

УДК 663.1; 576.32/.36; 577.115.3

Характеристика биотехнологического потенциала штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS

© 2019 М.А. СИНЕТОВА^{1,*}, Р.А. СИДОРОВ¹, А.Ю. СТАРИКОВ¹, А.С. ВОРОНКОВ¹, А.С. МЕДВЕДЕВА¹, З.В. КРИВОВА¹, М.С. ПАХОЛКОВА², Д.В. БАЧИН¹, В.С. БЕДБЕНОВ¹, Д.А. ГАБРИЕЛЯН¹, Б.К. ЗАЯДАН³, К. БОЛАТХАН³, Д.А. ЛОСЬ¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, 127276

²ФГАОУ ВО Северный (Арктический) федеральный университет им. М. В. Ломоносова, Архангельск, 163002

³Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, г. Алма-Ата, Республика Казахстан

*e-mail: maria.sinetova@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.2018 г.

После доработки 09.04.2019 г.

Принята к публикации 15.05.2019 г.

Исследования последних десятилетий показали, что микроводоросли и цианобактерии имеют огромный биотехнологический потенциал: они могут быть использованы для получения различных пищевых красителей, в качестве пищевых и кормовых добавок, в производстве косметики, фармацевтических препаратов, биотоплива, биоудобрений и в фиторемедиации сточных вод. Также стало очевидным, что применение микроводорослей экономически целесообразно только в том случае, когда их биомасса используется для получения сразу нескольких целевых продуктов, включая высокоценные соединения. С целью поиска штаммов, которые отличаются высоким содержанием нескольких соединений и/или высокой продуктивностью по биомассе, были исследованы ростовые характеристики и биохимический состав 12 штаммов микроводорослей и цианобактерий из коллекции IPPAS ИФР РАН в экспоненциальной и стационарной фазах роста. Было показано, что все изученные штаммы отличаются высокими скоростями роста (время удвоения 6–22 ч). Штаммы *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Chlorella* sp. IPPAS C-1210, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509, *Cyanidium caldarium* IPPAS P-510 и *V. punctata* IPPAS H-242 имеют наиболее высокий биотехнологический потенциал и могут быть использованы для разработки технологий получения различных видов биотоплива, пигментов, кормовых и пищевых добавок, ω-3 полиненасыщенных жирных кислот, включая эйкозапентаеновую кислоту (20:5 Δ^{5,8,11,14,17}).

Ключевые слова: микроводоросли, цианобактерии, биохимический состав, жирные кислоты, ценные метаболиты, ростовые характеристики

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-12-29

Микроводоросли и цианобактерии являются основными первичными продуцентами органического вещества биосферы: по современным оценкам, их вклад в общую продукцию органического углерода составляет 40–50% [1]. Кроме того, эти организмы имеют более высокую эффективность фотосинтеза по сравнению с высшими растениями [2]. Клетки микроводорослей и цианобактерий содержат значительное количество белка, различ-

ные углеводы, полярные и нейтральные липиды с богатым набором жирных кислот (ЖК), включая незаменимые полиненасыщенные ЖК (ω-3 ПНЖК). Эти организмы также способны синтезировать пигменты разных классов, витамины, стероиды, вторичные метаболиты, включая антибиотики и токсины [3]. Благодаря этому микроводоросли могут быть использованы в самых разных областях биотехнологии: для получения различных

Список сокращений: АК – арахидоновая кислота; ВСА – бичинхониновая кислота; г с.м. – г сухой массы; ДСН – додецилсульфат натрия; ЖК – жирные кислоты; МЭЖК – метилвые эфиры жирных кислот; о. е. – относительные единицы; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ОП₇₅₀ – оптическая плотность при 750 нм; СЖК – свободные жирные кислоты; СЛ – суммарные липиды; ТАГ – триацилглицерин; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; ЭПК – эйкозапентаеновая кислота; ЭПС – экзополисахариды; T_{удв} – время удвоения биомассы; μ – удельная скорость роста; μ_{max} – максимальная удельная скорость роста в экспоненциальной фазе роста.

пищевых красителей, в качестве пищевых и кормовых добавок, в производстве косметики, фармацевтических препаратов, биотоплива, биоудобрений, а также для фикоремедиации сточных вод [4–7].

По современным оценкам водоросли и цианобактерии представлены около 72 500 видами [8], из которых в коллекциях исследователям доступно в виде чистых культур порядка 4 600 видов микроводорослей (<http://gcm.wfcc.info/strains.jsp>). Биохимический состав и биотехнологический потенциал детально изучен только у представителей нескольких сотен видов [9], а промышленно культивируется несколько десятков штаммов, относящихся в основном к родам *Arthrospira*, *Aphanizomenon* (Cyanophyta), *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Tetraselmis* (Chlorophyta), *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum* (Ochrophyta) [3, 10]. Таким образом, биотехнологический потенциал микроводорослей остается еще в значительной степени неисследованным, а поиск новых штаммов и изучение их биохимии и физиологии является актуальной задачей современной биотехнологии микроводорослей.

Основной проблемой развития биотехнологии микроводорослей является высокая себестоимость конечного продукта по сравнению с гетеротрофными продуцентами, обусловленная в основном тем, что рост и плотность культуры микроводорослей ограничены светопропускаемостью среды [10]. Исследования последних лет показали, что даже при максимальных скоростях роста и максимальной продуктивности по целевому продукту, использование микроводорослей для производства какого-то одного продукта, даже при его высокой стоимости, является нерентабельным [2, 10, 11]. Современные подходы в биотехнологии микроводорослей заключаются в поиске путей наиболее полной переработки биомассы микроводорослей. По аналогии с концепцией полной переработки сырья в различные ценные продукты (refinery), которая широко используется в современной нефтеперерабатывающей промышленности, когда из ископаемой нефти производят топливо, пластмассы, пластификаторы, краски, антикоррозионные вещества и многое другое, подход, при котором биомассу преобразуют в ряд биопродуктов и разные виды биоэнергии, назвали биорафинированием (biorefinery) [10, 12, 13]. Например, оставшуюся после получения биодизеля биомассу, богатую углеводами, можно использовать в качестве субстрата для переработки бактериями и получать этанол и метан [11]. Биомассу микроводорослей, имеющих высо-

кое содержание ПНЖК [14] и каротиноидов [4], используемых в аквакультуре, сельском хозяйстве и пищевой промышленности, после выделения целевых продуктов можно использовать для получения белковых кормовых добавок, биоудобрений, пластификаторов, субстрата для переработки бактериями в биотопливо [10, 12]. Появляется все больше исследований о фармацевтическом действии различных соединений, получаемых из микроводорослей: это пигменты (хлорофилл, каротиноиды, фикобилины), запасные углеводы и экзополисахариды, отдельные классы липидов [5, 15–17]. В силу приведенных фактов, при поиске новых штаммов, перспективных для биотехнологического использования, разумно не только отбирать штаммы по одному целевому соединению, но и проводить максимально полное исследование биохимического состава для выявления их полного потенциала. Преимущество должно отдаваться штаммам, имеющим высокое содержание нескольких соединений и/или отличающихся высокой продуктивностью по биомассе.

Целью настоящей работы было исследование 12 штаммов из коллекции IPPAS ИФР РАН, выделенных из различных местообитаний, в том числе из экстремальных, и относящихся к отделам Cyanophyta, Rhodophyta, Chlorophyta и Ochrophyta для оценки их биотехнологического потенциала. Для этих штаммов впервые были получены данные по скорости роста, по содержанию пигментов, общего белка, запасных углеводов и суммарных липидов (СЛ), а также по ЖК составу СЛ. Биохимический состав был исследован на разных стадиях роста: в экспоненциальной фазе, когда клетки активно делились, и при переходе в стационарную фазу, когда рост был лимитирован недостатком света и низкой концентрацией питательных элементов. Особое внимание было уделено подбору методов, позволяющих дать наиболее реальную оценку содержания целевых продуктов

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы микроводорослей

В работе были использованы 12 аксеничных штаммов коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН (табл. 1).

Условия культивирования

Исходные культуры штаммов цианобактерий, зеленых и охрофитовых водорослей поддерживали на агаризованных средах в пробирках или

Места обитания и физиологические особенности изучаемых штаммов

Habitats and physiological traits of the studied strains

Шифр штамма IPPAS	Вид	Местообитание выделенного штамма	Заявленные физиологические особенности
Cyanophyta			
B-1200	<i>Cyanobacterium</i> sp.	Казахстан, оз. Балхаш; соленость 3,5–6 г/л; температура воды 15–17 °С	Галоалкалотолерантный, холодоустойчивый
Chlorophyta			
C-7	<i>Ch.</i> sp.	Не известно	Психрофильный, температурный оптимум роста 15°С
C-15	<i>Chlorella vulgaris</i>	Не известно	Термофильный
C-1210	<i>Ch.</i> sp.	Казахстан, оз. Иссык; температура воды 13 °С	Холодоустойчивый
C-1509	<i>Nannochloris</i> sp.	Россия, оз. Шира; соленость 9 г/л	Галоалкалотолерантный
Rhodophyta, Cyanidiophyceae			
P-500	<i>Galdieria partita</i>	Россия, Камчатка, кальдера вулкана Узон, кислый термальный источник	Термоацидофильный
P-507	<i>G. maxima</i>	Россия, о. Кунашир, Большая Курильская гряда, кислый термальный источник; температура 37 °С, pH 2–4	То же
P-508	<i>G. daedala</i>	То же	»»
P-513	<i>G. sulphuraria</i>	Япония, горячий источник	»»
P-510	<i>Cyanidium caldarium</i>	Россия, Камчатка, кальдера вулкана Узон, кислый термальный источник	»»
Ochrophyta, Eustigmatophyceae			
C-70	<i>Vischeria</i> sp.	Россия, Москва, сосуд с водопроводной водой на окне	–
H-242	<i>V. punctata</i>	Швейцария, Штабельход, почва	–

чашках Петри, штаммы красных водорослей поддерживали на жидкой среде (табл. 2). Перед началом эксперимента все штаммы переводили в жидкие культуры и подращивали 10–14 сут в колбах со 100 мл среды культивирования при температуре 22 °С и постоянном освещении с интенсивностью 30 мкмоль квантов/(м²·сек).

