На правах рукописи

ЖЕЛЕЗНОВА Светлана Николаевна

ПРОДУКЦИОННЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENBERG) REIMANN ET J.C. LEWIN 1964

03.02.10 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Севастополь - 2021

Работа выполнена в Отделе аквакультуры и морской фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь

Научный руководитель:
Рябушко Виталий Иванович – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, главный научный сотрудник, руководитель Отдела аквакультуры и морской фармакологии ФГБУН ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН", г. Севастополь

Официальные оппоненты:

Силкин Владимир Арсентьевич – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, главный научный сотрудник, руководитель Лаборатории экологии Южного отделения Института океанологии имени П.П. Ширшова РАН, г. Геленджик
Соловченко Алексей Евгеньевич – доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва

Ведущая организация:
Мурманский морской биологический институт РАН, г. Мурманск

Защита состоится «20» апреля 2021 г. в 14.00 час на заседании диссертационного совета Д900.009.01 при ФГБУН ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН" по адресу: 299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2. E-mail: dissovet@ibss-ras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН" по адресу:
299011, РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2, или на сайте
https://ibss-ras.ru/science/dissertation-council/announcement/1221/

Автореферат разослан «_ _» _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук Н.В. Поспелова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Морские диатомовые водоросли - ценное сырьё для получения биологически активных веществ (БАВ) с высоким содержанием фукоксантина (Фк) (Xia et al., 2013; Wang et al., 2018; Peraman et al., 2019), полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (Abdo et al., 2015; Demirel et al., 2015), белков (Junior et al., 2007), макро- и микроэлементов (Silva et al., 2015; Fox et al., 2018). БАВ диатомовых водорослей обладают иммуномодулирующими, антибактериальными, противогрибковыми, гипотензивными, противоопухолевыми, радиопротекторными, антиоксидантнными и другими полезными свойствами (Chung et al., 2013; Gammone et al., 2015; Lauritano et al., 2016; Neumann et al., 2019). Скорости роста и биосинтеза ценных веществ у водорослей достаточно высокие, поэтому они являются перспективным сырьем для создания лечебно-профилактических средств. Из всего разнообразия водорослей можно выделить бентопланктонную диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et J.C. Lewin 1964. Водоросль богата ПНЖК, среди которых преобладают эйкозапентаеновая и арахидоновая кислоты (Li et al., 2014; Saccà et al., 2018), содержит Фк (Wong et al., 2019), незаменимые аминокислоты (Junior et al., 2007), микро- и макроэлементы (Fox et al., 2018; Silva et al., 2015). Однако эти данные разрознены и не дают представления о её биотехнологическом потенциале. Таким образом, актуальность исследования определяется необходимостью изучения продукционных и биохимических характеристик *C. closterium* в накопительном и проточном режимах культивирования с целью определения основных характеристик субстратзависимого роста и биосинтеза ценных веществ, а также оптимизации условий культивирования для получения биомассы с высокой концентрацией Фк и ПНЖК.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время опубликованы данные в основном по накопительному режиму культивирования *C. closterium* на обеднённых питательных средах F/2 и F (Affan et al., 2009; Wang et al., 2018). Эти среды не позволяют получить плотную культуру и не дают возможности понять физиологические механизмы биосинтеза ПНЖК и фукоксантина. В литературе недостаточно освещено двухступенчатое проточное культивирование *C. closterium* и отсутствуют данные по культивированию водоросли в проточной культуре. Нет полного понимания механизмов накопления ПНЖК и фукоксантина при изменении условий культивирования. Поэтому данная работа посвящена исследованию продукционных характеристик и биохимического состава *C. closterium* в интенсивной накопительной и проточной культуре, а также определению оптимальных условий среды для роста микроводоросли и биосинтеза ценных веществ.

