultivation on modified media. *Biologicheski-aktivnye veshchestva prirodnogo proiskhozhdeniya v regulatsii protsessov zhiznedejatel'nosti: sbornik statei Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 50-letiyu Instituta biokhimii biologicheskii aktivnykh soedinenii Natsional'noi akademii nauk Belarusi (5–6 oktyabrya 2021 goda, g. Grodno, Respublika Bela-*

rus') [Biologically active substances of natural origin in the regulation of life processes: collection of articles from the International scientific and practical conference dedicated to the 50th anniversary of the Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (October 5–6, 2021, Grodno, Republic of Belarus)]. Grodno, 2021. pp. 569–573 (in Russian).

16. Kalyaga T. G., Kozel N. V. Influence of soil drought on the content of photosynthetic pigments in barley plants of the Brovar variety. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. [Journal of the Belarusian State University. Biology], 2020, no. 3, pp. 46–53 (in Russian).

17. Liu X., Yin Ch., Xiang L., Jiang W., Xu Sh., Mao Z. Transcription strategies related to photosynthesis and nitrogen metabolism of wheat in response to nitrogen deficiency. *BMC Plant Biology*, 2020, vol. 20, art. 448. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02662-3>

Информация об авторах

Самович Татьяна Викторовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: samovich77@gmail.com

Чепелева Елизавета Владимировна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: liza.lizaveta1979@gmail.com

Козел Николай Владимирович – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. ООО «Биотехнологический научный центр», промышленный парк «Великий камень» (пр-т Пекинский, 18, 222210, Смолевичский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). Гл. технолог. КФХ «Серебряный ручей» (222202, д. Сосновая, Озерицко-Слободской с/с, Смолевичский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

Information about the authors

Tatsiana V. Samovich – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: samovich77@gmail.com

Elizaveta V. Chepeleva – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: liza.lizaveta1979@gmail.com

Nikolai V. Kozel – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Research. LLC “Biotechnological scientific center”, Industrial Park “Great Stone” (18, Pekinskii Ave., 222210, Smaliavichy District, Minsk Region, Republic of Belarus). Chief technologist. Peasant (farm) economy “Serebryanyj ruchey” (Sasnovaja Village, 222202, Aziarycka-Slabadski village council, Smaliavichy District, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com