Интенсивное культивирование производили в специально разработанной в лаборатории установке [18], в сосудах с 250 мл соответствующей среды для культивирования, при двустороннем освещении флуоресцентными лампами с интенсивностью 110 мкмоль квантов/(м²·сек) с каждой стороны и с аэрацией стерильной газовой смесью, обогащенной CO₂ до концентрации 1,5–2,0%. Температурный режим культивирования выбирали в соответствии с температурным оптимумом роста каждого штамма (табл. 2).

Для адаптации к условиям интенсивного культивирования каждую культуру предварительно выращивали до экспоненциальной фазы в указанных условиях, затем разбавляли свежей средой до ОП₇₅₀ 0,03–0,25 и распределяли по трем сосудам, в которых производился эксперимент. Пробы для определения сухой массы, пигментного состава и содержания общего белка, запасных углеводов и СЛ, а также для определения ЖК состава СЛ отбирали в конце экспоненциальной фазы (на 3-и сут) и при переходе к стационарной фазе (на 8–9-е сут, в зависимости от штамма). При этом из каждого сосуда отбирали по 30–40 мл суспензии и смешивали в одну общую пробу. Из общей пробы отбирали три пробы по 2–15 мл – для определения сухой массы, три пробы по 0,5–2 мл – для определения содержания пигментов, три пробы по 5 мл – для определения содержания общего белка, три пробы по 2 мл –

Условия хранения и культивирования изучаемых штаммов

Conditions of the strain maintenance and cultivation

Номер штамма	Вид	Среда для хранения	Среда для культивирования	Температура культивирования, °С
B-1200	<i>Cyanobacterium</i> sp.		Заррука мод. [19]	32
C-7	<i>Chlorella</i> sp.		Тамия [20]*	27
C-15	<i>Ch. vulgaris</i>		То же	28
C-1210	<i>Ch.</i> sp.		BG-11 [21]**	32
C-1509	<i>Nannochloris</i> sp.		Заррука мод.	27
P-500	<i>Galdieria partita</i>		Аллен [22]	40
P-507	<i>G. maxima</i>		То же	40
P-508	<i>G. daedala</i>		» »	40
P-513	<i>G. sulphuraria</i>		» »	40
P-510	<i>Cyanidium caldarium</i>		» »	40
C-70	<i>Vischeria</i> sp.	Тамия	Тамия, BBM-3N [22]	29
H-242	<i>V. punctata</i>	Прат [22]	То же	29

*С добавлением раствора Fe-ЭДТА, как в [19] (Supplemented by Fe-EDTA solution as described in [19]).

**С добавлением 20 мМ HEPES (Supplemented by 20 мМ HEPES).

для определения содержания запасных углеводов и одну пробу объемом 20–45 мл – для определения содержания СЛ и их ЖК состава. Все пробы для биохимического анализа осаждали центрифугированием и затем из них тщательно удаляли надосадочную жидкость. Пробы для определения содержания пигментов, общего белка и запасных углеводов хранили при –20 °С. Пробы для определения СЛ и их ЖК состава перед замораживанием сначала фиксировали в течение 10 мин при 65 °С в 5–7 мл горячего изопропилового спирта, содержащего 20 мг/л ионола в качестве антиоксиданта. Затем пробы анализировали, как описано ниже.

Анализ проб

Измерение скорости роста и продуктивности. Все использованные реактивы производства Sigma-Aldrich, США, если не указано иное. Рост культуры оценивали по изменению ОП₇₅₀ культуры и по приросту биомассы. Отобранные для измерения сухой массы пробы осаждали центрифугированием, промывали дистиллированной водой и высушивали полученный осадок в предварительно взвешенных емкостях в сушильном шкафу 24 ч при 80 °С.

Удельная скорость роста, μ , вычислялась по изменению ОП₇₅₀ культуры по формуле (1)

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}{t_2 - t_1}, \quad (1)$$

где N_1 и N_2 – ОП₇₅₀ культуры, измеренные во время t_1 и t_2 , соответственно.

Время удвоения биомассы $T_{удв}$ рассчитывали по удельной скорости согласно уравнению (2):

$$T_{удв} = \frac{\ln(2)}{\mu}. \quad (2)$$

Конечную продуктивность Π_k штаммов определяли по концентрации биомассы в конце культивирования.

Содержание Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов

Измерения проводили спектрофотометрически в метанольном экстракте (по [23] с модификациями): клетки зеленых, красных и охрофитовых микроводорослей предварительно разрушали бусами на вибрационной мельнице Retsh MM400 в течение 10 мин при частоте 30 кГц. Концентрацию пигментов (мг/л) рассчитывали по формулам:

$$\text{Хл } a = -8,0962(A_{652} - A_{720}) + 16,52(A_{665} - A_{720}) \quad (3)$$

$$\text{Хл } b = 27,44(A_{652} - A_{720}) - 12,17(A_{665} - A_{720}) \quad (4)$$

$$\text{Кар} = (1000(A_{470} - A_{720}) - 2,86 \text{ Хл } a - 29,2 \text{ Хл } b) / 221, \quad (5)$$

где A_x – поглощение света при длине волны x , Кар – концентрация суммарных каротиноидов [24, 25].

Концентрация общего белка

Для полной экстракции белка и для того, чтобы присутствие пигментов не влияло на спектр

поглощения реакционной смеси с бидинхониновым реагентом ВСА1, клетки предварительно разрушали в метанольном экстракте как описано выше для экстракции пигментов. Осадок промывали метанолом 2-3 раза до исчезновения окраски, затем метанол удаляли и осадок высушивали при 37 °С. Затем осадок ресуспендировали в 0,6–0,8 мл экстракционного буфера (50 мМ трис-НСl (рН=6,8), 10мМ ЭДТА и 2% ДНС). Белок экстрагировали из клеточного дебриса в течение ночи при комнатной температуре или в течение 10 мин при 95 °С. Концентрацию белка вычисляли по калибровочной кривой, предварительно построенной по серии разведений бычьего сывороточного альбумина.

Экстракция запасных углеводов и определение их содержания

Экстракция проводилась как было описано ранее ([26] с некоторыми модификациями). К замороженному осадку добавляли 400 мкл 30%-ного (в/о) КОН и инкубировали 90 мин при 95 °С для растворения гранул запасных углеводов и деструкции моно-, ди- и олигосахаридов. Затем запасные углеводы осаждали добавлением 1,2 мл этанола в течение ночи при –20 °С. Выпавшие в осадок углеводы собирали центрифугированием при 4 °С и 16000 g в течение 60 мин. Полученный осадок подсушивали 15 мин при 60 °С и гидролизовали до глюкозы в 80 мкл 2 М НСl 30 мин при 95 °С. Полученный раствор нейтрализовали добавлением 80 мкл 2 М NaOH и 40 мкл 1 М фосфатного буфера (рН 7) и разбавляли 200 мкл дистиллированной воды. Концентрацию глюкозы в полученном растворе определяли либо фенол-серноокислым методом, либо с помощью набора для определения концентрации глюкозы (GAGO20). Концентрацию крахмала определяли по калибровочной кривой, построенной по серии разведений глюкозы.

Содержание СЛ

Суммарные липиды оценивали газохроматографически в пересчете на количество этерифицированных ЖК на 1 г сухой массы клеток. Для этого в каждую пробу с фиксированными в изопропанол клетками добавляли 200–500 мкг маргариновой кислоты (C_{17:0}), используемой в качестве внутреннего стандарта. Изопропанол упаривали в вакууме и зафиксированные клетки гидролизовали в течение 1 ч при 80 °С в 20 мл 1М раствора КОН в 80%-ном этаноле. Затем избыток растворителя удаляли на роторном испарителе и добавляли к остатку 10 мл воды, после

чего тремя порциями *n*-гексана экстрагировали неомыляемые компоненты (продукты деградации пигментов, стерины, фенольные соединения и др.). Затем нейтрализовали КОН с помощью 20%-ной серной кислоты до слабокислой реакции (по индикаторной бумаге) и экстрагировали *n*-гексаном свободные жирные кислоты (СЖК), которые затем превращали в их метиловые эфиры (МЭЖК). Для получения МЭЖК СЖК выдерживали 1 ч в колбе с обратным холодильником в смеси метанол–ацетилхлорид (90:10 по объему) при температуре кипения смеси, после чего упаривали растворитель *in vacuo* и экстрагировали МЭЖК *n*-гексаном. Качественный и количественный состав МЭЖК определяли с помощью газожидкостного хроматографа Agilent 7890A (США) с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975С, укомплектованного капиллярной колонкой DB-23 длиной 60 м и диаметром 0,25 мм. Остальные условия проведения анализа: газ носитель–гелий, скорость потока 1 мл/мин, объем вводимого образца 1 мкл, делитель потока 1:5, температура испарения 260 °С. Программа градиента температуры анализа: от 130 до 170 °С с шагом в 6,5 °С/мин; от 170 до 215 °С с шагом в 2,5 °С/мин, 215 °С в течение 25 мин, от 215 до 240 °С с шагом 40 °С/мин; и окончательная стадия продолжительностью 50 мин при 240 °С. Рабочая температура масс-спектрометрического детектора была 240 °С, энергия ионизации 70 эВ. Пики МЭЖК идентифицировали как по их совпадению с эталонными спектрами библиотек NIST и Wiley, так и по их относительному времени удерживания и по значениям эквивалентной длины цепи.

Флуоресцентная микроскопия

Липидные глобулы в клетках микроводорослей окрашивали флуоресцентным красителем BODIPY 505/515 (Invitrogen, США), специфически связывающимся с нейтральными липидами [27]. Для окрашивания клеток пробы предварительно фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида в 0,1М натрий-фосфатном буфере (рН 7,2). Фиксированные пробы до анализа хранили при 4 °С. Перед окрашиванием клетки трижды отмывали в 1 мл 0,1М натрий-фосфатного буфера (рН 7,2). Окрашивание проводили в BODIPY растворенном в 200 мкл 0,1М натрий-фосфатного буфера до конечной концентрации 5 мкг/мл из исходного 0,1%-ного раствора в этаноле. Осадок ресуспендировали в растворе красителя и оставляли в темноте на 15 мин, после чего трижды промывали в 0,1М натрий-фосфатном буфере.