Цель работы - изучить продукционные и биохимические характеристики интенсивной культуры диатомовой водоросли *C. closterium* в накопительном и

проточном режимах культивирования для получения максимальной биомассы с высоким содержанием фукоксантина и ПНЖК.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить потребности *C. closterium* в биогенных элементах и разработать новую питательную среду для получения плотной культуры микроводоросли.
2. Определить оптимальный диапазон температур, pH, поверхностной облученности и соотношение концентраций биогенных веществ в питательной среде для роста *C. closterium* и биосинтеза ценных веществ в накопительной и проточной культуре.
3. Изучить биохимические и продукционные характеристики *C. closterium* в накопительном и проточном режимах культивирования и определить скорости синтеза фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот.
4. Разработать новые технологии получения целевых продуктов лечебно-профилактического назначения из биомассы и БАВ *C. closterium.*

Научная новизна. Разработана новая питательная среда для плотной культуры диатомовой водоросли *C. closterium* (Ryabushko et al., 2016). Установлено, что *C. closterium* может расти и вегетировать при высоких концентрациях нитрита, а добавление в питательную среду азота в аммонийной форме во время активного роста водоросли приводит к ингибированию всех процессов метаболизма и гибели культуры. Определены оптимальные параметры технологии выращивания *C. closterium*. Выявлен оптимальный диапазон температуры и поверхностной облучённости, pH для роста *C. closterium* и биосинтеза фукоксантина и ПНЖК. Установлена линейная связь массовой доли фукоксантина и общих липидов в биомассе *C. closterium* для различных условий культивирования. Впервые проведены исследования проточной культуры *C. closterium* в двухступенчатом хемостате. Разработаны новые технологии, защищённые патентами РФ, получения целевых продуктов лечебно-профилактического назначения из биомассы и БАВ *C. closterium* (Железнова и др., 2016; Рябушко и др., 2016 б; Нехорошев и др., 2016 б).

Теоретическая и практическая значимость. Определены потребности в основных биогенных элементах. Рассчитаны такие важные физиологические характеристики как максимальная удельная скорость субстратзависимого роста водоросли и константа насыщения при лимитировании роста кремнием. Подобраны оптимальные условия культивирования *C. closterium* (температура, pH, освещённость) на сбалансированной по биогенным элементам питательной среде для получения биомассы с высоким содержанием ПНЖК и Фк. Показано, что микроводоросль обладает значительным потенциалом для создания полупромышленной технологии получения фукоксантина и ПНЖК. Из биомассы микроводоросли *C. closterium* разработаны различные лечебно - профилактические добавки (патент РФ 2629276, патент РФ 2655221).

Методы исследования. Альгологически чистую культуру *C. closterium* выращивали на питательной среде F/2 (Guillard et al., 1962) в экстенсивном режиме. При интенсивном культивировании водоросли использовали разработанную нами питательную среду RS. Ультраструктуру клеток изучали в сканирующем электронном микроскопе (SU3500, Hitachi). Содержание Фк определяли методом тонкослойной хроматографии со стандартом кристаллического Фк, общих липидов – колориметрическим методом (Руководство ..., 2004). Жирнокислотный состав липидов *C. closterium* анализировали методом хромато-масс-спектрометрии. Идентификация метиловых эфиров жирных кислот выполнена на газовом хроматографе «Кристалл 5000.2» (СКБ ”Хроматэк”) с пламенно-ионизационным детектором в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ. Массовую долю белка в биомассе водорослей определяли по методу Лоури (Геворгиз, 2017), углеводы – по методу Дюбуа (Dibois et al., 1956) в нашей модификации.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Соотношения биогенных элементов в питательных средах, используемых для выращивания диатомовой водоросли *C. closterium*, не являются оптимальными для её интенсивного культивирования.

2. В культуре *C. closterium* процессы роста и синтеза биологически активных веществ разобщены во времени, поэтому для получения биомассы с высоким содержанием фукоксантина и ПНЖК необходимо использовать двухступенчатое проточное культивирование.

3. Скорость синтеза фукоксантина пропорциональна скорости синтеза суммарных липидов в биомассе *C. closterium.*

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена большим количеством экспериментов и отобранных проб, многократностью повторения измерений и применением статистических методов обработки экспериментальных данных. Все полученные результаты и выводы подкреплены данными, приведенными в рисунках и таблицах.

Личный вклад соискателя. Автор принимал непосредственное участие в постановке экспериментов по накопительному и проточному режимам культивирования *C. closterium*, в проведении биохимических анализов, самостоятельно интерпретировал и обобщал полученные данные. А также принимал участие в обсуждении результатов и написании текстов совместных статей с соавторами. Диссертационная работа написана лично соискателем.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены: Международная научная конференция «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России» (Ростов-на-Дону, 2014); IX и XI всероссийские научно-практические конференции молодых учёных по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus» (Севастополь, 2015, 2019); IV международная конференция «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, 2015); XI, XIII и XIV международные научно-технические конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2016, 2018,

Москва, 2019); Научно–практическая конференция «III российская конференция по медицинской химии, посвященная памяти академика Н.С. Зефирова» (Казань, 2017); XV всероссийская научно-практическая конференция имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 2018); III научно-практическая конференция и научная школа по клеточной биотехнологии «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере» (Якутск, 2018); VII научно-практическая конференция молодых учёных «Современные проблемы и перспективы развития рыбохозяйственного комплекса» (Москва, 2019).

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 212 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 291 источник, из них 232 иностранных. Работа содержит 19 таблиц и 64 рисунка.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 35 научных работ, из которых: 8 – в специализированных научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в т.ч. 3 патента. 5 статей входят в базу SCOPUS, 19 работ – в сборниках материалов и тезисов международных конференций. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоит в выборе и разработке методов исследования, получении экспериментальных данных, обсуждении и написании текста статей и тезисов. Права соавторов публикаций не нарушены.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю диссертационной работы, д.б.н. В.И. Рябушко за помощь при постановке цели и задач исследования, обсуждении результатов, участие в написании совместных работ. Особую благодарность выражаю к.х.н. М.В. Нехорошеву – за помощь в освоении методик определения фукоксантина, белков, углеводов, липидов и жирных кислот, к.б.н. Р.Г. Геворгизу – за помощь в проведении экспериментальных работ по культивированию *C. closterium*, к.б.н. Л.В. Ладыгиной - за содействие в работе, м.н.с. Н.И. Бобко – за помощь в определении содержания элементов в пробах, д.б.н. Л.И. Рябушко – за консультации по экологии и определению вида в световой и электронной микроскопии. Автор выражает благодарность Dr. Takashi Maoka (Research Institute for Production Development, Kyoto, Japan) за помощь в идентификации фукоксантина.

Основное содержание работы

Глава 1 Литературный обзор. Рассмотрен общий принцип биосинтеза фукоксантина и жирных кислот в диатомовых водорослях. Уделено внимание описанию внешних факторов, влияющих на содержание липидов, Фк и ПНЖК в клетках *C. closterium* при различных условиях культивирования. Показано, что *C. closterium* культивируют в основном в накопительном режиме на обеднённых питательных средах F/2 и F, которые не дают возможность получить плотную

культуру. Отмечено отсутствие данных по ее биохимическим и продукционным характеристикам в интенсивной накопительной и проточной культуре.

Глава 2 Материалы и методы исследований. Дано описание лабораторной установки и способа поддержания культуры *C. closterium* на люменостате в экстенсивном режиме. Описаны методы определения плотности водоросли прямым взвешиванием биомассы и мокрым сжиганием, который основан на полном разложении органических соединений в смеси серной кислоты и йодата калия при температуре 195°C. Массовую долю белка в биомассе водорослей определяли методом Лоури в модификации (Геворгиз и др., 2016), которая заключалась в том, что навеска не должна превышать 0,1г и щелочной гидролиз биомассы проводили в 1 N щелочи в течение 10 мин. Содержание общих липидов определяли калориметрическим методом (Агатова, 2004). Метилирование стандартов жирных кислот и липидной фракции в пробах проводили по (Кейтс, 1975). Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) определяли на газохроматографическом комплексе «Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонке BPX5 фирмы “SGE Analytical Science” длиной 60 м, с внутренним диаметром 0.25 мм и с толщиной неподвижной фазы 0.25 мкм в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИНБЮМ. Углеводы определяем по методу Дюбуа (Dibois et al., 1956) в нашей модификации. Содержание Фк в этанольном экстракте водоросли определяли методом препаративной ТСХ. Для определения концентрации азота и фосфора в *C. closterium* использовали методику Королева–Вальдеррама (Методы …, 1988). Для определения концентрации кобальта, цинка, меди и марганца в *C. closterium* использовали метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии с пламенной атомизацией. Статистический анализ экспериментальных данных выполнен в программе SciLab. Все измерения проводили в двух биологических и четырех аналитических повторностях. Статистическая достоверность основных параметров культивирования, а также элементного состава оценивали при помощи стандартных *t*-критерия (P = 0,95). Для расчёта доверительных интервалов использовали t-критерий Стьюдента для 95 % вероятности.