Флуоресцентный сигнал от красителя детектировали с помощью флуоресцентного микроскопа (Axio Imager Z2; Carl Zeiss, Германия) с использованием набора фильтров № 44 (возбуждение 475/40, пропускание 530/50).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость роста и конечная продуктивность

У автотрофных накопительных культур выделяют четыре основные фазы роста [28, 29]: лаг-фазу, экспоненциальную, линейную и стационарную. В лаг-фазе клетки адаптируются к новым условиям после инокуляции и рост отсутствует. В экспоненциальной фазе роста рост культуры не ограничен никакими внешними факторами, и биомасса увеличивается в геометрической прогрессии с постоянной удельной скоростью μ_{max} . При достижении культурой определенной плотности, скорость ее роста начинает ограничиваться недостатком освещенности из-за эффекта самоза-

тенения [30, 31]. Культура переходит в линейную фазу, в которой удельная скорость роста постоянно снижается ($\mu(t) < \mu_{max}$). Со временем начинают играть роль и другие лимитирующие факторы: снижение концентрации питательных элементов, накопление токсических продуктов жизнедеятельности клеток в среде, это приводит к дальнейшему снижению удельной скорости роста вплоть до нулевых значений. Фаза, в которой рост культуры отсутствует ($\mu=0$), называется стационарной. В стационарной фазе клетки могут прекратить деление, но продолжать накапливать биомассу.

Рост культур всех исследованных штаммов описывался классической сигмоидной кривой (рис. 1), но лаг-фаза ни у одной из культур не наблюдалась, так как культуры были предварительно адаптированы к условиям интенсивного культивирования.

Значения μ_{max} , $T_{удв}$ и P_k исследуемых штаммов приведены в табл. 3.

Штамм цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 имел один из самых высоких

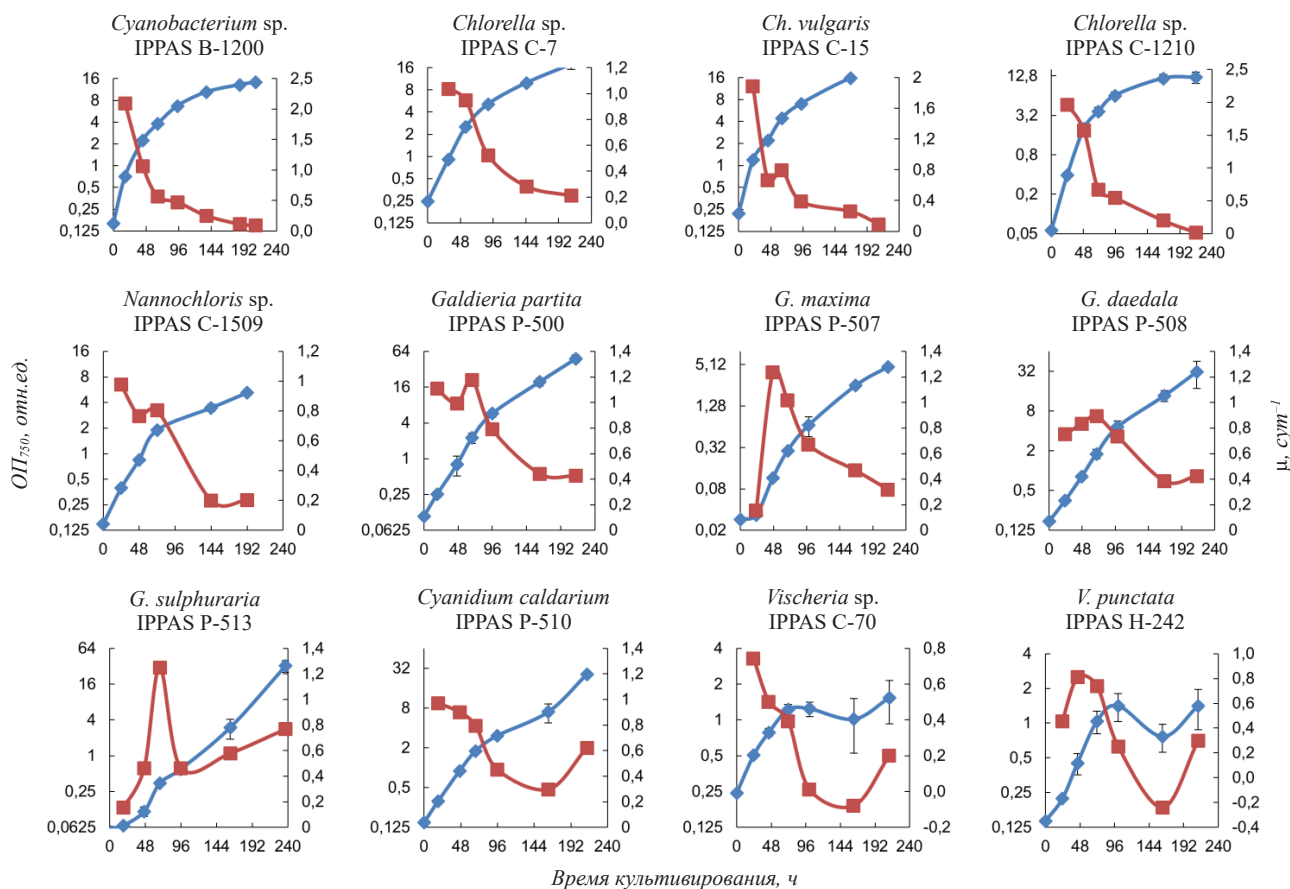


Рис. 1. Кривые роста и удельные скорости роста исследованных штаммов, \blacklozenge – кривая роста, \blacksquare – удельная скорость роста, μ

Fig.1. Growth curves and specific growth rates of the studied strains, \blacklozenge – growth curve, \blacksquare – specific growth rate, μ

Ростовые характеристики исследуемых штаммов

The growth characteristics of studied strains

Номер штамма IPPAS	Вид	μ_{\max} , сут ⁻¹	$T_{\text{удв}}$, ч	P_k , г с. м./л
B-1200	<i>Cyanobacterium</i> sp.	2,09	7,9	4,4
C-7	<i>Chlorella</i> sp.	1,03	16,1	7,8
C-15	<i>Ch. vulgaris</i>	1,89	8,8	8,9
C-1210	<i>Ch.</i> sp.	2,61	6,4	4,2
C-1509	<i>Nannochloris</i> sp.	0,98	17,0	2,5
P-500	<i>Galdieria partita</i>	1,18	14,1	7,0
P-507	<i>G. maxima</i>	1,24	13,4	3,6
P-508	<i>G. daedala</i>	0,89	18,6	12,9
P-513	<i>G. sulphuraria</i>	1,25	13,3	8,5
P-510	<i>Cyanidium caldarium</i>	0,97	17,1	6,8
C-70	<i>Vischeria</i> sp.	0,81	20,5	1,4
H-242	<i>V. punctata</i>	0,74	22,0	1,8

Примечание: μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста, $T_{\text{удв}}$ – время удвоения; P_k – конечная продуктивность.

Note: (μ_{\max}), maximal specific growth rate; ($T_{\text{удв}}$), doubling time and (P_k) final productivity.

показателей μ и $T_{\text{удв}}$ в экспоненциальной фазе составило 7,9 ч. Однако экспоненциальная фаза у этого штамма длилась только 1 сут, и уже в начале линейной фазы время удвоения увеличивалось до 15,7–35 ч. P_k *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 была ниже средних значений среди исследованных штаммов и составила 4,4 г с. м. /л.

У штаммов зеленых микроводорослей значения μ_{\max} находились в диапазоне 0,98–2,6 сут⁻¹, что соответствует $T_{\text{удв}}$ 17–6,4 ч. P_k этих штаммов составляла 2,5–8,9 г с. м./л. Штаммы *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 и *C. vulgaris* IPPAS C-15 имели одни из самых высоких показателей μ_{\max} , кроме того, штаммы *C. vulgaris* IPPAS C-15 и *Chlorella* sp. IPPAS C-7 отличались высокой продуктивностью.

Важно отметить, что температурные оптимумы роста не всегда соответствовали предположениям, основанным на происхождении исследуемых штаммов. Так, штамм *C. vulgaris* IPPAS C-15 был депонирован в коллекции как термофил. Ростовые характеристики этого штамма были исследованы при температурах 28 °С и 36 °С (рис. 2).

В экспоненциальной фазе роста разницы в μ_{\max} не было, однако, на более поздних стадиях роста культура имела более высокие показатели μ и продуктивности при 28 °С. Поэтому дальнейшие биохимические исследования проводили на культуре, выращенной при этой температуре. Штамм *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 был выделен из озера, в котором температура даже летом

опускается ниже 15 °С, однако температурный оптимум роста штамма находится в диапазоне 28–32 °С. Все дальнейшие исследования велись при температуре 32 °С.

Ацидотермофильные штаммы *Cyanidiophyceae* в экспоненциальной фазе росли со временем удвоения 13,3–18,6 ч, что для штаммов этой

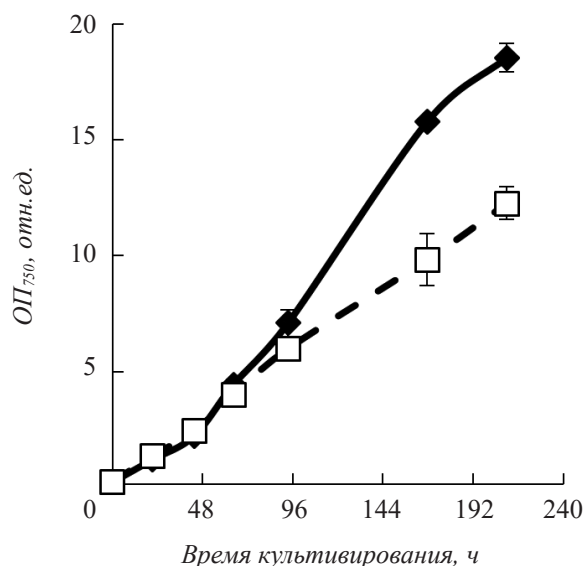


Рис. 2. Кривые роста штамма *C. vulgaris* IPPAS C-15 при температурах культивирования 28 °С (—♦—) и 36 °С (---□---)

Fig. 2. Growth curves of strain *C. vulgaris* IPPAS C-15 at 28 °С (—♦—) and 36 °С (---□---)

группы в условиях автотрофного роста является очень хорошим показателем [32]. Штаммы *G. sulphuraria* IPPAS P-513 и *G. maxima* IPPAS P-507 имели самые высокие значения μ_{max} , но при этом и самую короткую экспоненциальную фазу роста (1 сут). Штамм *G. partita* IPPAS P-500 был способен поддерживать относительно высокую скорость роста (среднее время удвоения 15 ч) в течение трех дней. Штаммы *G. daedala* IPPAS P-508, *G. sulphuraria* IPPAS P-513 и *G. partita* IPPAS P-500 имели одни из самых высоких показателей по конечной продуктивности биомассы среди всех исследованных штаммов, однако такая высокая конечная концентрация биомассы могла быть отчасти следствием повышенного испарения среды, так как культивирование происходило при температуре 42 °С.

Также необходимо отметить, что во время культивирования клетки всех штаммов Cyanidiphyceae имели тенденцию прикрепляться к стеклянным стенкам сосудов, таким образом уменьшая освещенность и затрудняя сбор биомассы. Клетки штаммов *G. maxima* IPPAS P-507 и *G. sulphuraria* IPPAS P-513 характеризовались наибольшей адгезией к стеклу, и поэтому наименее пригодны для массового культивирования.

Самый медленный рост и самую низкую Π_k показали штаммы Ochrophyta *Vischeria* sp. IPPAS C-70 и *V. punctata* IPPAS H-242. Это было связано с тем, что состав среды Тамия, на которой росли эти штаммы при хранении и при интенсивном культивировании, не является для них оптимальным. Среда Тамия содержит высокую концентрацию нитратов, фосфатов и ионов калия и магния, в ней отсутствуют ионы натрия. Эта среда оптимизирована для повышения выхода биомассы в накопительных культурах штаммов *Chlorella* и *Scenedesmus* [29]. Это подтвердилось для штаммов *Chlorella* sp. IPPAS C-7 и *C. vulgaris* IPPAS C-15, но, как оказалось, среда Тамия не подходит для штаммов *Vischeria* sp. IPPAS C-70 и *V. punctata* IPPAS H-242. При культивировании штаммов в жидкой среде Тамия удлинялась лаг-фаза в культурах, адаптируемых к интенсивному росту, рост биомассы обоих штаммов останавливался на низких значениях. Для выращивания пресноводных и почвенных штаммов Eustigmatophyceae чаще всего используют среды BG-11 и BBM-3N [33–35]. Сравнение роста *V. punctata* IPPAS H-242 на этих двух средах и на среде Тамия показало, что на BG-11 и BBM-3N данный штамм растет существенно быстрее, при этом скорости роста на средах BG-11 и BBM-3N отличались незначитель-

но (рис. 3). Однако в среде BG-11 клетки IPPAS H-242 были больше склонны к агрегации, поэтому была выбрана среда BBM-3N как оптимальная. На этой среде Π_k культуры *V. punctata* IPPAS H-242 достигала 5–6 г/л.

Среднее время удвоения биомассы автотрофно растущих микроводорослей составляет около 24 ч [36], время удвоения самых быстро делящихся штаммов, *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 (Cyanophyta) и *Picochlorum celery* (Chlorophyta) составляет 1,9 и 2 ч, соответственно [37, 38]. Все исследованные нами штаммы микроводорослей имели скорость роста выше средней (табл. 3). По ростовым характеристикам и по продуктивности наибольший интерес для биотехнологического применения представляют следующие штаммы: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Chlorella* sp. IPPAS C-1210, отличающиеся высокой скоростью роста; штамм *G. daedala* IPPAS P-508 – высокой продуктивностью; штамм *C. vulgaris* IPPAS C-15 – обоими показателями. Стоит отметить, что штамм *C. vulgaris* IPPAS C-15 имел высокие показатели продуктивности в широком диапазоне температур (28–36 °С) при росте на среде Тамия, богатой нитратами и фосфатами. Таким образом, этот штамм обладает необходимыми характеристиками для использования его в третичной очистке сточных вод с высоким содержанием этих ионов [7].

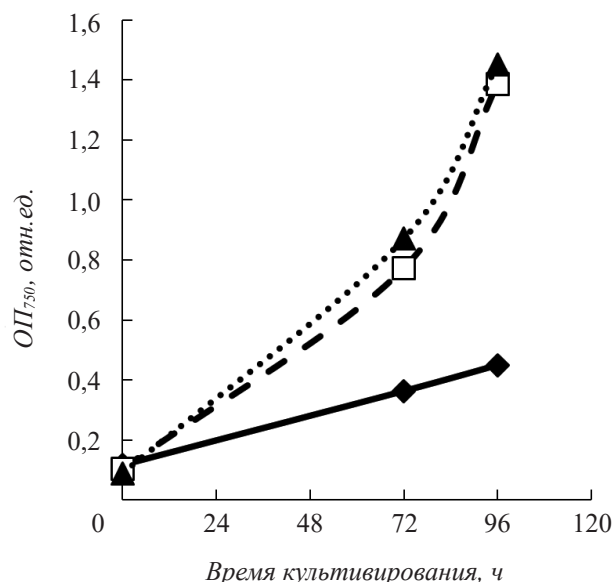
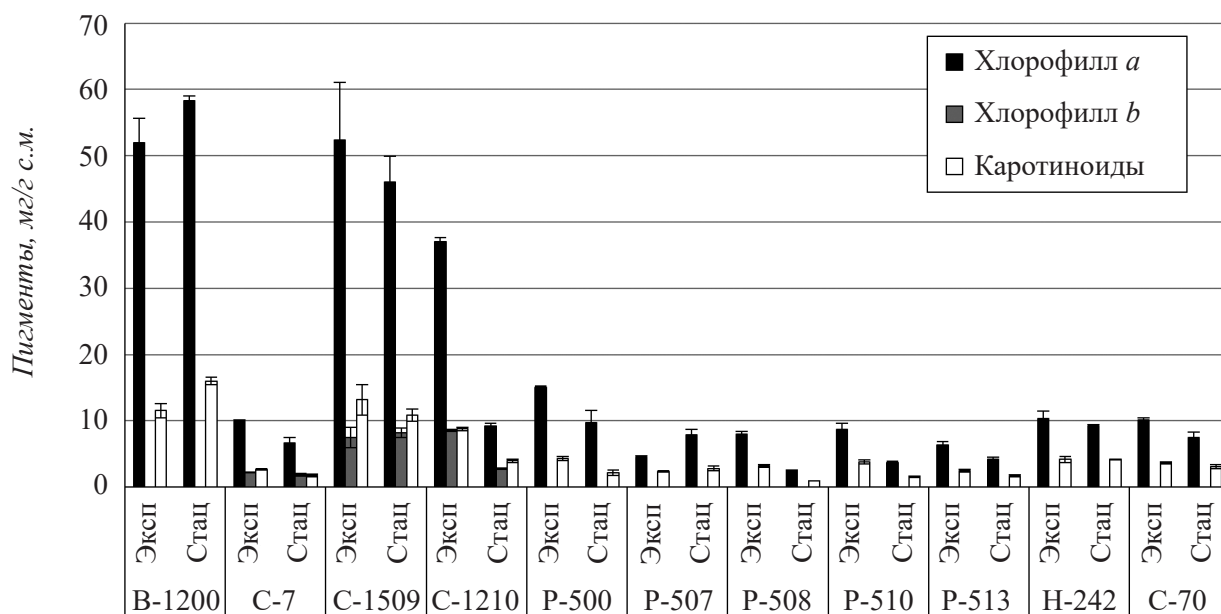


Рис. 3. Кривые роста штамма *V. punctata* IPPAS H-242 при культивировании на средах Тамия (-♦-), BG-11 (-□-) и BBM-3N (-▲-)

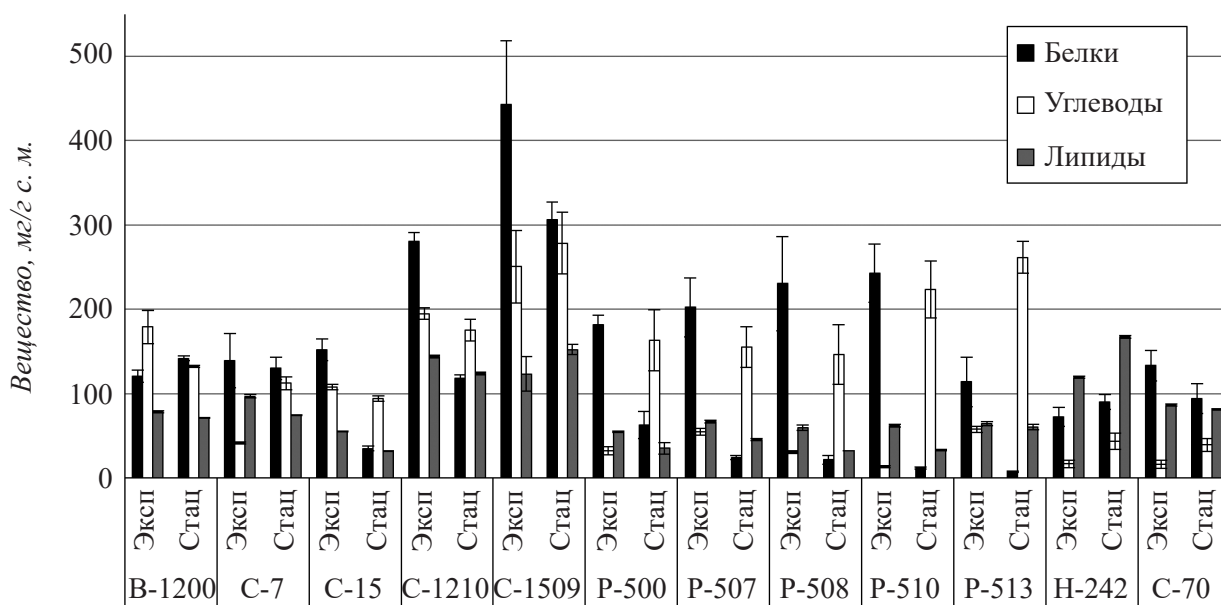
Fig. 3. Growth curves of strain *V. punctata* IPPAS H-242 grown on media Tamiya (-♦-), BG-11 (-□-) and BBM-3N (-▲-)