Главе 3. Продукционные характеристики диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*. Разработана новая питательная среда RS для интенсивного культивирования *C. closterium* с оптимальными концентрациями всех биогенных элементов на основе рассчитанных «истинных» потребностей в азоте, фосфоре и кремнии. Для выявления потребностей *C. closterium* в этих элементах при накопительном культивировании предварительно проведён химический анализ биомассы микроводоросли (табл. 1). Состав питательной среды RS приведён в расчёте на максимальную плотность 1 г сухой биомассы (табл. 2).

Азот является одним из важнейших биогенных элементов, поэтому исследованы продукционные характеристики *C. closterium* в зависимости от различных форм азота в составе питательной среды. Показана возможность поглощения *C. closterium* органических форм азота: мочевины, цистеина и аспарагин. Установлено, что вид растет и вегетирует при высоких концентрациях

нитрита в питательной среде (более 2 г·л$^{-1}$), а низкие концентрации азота в аммонийной форме (30 мкг·л$^{-1}$), добавленные в среду во время активного роста приводят к ингибированию всех процессов метаболизма и гибели культуры (рис. 1). Максимальная продуктивность *C. closterium* при использовании нитрата натрия и мочевины в качестве единственного источника азота составила 1,5 г·л$^{-1}$ в сутки (табл. 3). При этом расход мочевины при получении единицы биомассы был в два раза меньше, по сравнению с рассмотренными источниками азота. Следовательно, использование мочевины в качестве дополнительного источника азота позволяет получить максимальный выход биомассы.

Таблица 1 - Химический состав биомассы *C. closterium*

Макроэлементы	Содержание в биомассе, мг·г$^{-1}$	Микроэлементы	Содержание в биомассе, мкг·г$^{-1}$
Кремний	38,20 ± 0,01	Кобальт	11,0 ± 1,00
Азот	64,0 ± 1,00	Марганец	75,0 ± 3,00
Фосфор	16,6 ± 1,00	Цинк	75,0 ± 6,00
Железо	45,0 ± 0,20	Медь	30,0 ± 2,00

Таблица 2 - Состав питательной среды RS для культивирования *C. closterium* в интенсивном режиме

Компонент	Количество, г·л$^{-1}$
$NaNO_3$	0,3880
$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	0,0641
$Na_2SiO_3 \times 9H_20$	0,3860
Na_2EDTA	0,8720
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,1000
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0002
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,00044
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,0002
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	0,00036
$NaMoO_4 \times H_2O$	0,00012

В условиях накопительного культивирования рассчитана эффективность фиксации углерода в биомассе *C. closterium*. По результатам CHN-анализа доля углерода составляла 23 %. Расчёт эффективности фиксации углерода культуры произведён во время максимальной продуктивности. В условиях накопительного культивирования эффективность фиксации углерода достигала 90 %.

Таким образом, для обеспечения прироста 1 г биомассы *C. closterium* в сутки необходимо затратить 0,46 л CO_2, или 1132 л воздуха. Показана способность

C. closterium усваивать бикарбонаты, за счет чего наблюдается её активный рост без дополнительной подачи CO_2. Оптимальное значение pH среды для роста *C. closterium* находится в диапазоне 8,4-9,4. При достижении pH=9,9 культура переходит в фазу отмирания. Показано, что *C. closterium* – эвритермный вид и способен выживать и вегетировать в диапазоне температур от 5 ºС до 30 ºС. Гибель культуры наступает при температуре выше 35 ^{o}C и ниже 5^{o}C. Оптимальная температура роста и развития – 19-20 ºС.