Стоит отметить, что достоверной корреляции между показателями скорости роста и продуктивности у исследованных штаммов выявлено не было, что согласуется с наблюдениями Ogbonna, et al. [30]. На конечный выход биомассы влияла не только μ_{max} , но и длительность экспоненциальной и линейной фаз, плотность изначального засева и состав среды культивирования. Снижение удельной скорости роста свидетельствует о появ-

лении лимитирующих факторов: недостатке освещенности, исчерпании запасов питательных веществ в среде, появлении токсичных продуктов метаболизма [29, 31]. Задачи оптимизации роста культур микроводорослей, таким образом, сводятся к снижению роли лимитирующих факторов и включают в себя подбор оптимальных условий освещенности, температуры и сбалансированного состава сред.



a



b

Рис. 4. Биохимический состав изучаемых штаммов в экспоненциальной (Эксп) и стационарной (Стац) фазах: a – содержание хлорофилла и каротиноидов; b – содержание общего белка, запасных углеводов и суммарных липидов. Обозначение штаммов см. табл 1

Fig. 4. Biochemical composition of algal strains in exponential (Exp) and stationary (Stat) growth phases. (a), chlorophyll and carotenoid content; (b), total protein, storage carbohydrate and lipid content. Designation of strains see in Table 1

Биохимический анализ

Пигментный состав. По пигментному составу изучаемые штаммы можно разделить на следующие группы. Штамм цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и штаммы Cyanidiophyceae содержат Хл *a*, каротиноиды и фикобилипротеины аллофикоцианин и фикоцианин. Штаммы Chlorophyta содержат Хл *a*, Хл *b* и каротиноиды. Штаммы Eustigmatophyceae содержат только хлорофилл *a* и каротиноиды.

Содержание хлорофилла и каротиноидов в клетках изучаемых штаммов в экспоненциальной и в стационарной фазах роста показан на рис. 4а.

У большинства штаммов в экспоненциальной фазе содержание хлорофилла составляло 4,5–15 мг/г с.м., содержание каротиноидов 2,5–4,3 мг/г с.м., что согласуется с имеющимися данными по среднему содержанию этих пигментов в микроводорослях [3]. Значительно более высокое содержание хлорофилла и каротиноидов наблюдалось у штаммов *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 и *Chlorella* sp. IPPAS C-1210: 37–52 мг/г с. м. и 8,8 мг/г с.м., соответственно. Также при выращивании штамма *V. punctata* IPPAS H-242 на среде ВВМ-3N содержание пигментов в экспоненциальной фазе возрастало по сравнению с культурой, выращенной на среде Тамия: содержание хлорофилла *a* до 16–18 мг/г с.м., каротиноидов – до 5 мг/г с.м.

При переходе к стационарной фазе содержание как хлорофилла, так и каротиноидов снижалось у большинства штаммов, за исключением *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *G. maxima* IPPAS P-507 и *V. punctata* IPPAS H-242. У *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и у P-507 содержание обоих классов пигментов даже несколько возрастало.

Хотя ни один из исследованных штаммов не показал способности накапливать значительные количества вторичных каротиноидов в условиях накопительной культуры, штаммы Eustigmatophyceae характеризовались высокой долей каротиноидов в пигментном составе, что может свидетельствовать об их потенциале как продуцентов каротиноидов при использовании стрессовых воздействий. Штаммы *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 и *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 могут быть использованы как продуценты хлорофилла. Полученный из хлорофилла хлорофиллин используется как биоактивная пищевая добавка [39] и в качестве корригента запаха для гериатрических пациентов [40].

Кроме того, штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и штаммы Cyanidiophyceae могут быть использованы для получения фикоцианина. В данной работе количественное содержание этого пигмента не исследовалось, но возможность использования *Galdieria sulphuraria* для крупномасштабного производства фикоцианина была показана в работах Sørensen, et al. [41]. Благодаря своим спектральным свойствам фикобилипротеины широко используются в качестве пищевых красителей и флуоресцентных маркеров в иммунных тестах и флуоресцентной микроскопии [3]. Также было показано, что фикоцианин обладает антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [4].

Содержание общего белка, запасных углеводов и суммарных липидов (рис. 4б). Содержание общего белка у большинства исследованных штаммов было выше в экспоненциальной фазе и находилось в диапазоне 73–443 мг/г с.м., в стационарной фазе оно снижалось у некоторых штаммов до 7–11 мг/г с.м. Содержание запасных углеводов, наоборот, в основном было выше в стационарной фазе и находилось в диапазоне от 16 до 279 мг/г с.м. Содержание липидов при переходе в стационарную фазу изменялось по разному и составляло от 32 до 168 мг/г с.м.

Важно отметить, что полученные нами значения ниже, чем приведенные во многих работах, но это объясняется не более низкой продуктивностью изучаемых штаммов, а использованием более точных методических подходов для оценки биохимического состава.

Так, содержание белка в биомассе микроводорослей в более ранних работах часто оценивалось по содержанию общего азота с использованием коэффициента 6,25 [20, 42]. Однако в содержание общего азота вносят свой вклад такие небелковые соединения, как нуклеиновые кислоты, амины, глюкозамины, азотсодержащие компоненты клеточной стенки, эти небелковые компоненты могут составлять 6–11,5 % общего азота [4], кроме того, было показано, что для микроводорослей коэффициент соответствия имеет более низкое значение (5,95) [43]. Используемый в работе метод позволял достичь сочетания наиболее полной экстракции общего белка и точности измерения его концентрации. Для более полной экстракции клетки разрушались механически бусами, для сольubilизации мембран и извлечения мембранных белков использовался 2%-ный ДСН. Концентрация белка определялась с использованием бицинонинового

реагента, который производил точные измерения в присутствии ДСН [44]. Пигменты, которые могли повлиять на спектр поглощения реакционной смеси, удалялись с помощью метанола.

Более высокие значения содержания СЛ были получены исследователями в основном гравиметрическим методом [32], при котором взвешивают сухой остаток экстракта из клеток микроводорослей, полученного экстракционными методами Фолча или Блайя–Дайера. Такой остаток, помимо липидов *sensu stricto*, неизбежно содержит другие липофильные компоненты, не имеющие в своем составе жирных кислот: свободные стерины, кетоны, углеводороды, флавоноиды, пигменты (хлорофиллы, каротиноиды), полигидроксипутират и прочие продукты клеточного метаболизма, что, естественно, значительно повышает содержание СЛ [45]. Подход, который был использован в данной работе, заключался в омылении 6%-ной водно-спиртовой щелочью предварительно зафиксированной биомассы и маргариновой кислоты, добавляемой в качестве внутреннего стандарта, с последующим отделением неомыляемых компонентов от свободных ЖК и ГЖХ-МС анализом метиловых эфиров ЖК. Несмотря на трудоемкость, данный метод гарантирует значительно более точное определение содержания СЛ, а также позволяет одновременно определить их ЖК-состав.

Если было учтено содержание всех углеводов [32, 35], то значения по содержанию углеводов получали более высокие. В данной работе оценивалось содержание только запасных углеводов, которые у исследуемых микроводорослей имеют разную природу: у *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и штаммов Cyanidiophyceae – это гликоген, у зеленых микроводорослей – крахмал [46], у штаммов Eustigmatophyceae – предположительно, хризоламинарин [46, 47]. Все эти полисахариды являются полимерами глюкозы, но в крахмале и гликогене глюкоза связана α -1,4 и α -1,6 гликозидными связями, а хризоламинарин является β -1,3- β -1,6-глюканом [46]. Используемый метод позволил отделить полисахариды от моно-, ди- и олигосахаридов, которые разрушались при нагревании в 40%-ном КОН. Однако при этом мог частично разрушиться и хризоламинарин, так как β -1,3- связи менее устойчивы к этому воздействию, чем α -1,4- и α -1,6-связи [48], а потому этот метод мог дать заниженные значения для штаммов Eustigmatophyceae. В дальнейшем гидролизе в 0,2 М HCl подвергались в основном именно запасные полисахариды, тогда как целлюлоза кле-

точных стенок намного более устойчива к такому воздействию, но при этом нельзя исключать гидролиз других компонентов клеточной стенки. Таким образом, глюкоза, концентрация которой измерялась на конечном этапе, была получена в основном в результате гидролиза запасных полисахаридов и частично компонентов клеточных стенок [26].

Среди всех исследованных штаммов, зеленые микроводоросли *Chlorella* sp. IPPAS C-1210, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 и представители Cyanidiophyceae *G. daedala* IPPAS P-508, *C. caldarium* IPPAS P-510 имели в экспоненциальной фазе самое высокое содержанием белка (23–44% от с.м.). Эти штаммы могут быть использованы в качестве белкового компонента кормовых и пищевых добавок. Белки большинства микроводорослей содержат практически весь набор аминокислот в необходимом составе, за исключением серосодержащих метионина и цистеина. Ряд исследований показали, что белок, полученный из водорослей, не уступает по качеству другим растительным белкам и в определенной дозе может быть использован в составе пищевого рациона человека и домашних животных [4, 32].

Штаммы *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Chlorella* sp. IPPAS C-1210, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 имели самое высокое содержание запасных полисахаридов среди исследованных штаммов как в экспоненциальной, так и в стационарной фазе (18–28% от с.м.). Штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 вдобавок секретировал большое количество экзополисахаридов (ЭПС), в стационарной фазе концентрация ЭПС достигала 1,01 г/л (рис. 5).

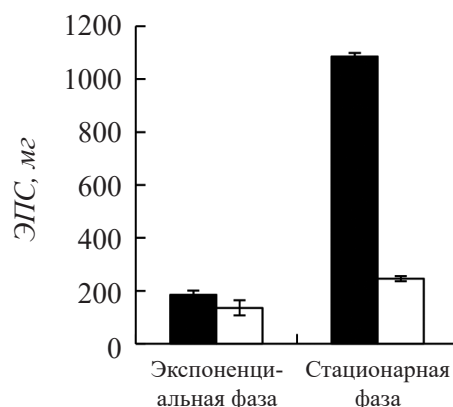


Рис. 5. Содержание экзополисахаридов в культуре *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 на разных стадиях роста в расчете на мл среды (■) и на г с.м. (□)

Fig. 5. Exopolysaccharides content in the culture of *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 at different growth phases per mL (■) of medium and g (□)

Штаммы *C. caldarium* IPPAS P-510 и *G. sulphuraria* IPPAS P-513 отличались высоким содержанием полисахаридов (23–28% от с.м.) только в стационарной фазе, остальные штаммы Cyanidiophyceae также накапливали углеводы, но в меньшем количестве. Биомассу водорослей, богатых углеводами, используют напрямую в качестве субстрата для брожения для получения этилового спирта [11, 49, 50] ЭПС многих микроводорослей и цианобактерий обладают антибактериальным и цитотоксическим действием и могут быть использованы в фармакологии [17].

Наиболее низкое содержание СЛ (3,2–6,7%) наблюдалось у представителей Cyanidiophyceae и у *C. vulgaris* IPPAS C-15, а наиболее высокие показатели (12,4–16,8%) были у штаммов *Chlorella* sp. IPPAS C-1210, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 в экспоненциальной и стационарной фазах роста и у штамма *V. punctata* IPPAS H-242 в стационарной фазе роста. Такое высокое содержание липидов свидетельствует о потенциальной перспективности этих штаммов для получения из них биодизеля или ценных жирных кислот.

Жирнокислотный состав суммарных липидов. В зависимости от штамма и стадии культивирования, главными ЖК (содержание >5% от суммы всех ЖК) были миристиновая (14:0), миристолеиновая (14:1 Δ^9), пальмитиновая (16:0), пальмитолеиновая (16:1 Δ^9), 7,10-гексадекадиеновая (16:2 $\Delta^{7,10}$), 7,10,13-гексадекатриеновая (16:2 $\Delta^{7,10,13}$), стеариновая (18:0), олеиновая (18:1 Δ^9), линолевая (18:2 $\Delta^{9,12}$), α -линоленовая (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) и эйкозапентаеновая (20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$), (табл. 4).

ЖК состав СЛ у *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 был исследован ранее [19], но только в линейной фазе роста. В настоящей работе в экспоненциальной и стационарной фазах ЖК СЛ этого штамма имели сходный состав: 95–96% составляли C_{14,16} насыщенные и мононенасыщенные ЖК: миристиновая, миристолеиновая, пальмитиновая и пальмитолеиновая, из которых более 40% приходилось на C₁₄ ЖК; оставшиеся 4–5% приходились на стеариновую и олеиновую ЖК. При этом в стационарной фазе индекс ненасыщенности возрастал от 0,470 до 0,522, в основном за счет изменения соотношения пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот в пользу последней. Как отмечалось ранее, такой уникальный состав ЖК *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 подходит для получения биодизеля с высоким цетановым индексом и низким йодным числом [51].

ЖК состав СЛ штаммов Chlorophyta достаточно типичен и в экспоненциальной фазе характеризовался преобладанием пальмитиновой, 7,10-гексадекадиеновой, линолевой и α -линоленовой кислот, индекс ненасыщенности у всех штаммов находился в диапазоне 1,685–1,776. Однако исследованные штаммы отличались по соотношению главных ЖК и по изменениям, происходящим в ЖК составе СЛ при переходе в стационарную фазу роста. Штаммы *Chlorella* sp. IPPAS C-7 и *C. vulgaris* IPPAS C-15 имели более высокое содержание 7,10-гексадекадиеновой и линолевой кислот, тогда как штаммы *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 и *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 имели более высокое содержание 7,10,13-гексадекатриеновой и α -линоленовой кислоты, штамм *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 отличался также повышенным содержанием пальмитиновой кислоты, а штамм *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 – повышенным содержанием олеиновой кислоты.

Высокое содержание $\Delta^7,10$ -гексадекадиеновой и 7,10,13-гексадекатриеновой кислот у этих представителей зеленых микроводорослей могут указывать на то, что синтез линолевой и α -линоленовой ЖК происходит у них двумя независимыми путями: как посредством C2-удлинения гексадеценых кислот, так и за счет последовательной Δ^9 -, Δ^{12} - и Δ^{15} -десатурации ацила стеариновой кислоты [52].

При переходе в стационарную фазу ЖК состав СЛ штаммов *Chlorella* sp. IPPAS C-7 и *C. vulgaris* IPPAS C-15 менялся незначительно: несколько уменьшалось содержание 7,10-гексадекадиеновой и α -линоленовой кислот и возрастало содержание линолевой кислоты. Индекс ненасыщенности при этом уменьшался незначительно – на 0,05–0,15 о. е.

У штаммов *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 и *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 при переходе в стационарную фазу происходили более значительные изменения ЖК состава. У *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 значительно возрастало содержание пальмитиновой, олеиновой и в меньшей степени линолевой кислоты и снижалось содержание 7,10-гексадекадиеновой, 7,10,13-гексадекатриеновой и α -линоленовой кислот. Индекс ненасыщенности уменьшался от 1,776 до 1,069. У *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 в стационарной фазе возрастало содержание 7,10-гексадекадиеновой, олеиновой и линоленовой кислот и уменьшалось содержание пальмитиновой, 7,10,13-гексадекатриеновой и α -линоленовой кислот. Индекс ненасыщенности уменьшался с 1,711 до 1,491 (см. табл. 4).

Таблица 4

Жирнокислотный состав общих липидов изучаемых штаммов (масс, %)
Total lipids fatty acid composition of the studied strains (mass, %)

ЖК	В-1200		С-7		С-15		С-1210		С-1509		Р-500		Р-507		Р-508		Р-510		Р-513		Н-242		С-70		
	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	Эксп	Стац	
12:0	0,9			0,0	0,0	0,6	0,0	0,0										1,1	1,1	1,4		0,6	0,8	1,6	0,8
14:0	31,0	32,5	1,0	1,3	1,0	1,4	0,5	0,5	0,7	0,5	1,2	1,1	0,6	1,2	1,3	2,0	2,4	2,3	2,9	1,4	5,9	7,7	6,1	7,5	
14:1Δ ⁹	13,2	15,0																							
16:0	18,6	13,3	18,8	19,0	18,9	21,7	25,5	35,9	16,5	13,6	42,9	32,8	43,2	43,8	47,5	42,3	42,5	42,5	43,8	35,6	22,1	20,2	27,7	24,7	
16:1Δ ⁷			0,7	1,4	0,8	0,9	0,9	1,2	1,6	1,7									0,7						
16:1Δ ⁹	30,8	34,7	2,1	1,3	1,4	1,4	0,0	0	5,0	2,8	1,2	0,7	0,8	0,7	0,6	2,0	1,9	1,9	2,6	0,8	39,3	39,1	29,7	35,2	
16:2Δ ^{7,10}			20,3	16,6	20,2	16,3	12,6	4,8	9,8	13,8											0,9	1,1	1,0	1,1	
16:2Δ ^{9,12}			0,4	0,4																	0,5	0,9	0,9		
16:3Δ ^{7,10,13}			2,9	1,6	2,1	0,9	15,7	4,6	11,4	5,1															
18:0	2,6	1,5	0,5	0,6	1,0	1,2	1,0	3,4	1,8	1,6	4,8	10,7	3,9	2,9	4,8	5,3	5,3	5,3	5,1	4,0	0,9	1,0	7,8	0,8	
18:1Δ ⁹	2,8	2,4	1,8	2,2	2,2	3,1	3,0	20,9	13,5	26,0	8,9	8,2	10,5	13,2	3,7	9,1	9,3	9,3	12,2	21,2	4,4	4,0	3,4	3,9	
18:1Δ ¹¹							0,7	0,7	1,7	2,4			0,5								0,7	0,8	0,5	0,8	
18:2Δ ^{9,12}			37,1	42,4	38,8	44,8	19,0	22,7	17,1	21,8	38,6	43,9	32,6	27,8	33,8	26,6	27,3	27,3	21,2	26,4	2,8	3,8	2,6	3,5	
18:3Δ ^{6,9,12}																					0,6	0,5	0,0	0,5	
18:3Δ ^{9,12,15}																					0,6	0,4	0,8	0,8	
20:1Δ ¹¹			14,4	12,8	13,2	7,6	20,9	5,0	20,3	0,7											9,1	0,4	0,8	0,8	
20:2Δ ^{11,14}																									
20:3Δ ^{8,11,14}											0,8	1,2	0,6		0,5	0,6									
20:4Δ ^{5,8,11,14}																		0,7							0,6
20:4Δ ^{8,11,14,17}																									
20:5Δ ^{5,8,11,14,17}																									
ИН, отн.ед.	0,470	0,522	1,721	1,67	1,685	1,531	1,776	1,069	1,711	1,491	0,924	1,012	0,983	1,000	0,925	0,941	0,942	0,942	0,877	1,036	1,501	1,466	1,269	1,456	

Примечание: Обозначение штаммов см. в табл. 1. ИН - индекс ненасыщенности.

Note: See Table 1 for the designation of strains. ИН - unsaturation index.

Таким образом, у всех исследованных штаммов зеленых микроводорослей в стационарной фазе происходили изменения в соотношении ЖК суммарных липидов с уменьшением индекса ненасыщенности в разной степени, в основном за счет уменьшения доли триеновых ЖК в пользу более насыщенных ЖК. Эти изменения были сильнее выражены в штаммах, имеющих высокое содержание липидов.