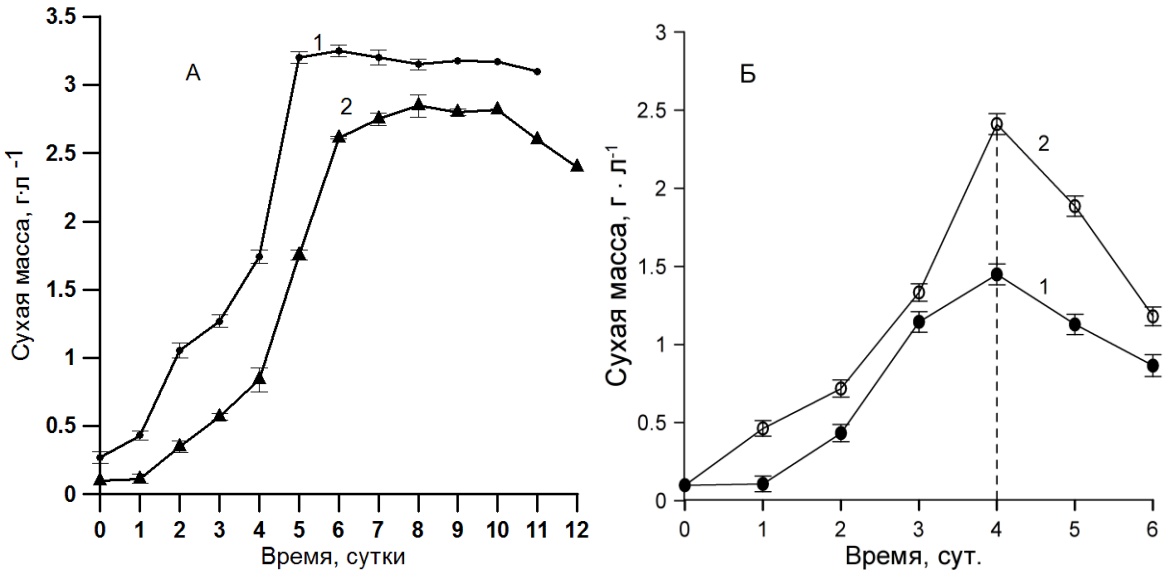

Рисунок 1 - Динамика плотности культуры *C. closterium* при использовании различных источников азота: А1 – нитрат натрия; А2 – нитрит натрия; Б1 – нитрат натрия; Б2 – мочевина. Вертикальная линия – время добавления сульфата аммония

Таблица 3 - Продуктивность диатомовой водоросли *C. closterium* при культивировании на питательной среде с различными источниками азота

Источники азота	Максимальная продуктивность, г·л$^{-1}$·сут$^{-1}$
Мочевина	1,5 ± 0,06
Нитраты	1,5 ± 0,05
Нитриты	1,0 ± 0,06
Цистеин	1,0 ± 0,07
Аспарагин	1,4 ± 0,07

Для определения оптимальной интенсивности света для роста *C. closterium* были использованы разные световые режимы: 6; 18; 25; 33 и 40 клк. При интенсивности освещения 18 и 6 клк наблюдается продолжительная стационарная фаза роста, что свидетельствует об эффективной работе фотосистем *C. closterium*. При интенсивности освещения 25 клк стационарная фаза составляет одни сутки, данная интенсивность освещения уже начинает оказывать ингибирующее действие на активность фотосистемы и процессы фотосинтеза. Таким образом установлено,

что оптимальная облученность, при которой зафиксирована максимальная продуктивность *C. closterium* – 235 мкЕ·м$^{-2}$·с$^{-1}$ (18 клк).