Известно, что триеновые $C_{16,18}$ обычно этерифицируют главные липидные классы мембран хлоропластов: моно- и дигалактозилглицерины и сульфохиновазилдиацилглицерин [52]. Более высокое содержание этих ЖК в экспоненциальной фазе хорошо объясняется более развитой системой мембран хлоропластов. Снижение количества триеновых кислот и повышение содержания насыщенных и мононенасыщенных ЖК в стационарной фазе может свидетельствовать о деградации мембран хлоропласта и образовании запасных липидов – триацилглицеринов (ТАГ). Образование ТАГ в клетках *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 и *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509, находящихся в стационарной фазе роста, было подтверждено с помощью окрашивания флуоресцентным красителем BODIPY (рис. 6). Снижение доли полярных липидов и увеличение количества запасных ТАГ наблюдалось и у других штаммов зеленых микроводорослей, богатых липидами [53].

Если рассматривать *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 и *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 с позиций их биотехнологического потенциала, то следует отметить высокое содержание линолевой кислоты в экспоненциальной и стационарной фазах и α -линоленовой кислоты в экспоненциальной фазе. Кроме того, в стационарной фазе эти штаммы способны накапливать значительное количество ненасыщенных и мононенасыщенных ЖК, скорее всего в составе ТАГ (рис. 6) и, таким образом, являются потенциальными производителями биодизеля.

ЖК-состав СЛ всех изученных штаммов *Cyanidiophyceae* характеризовался преобладанием пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и α -линоленовой кислот и зависел от фазы роста, изменяясь у каждого штамма по-разному.

Главными ЖК СЛ штаммов *Vischeria* sp. IPPAS C-70 и *V. punctata* IPPAS H-242 как в экспоненциальной, так и в стационарной фазе были миристиновая, пальмитиновая, пальмитолеиновая и эйкозапентаеновая (ЭПК) кислоты. Кроме того, оба штамма содержали 3–5% арахидоновой кислоты (АК). В организме человека АК и ЭПК

выступают как антагонисты (АК является предшественником провоспалительных простаноидов 2-й серии, ЭПК – предшественником противовоспалительных медиаторов семейства простаноидов 3-й серии). У человека ЭПК может синтезироваться из линолевой и линоленовых ЖК, однако этот путь синтеза малоэффективен, и ЭПК должна поступать с пищей, что особенно важно для здоровья детей и людей с рядом заболеваний. Благодаря противовоспалительному действию ЭПК дает положительный эффект при лечении воспалительных заболеваний кишечника, артритов, сердечно-сосудистых заболеваний и некоторых типов рака [54].

При выращивании на среде Тамия, ЖК-состав СЛ этих штаммов практически не изменялся при переходе в стационарную фазу роста. На более оптимальной среде ВВМ-3N у *V. punctata*

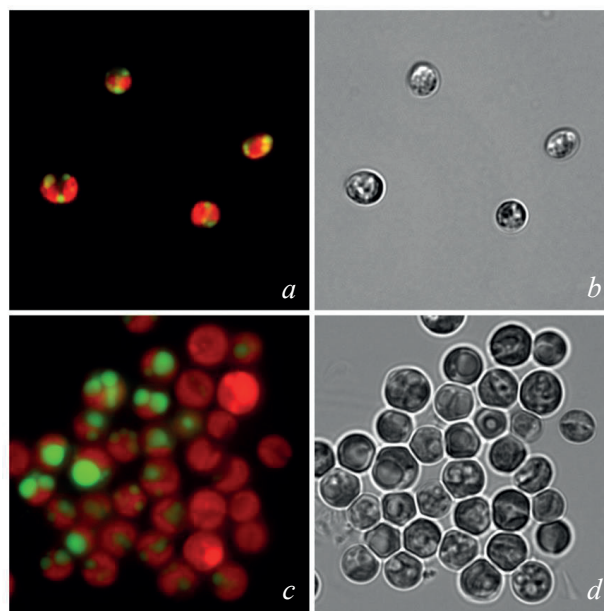


Рис. 6. Клетки микроводорослей, окрашенные флуоресцентным красителем BODIPY, специфично связывающимся с запасными липидами. *a, b* – *Chlorella* sp. IPPAS C-1210; *c, d* – *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509. *a, c* – флуоресцентные изображения; *b, d* – изображения в проходящем свете. Флуоресцентные изображения получены наложением двух флуоресцентных каналов: красный – автофлуоресценция хлорофилла, зеленый – флуоресценция красителя BODIPY в липидных глобулах

Fig. 6. Microalgae cells stained with BODIPY, a specific neutral lipid fluorescent dye. *a, b* – *Chlorella* sp. IPPAS C-1210; *c, d* – *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509. *a, c* – fluorescent images; *b, d* – bright field. Fluorescent images were obtained by overlaying images from two fluorescent channels: red - chlorophyll autofluorescence, green – fluorescence of BODIPY dissolved in lipid droplets

IPPAS H-242 содержание липидов в экспоненциальной фазе достигало 16,7% от с.м., а содержание ЭПК – 21,4% от суммы всех ЖК. Таким образом, в пересчете на сухую массу этот штамм содержал 3,6% ЭПК, что сравнимо с 3,8% у одного из наиболее эффективных продуцентов ЭПК – *Cyclotella cryptica* CСАР 1070/2 [35]. Можно сделать вывод о перспективности штамма *V. punctata* IPPAS H-242 для получения ЭПК, при этом он обладает довольно высокой скоростью роста и продуктивностью.

Итак, данная работа представляет собой первый этап исследования биотехнологического потенциала выбранных штаммов микроводорослей, позволивший определить направления биотехнологии, в которых изучаемые штаммы могут быть использованы. Биохимический состав микроводорослей был изучен на разных стадиях роста, что выявило пластичность метаболизма некоторых штаммов и позволило расширить границы их возможного применения.

Штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 отличался высокой скоростью роста в широком диапазоне температур, стабильным биохимическим составом на разных стадиях роста. Этот штамм галоалкалотолерантен, следовательно для его культивирования можно частично использовать морскую воду, имеющую более низкую стоимость, чем пресная. Его можно использовать для получения хлорофилла, фикоцианина, запасных углеводов и ЭПС, насыщенных и мононенасыщенных C_{14,16} ЖК для производства биодизеля.

Штамм *C. vulgaris* IPPAS C-15 имеет высокие показатели μ и продуктивности при росте на среде Тамия, богатой нитратами и фосфатами в широком диапазоне температур (28–36 °С) и, следовательно потенциально может быть использован для очистки сточных вод с высоким содержанием этих ионов. Необходимо дальнейшее изучение эффективности утилизации этих ионов данным штаммом в условиях культивирования в сточных водах.

Штамм *Chlorella* sp. IPPAS C-1210 также отличается высокой скоростью роста, его биомасса на разных стадиях роста богата белком и хлорофиллом или углеводами и липидами. Штамм *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509 растет несколько медленнее, но является галоалкалотолерантным и имеет более высокое содержание хлорофилла, белка, липидов и углеводов. В экспоненциальной фазе эти штаммы могут быть использованы для получения хлорофилла и кормовых или пищевых добавок с высоким содержанием белка и

незаменимых ЖК – линолевой и α -линоленовой. В стационарной фазе эти штаммы являются продуцентами ТАГ и могут быть использованы для получения биодизеля. После извлечения ТАГ оставшаяся богатая углеводами биомасса может быть использована в качестве субстрата для переработки бактериями и получения этилового спирта или метана.

Из исследованных штаммов Cyanidiophyceae наиболее перспективным для применения в биотехнологии оказался *Cyanidium caldarium* IPPAS P-510. Этот штамм имеет высокую скорость роста и продуктивность, в экспоненциальной фазе может быть использован для получения фикоцианина и в качестве кормовой или пищевой добавки, богатой белком. Клетки в стационарной фазе могут быть источником крахмала.

Штамм *V. punctata* IPPAS H-242 при выращивании на среде ВВМ-3N имел хорошие ростовые характеристики и проявил себя как потенциальный продуцент высокоценной эйкозапентаеновой кислоты.

Необходима оценка экономической целесообразности использования выбранных штаммов в производстве. Для этого на следующих этапах исследования предстоит произвести оптимизацию условий культивирования с целью увеличения выхода целевых продуктов, апробировать культивирование штаммов в промышленном масштабе, разработать для каждого штамма наиболее эффективные методы и технологии последовательной экстракции целевых продуктов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-14-00904.

ЛИТЕРАТУРА

1. Falkowski P.G., Raven J.A. Aquatic Photosynthesis. Second ed. Princeton, NJ.: Princeton University Press, 2007, 488.
2. Chisti Y. Constraints to commercialization of algal fuels. *J. Biotechnol.*, 2013, 167(3), 201–214. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.020
3. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., and Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, 101(2), 87–96. doi: 10.1263/jbb.101.87
4. Becker W. Microalgae in human and animal nutrition. In Handbook of microalgal culture [Edited by A. Richmond]. Blackwell: Oxford, 2004, 312–351.