Известно, что многие ценные вещества диатомовые водоросли накапливают в стрессовых условиях, например, при лимитировании роста биогенными элементами. В работе с хемостатом мы использовали питательную среду RS с увеличенной концентрацией каждого компонента в 3 раза. После накопительного культивирования на 6-ой день эксперимента культуру выращивали в квазинепрерывном режиме со скоростью протока питательной среды через рабочий объём суспензии микроводоросли 0,6 л (скорость разбавления или удельная скорость протока ω = 0,3 сут$^{-1}$). С 17 по 27 день удельная скорость протока составляла 0,1 сут$^{-1}$, с 27 по 35-й день эксперимента – 0,5 сут$^{-1}$, с 35 по 40-й – 0,7 сут$^{-1}$ и с 40 по 44-й день – 0,9 сут$^{-1}$. Динамика плотности культуры *C. closterium* в накопительном и проточном режиме культивирования представлена на рис. 2.

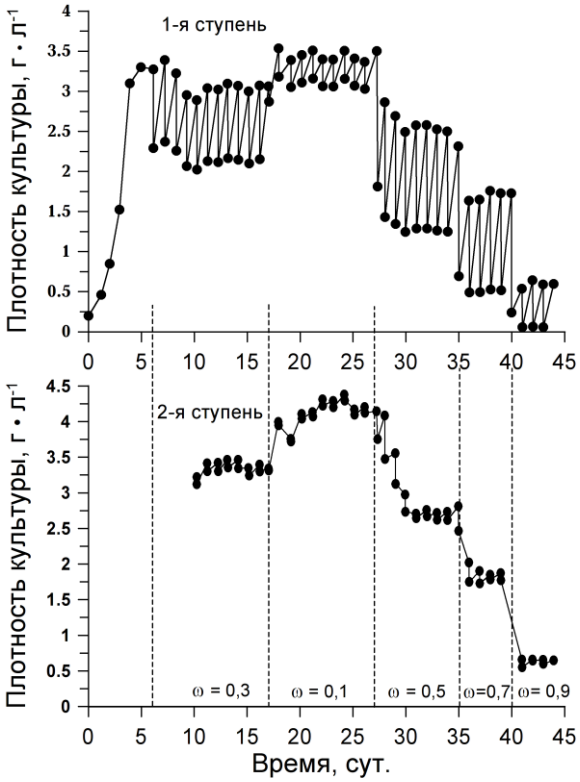

Рисунок 2 - Динамика плотности культуры *C. closterium* в накопительном режиме культивирования и двухступенчатом хемостате при различной скорости протока питательной среды (границы указаны пунктиром)

Для квазинепрерывной культуры в многоступенчатом хемостате получено уравнение, которое позволяет описать динамику плотности:

$$\frac{B_i}{\Delta t} = \mu_i \cdot B_i - \omega(B_i - B_{i-1}) \qquad (1).$$

При переходе к квазинепрерывному режиму наблюдалась быстрая адаптация к условия проточного культивирования. При изменении удельной скорости протока переходные процессы были непродолжительны (не более 2-3 суток), плотность культуры достаточно быстро достигала нового динамического равновесия (рис. 2),

поэтому в работе рассмотрены только установившиеся процессы. Экспериментально получена связь между плотностью культуры в 1-й и 2-й ступнях хемостата (рис. 3), которая достаточно точно описывается линейной функцией:

$$B_i = \frac{\omega}{\omega-\mu_i} B_{i-1}, \frac{\omega}{\omega-\mu_i} = \mathrm{tg}\alpha = 1{,}11 \qquad (2)$$

где B_i, B_{i-1} – плотность культуры в 1-й и 2-й ступенях хемостата; ω, μ_i – удельная скорость протока и роста в текущей ступени хемостата. Из рис. 3 видно, что даже при максимальной скорости протока, когда наблюдался пристеночный рост, связь между плотностью культуры в 1-й и 2-й ступени описывается выражением (2).