5. Hudek K., Davis L.C., Ibbini J., and Erickson L. Commercial Products from Algae. In *Algal Biorefineries* [Edited by R. Bajpai, A. Prokop, and M. Zappi]. Springer: Dordrecht, 2014, 275–296.
6. Pacheco M.M., Hoeltz M., Moraes M.S.A., and Schneider R.C.S. Microalgae: Cultivation techniques and wastewater phycoremediation. *J. Environ. Sci. Health A*, 2015, 50(6), 585–601. doi: 10.1080/10934529.2015.994951
7. Solovchenko A.E., Semenova L.R., Selyakh I.O., et al. Assessment of a new *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) IPPAS C-2015 strain for application in poultry wastewater bioremediation. *Biotekhnologia*, 2016, 32(2), 72–81. doi: 10.21519/0234-2758-2016-2-72-81
8. Guiry M.D. How many species of algae are there? *J. Phycol.* 2012, 48, 1057–1063. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x
9. Levine I.A. Algae: a way of life and health. In *Microalgae in Health and Disease Prevention* [Edited by I.A. Levine, J. Fleurence]. Academic Press, 2018, 1–10. doi: 10.1016/B978-0-12-811405-6.00001-3
10. Gifuni I., Pollio A., Safi C., et al. Current bottlenecks and challenges of the microalgal biorefinery. *Trends in Biotechnol.* 2019, 37(3), 242–252. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.09.006
11. Petkov G., Ivanova A., Iliev I., and Vaseva I. A critical look at the microalgae biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2012, 114, 103–111. doi: 10.1002/ejlt.201100234
12. Deprá M.C., dos Santos A.M., Severo I.A., et al. Microalgal Biorefineries for Bioenergy Production: Can We Move from Concept to Industrial Reality? *BioEnergy Res.*, 2018, 11(4), 727–747. doi: 10.1007/s12155-018-9934-z
13. Bastiaens L., Van Roy S., Thomassen G., and Elst K. Biorefinery of algae: Technical and economic considerations. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* [Edited by C. Gonzalez-Fernandez, R. Muñoz]. Woodhead Publishing, 2017, 327–345. doi: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00014-5
14. Khozin-Goldberg I., Cohen Z. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. *Biochimie*, 2011, 93(1), 91–100. doi: 10.1016/j.biochi.2010.07.020
15. D'Alessandro E.B., Antoniosi Filho N.R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 2016, 58, 832–841. doi: 10.1016/j.rser.2015.12.162
16. Heydarizadeh P., Poirier I., Loizeau D., et al. Plastids of marine phytoplankton produce bioactive pigments and lipids. *Mar. Drugs.*, 2013, 11(9), 3425–3471. doi:10.3390/md11093425
17. Gacheva G.V., Gigova L.G. Biological activity of microalgae can be enhanced by manipulating the cultivation temperature and irradiance. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2014, 9(12), 1168–1181. doi: 10.2478/s11535-014-0350-x
18. Абдуллаев А.А., Семенов В.Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Теод и некоторые ее физиологические характеристики. *Физиол. раст.*, 1974, 21(6), 1145–1153
19. Sarsekeyeva F.K., Ussebaeva A.A., Zayadan B.K., et al. Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition. *Adv. in Microbiol.*, 2014, 04(15), 1033–1043. doi: 10.4236/aim.2014.415114
20. Hase E., Morimura Y., Tamiya H. Some data on the growth physiology of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, 69, 149–165. doi: 10.1016/0003-9861(57)90482-4
21. Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., and Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. rev.*, 1971, 35, 171–205.
22. Владимирова М.Г., Барцевич Е.Д., Жолдаков И.А. с соавт. IPPAS - коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР. В.: Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР [под редакцией В.Е. Семенова]. Изд-во РАН: Москва, 1991, 8–61.
23. Zavřel T., Sinetova M.A., and Červený J. Measurement of chlorophyll *a* and carotenoids concentration in cyanobacteria. *Bio-protocol*, 2015, 5(9), e1467. doi: 10.21769/BioProtoc.1467
24. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 1994, 144(3), 307–313. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2
25. Ritchie R.J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.*, 2006, 89(1), 27–41. doi: 10.1007/s11120-006-9065-9
26. Zavřel T., Očenášová P., Sinetova M.A., and Červený J. Determination of storage (starch/glycogen) and total saccharides content in algae and cyanobacteria by a phenol-sulfuric acid method. *Bio-protocol*, 2018, 8(15), e2966. doi: 10.21769/BioProtoc.2966
27. Rumin J., Bonnefond H., Saint-Jean B., et al. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnol. Biofuels*, 2015, 8: 42. doi: 10.1186/s13068-015-0220-4
28. Fogg G.E., Thake B. *Algal cultures and phytoplankton ecology*. London: University of Wisconsin Press, 1987, 273 p.
29. Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Биотехнология микроводорослей. Научный мир: Москва, 2012, 182 с.
30. Ogbonna J.C., Yada H., and Tanaka H. Kinetic study on light-limited batch cultivation of photosynthetic cells. *J. Ferm. Bioeng.*, 1995, 80(3), 259–264. doi: 10.1016/0922-338X(95)90826-L

31. Sinetova M.A., Červený J., Zavřel T., and Nedbal L. On the dynamics and constraints of batch culture growth of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142. *J. Biotechnol.*, 2012, 162(1), 148–155. doi: 10.1016/j.biortec.2012.04.009
32. Graziani G., Schiavo S., Nicolai M.A., et al. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food Funct.*, 2013, 4(1), 144–152. doi: 10.1039/C2FO30198A
33. Gao B., Yang J., Lei X., et al. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. *J. Appl. Phycol.*, 2016, 28, 821–830. doi: 10.1007/s10811-015-0626-1
34. Rampen S.W., Datema M., Rodrigo-Gámiz M., Schouten S., et al. Sources and proxy potential of long chain alkyl diols in lacustrine environments. *Geochem. et Cosmochem. Acta*, 2014, 144, 59–71. doi: 10.1016/j.gca.2014.08.033
35. Slocombe S.P., Zhang Q., Ross M., et al. Unlocking nature's treasure-chest: screening for oleaginous algae. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 9844. doi: 10.1038/srep09844
36. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, 2007, 25, 294–306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
37. Yu J., Liberton M., Cliften P.F., et al. *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 8132. doi: 10.1038/srep08132
38. Weissman J.C., Likhogrud M., Thomas D.C. High-light selection produces a fast-growing *Picochlorum celeri*. *Algal Res.*, 2018, 36, 17–28. doi: 10.1016/j.algal.2018.09.024
39. Tumolo T., Lanfer-Marquez U.M. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties? *Food Res. Intern.*, 2012, 46(2), 451–459. doi: 10.1016/j.foodres.2011.10.031
40. Young R.W., Beregi J.S. Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. *J. Am. Geriatrics Society*, 1980, 28(1), 46–47. doi: 10.1111/j.1532-5415.1980.tb00124.x
41. Sørensen L., Hantke A., Eriksen N.T. Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. *J. Sci. Food and Agricult.*, 2013, 93(12), 2933–2938. doi: 10.1002/jsfa.6116
42. Piorreck M., Baasch K.-H., Pohl P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochem.*, 1984, 23(2), 207–216. doi: 10.1016/S0031-9422(00)80304-0
43. González López C.V., García M.d.C.C., Fernández F.G.A., et al. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Biores. Techn.*, 2010, 101(19), 7587–7591. doi: 10.1016/j.biortech.2010.04.077
44. Stepanchenko N.S., Novikova G.V., Moshkov I.E. Protein quantification. *Rus. J. Plant. Physiol.*, 2011, 58(4), 737–742. doi: 10.1134/S1021443711040182
45. Halim R., Danquah M.K., and Webley P.A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(3), 709–732. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001
46. Suzuki E., Suzuki R. Variation of storage polysaccharides in phototrophic microorganisms. *J. Appl. Glycosci.*, 2013, 60(1), 21–27. doi: 10.5458/jag.jag.JAG-2012_016
47. Zhang J., Wan L., Xia S., Li A., et al. Morphological and spectrometric analyses of lipids accumulation in a novel oleaginous microalga, *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Eustigmatophyceae). *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2013, 36(8), 1125–1130. doi: 10.1007/s00449-012-0866-2
48. Евстигнеева Р.П., Серебрянникова Г.А., Звонкова Е.Н. с соавт. Химия биологически активных природных соединений. М.: Химия. 1976, 458 с.
49. John R.P., Anisha G.S., Nampoothiri K.M., and Pandey A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.*, 2011, 102(1), 186–193. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.139
50. Ho S.H., Huang S.W., Chen C.Y., Hasunuma T., et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour. Technol.*, 2013, 135, 191–198. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.015
51. Sarsekeyeva F., Zayadan B., Ussebaeva A., Bedbenov V., et al. Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. *Photosynthesis Res.*, 2015, p. 1–12. doi: 10.1007/s11120-015-0103-3
52. Guschina I.A., Harwood J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.*, 2006, 45(2), 160–186. doi: 10.1016/j.plipres.2006.01.001
53. Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M., and Garland C.D. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J. Appl. Phycol.*, 1993, 5(1), 71–83.
54. Lenihan-Geels G., Bishop K., and Ferguson L. Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients*, 2013, 5(4), 1301. doi: 10.3390/nu5041301

Assessment of Biotechnological Potential of Cyanobacteria and Microalgae Strains from IPPAS Culture Collection

M.A. SINETOVA^{1,*}, R.A. SIDOROV¹, A.Yu. STARIKOV¹, A.S. VORONKOV¹, A.S. MEDVEDEVA¹, Z.V. KRIVOVA¹, M.S. PAKHOLKOVA², D.V. BACHIN¹, V.S. BEDBENOV¹, D.A. GABRIELYAN¹, B.K. ZAYADAN³, K. BOLATKHAN³, D.A. LOS¹

¹*Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276*

²*Lomonosov Northern (Arctic) Federal University», Arkhangelsk, 163002*

³*Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040, Republic of Kazakhstan*

**e-mail: maria.sinetova@mail.ru*

Received December 13, 2018

Revised April 09, 2019

Accepted May 15, 2019

Abstract—A search for strains capable of simultaneously producing high amounts of several biologically valuable compounds and/or having high biomass productivity has been carried out. The growth characteristics and biochemical composition of 12 microalgae and cyanobacteria strains from the IPPAS Collection in the exponential and stationary growth phases were studied. All the strains had high growth rates (doubling time 6–22 h). The strains of *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Chlorella* sp. IPPAS C-1210, *Nannochloris* sp. IPPAS C-1509, *Cyanidium caldarium* IPPAS P-510 and *Vischeria* sp. IPPAS H-242 demonstrated the highest biotechnological potential and can be used for the production of various types of biofuel, pigments, feed and food additives, including those with high content of eicosapentaenoic (20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$) acid content.

Key words: microalgae, cyanobacteria, biochemical composition, fatty acids, valuable metabolites, growth characteristics

Acknowledgments—This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation [no. 14-14-00904]

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-12-29