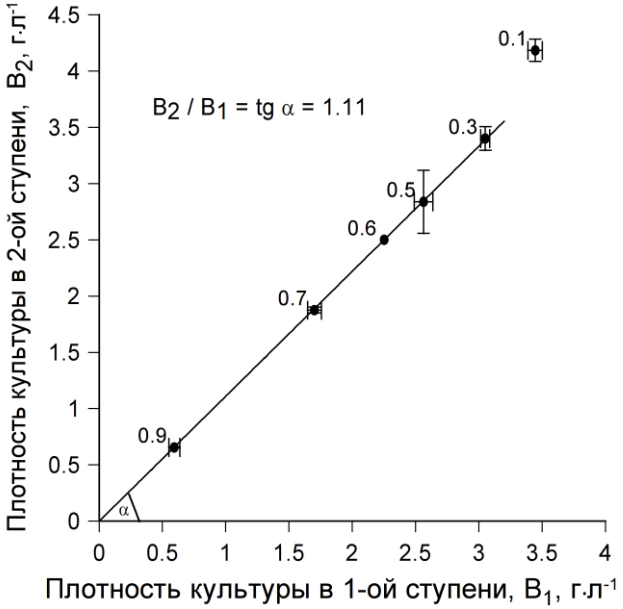

Рисунок 3 - Связь между плотностью культуры в 1-й и 2-й ступенях хемостата в условиях стационарного динамического равновесия

Для условий стационарного динамического равновесия получены выражения, описывающие зависимость плотности культуры от удельной скорости протока.

$$B_1(\omega) = \frac{1}{Y_{\text{пр}}}\left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega}\right) \ (3.1); \quad B_2(\omega) = \frac{q_2}{Y_{\text{пр}}}\left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega}\right) \ (3.2), \text{где } q_2 = \mathrm{tg}\,\alpha = 1{,}11.$$

Найдём величину урожая (R) при различных режимах культивирования. Для этой цели подсчитаем суммарную продуктивность культуры в i ступенях хемостата в условиях стационарного динамического равновесия по формуле:

$$R_i = \sum_{k=i}^{i} \overline{P_k} = \omega \cdot B_i \qquad (4).$$

В результате получим аналитические выражения для зависимости плотности культуры от удельной скорости протока:

$$R_1(\omega) = \omega \ \frac{1}{Y_{\text{пр}}}\left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega}\right); \ R_2(\omega) = \omega \ \frac{q_2}{Y_{\text{пр}}}\left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega}\right) \qquad (5).$$

Получены зависимости продуктивности одно- и двухступенчатого хемостата от удельной скорости протока. На рис. 4 и 5 представлены соответствия экспериментальных данных и теоретических кривых.

Дифференцируя полученные выражения по ω, находим оптимальную скорость протока для получения максимального урожая:

$$\omega_{opt} = \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}}\right) \quad (6).$$

Проведённые исследования показали, что культура *C. closterium* характеризуется достаточно высокими показателями продуктивности, как в накопительной, так и в прочной культуре. В накопительной культуре удельная скорость роста достигает $\mu_н = 0{,}7$ сут$^{-1}$, а время удвоения биомассы - $t_d = 0{,}987$ сут.

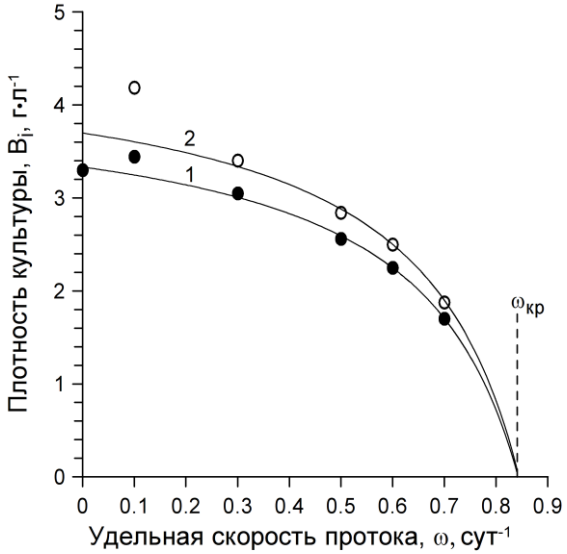

Рисунок 4 - Зависимость плотности культуры *C. closteum* от удельной скорости протока ω в условиях стационарного динамического равновесия: 1 – первая ступень хемостата, расчёт по уравнению (3.1); 2 – вторая ступень, расчёт по уравнению (3.2). Пунктиром указана критическая скорость разбавления

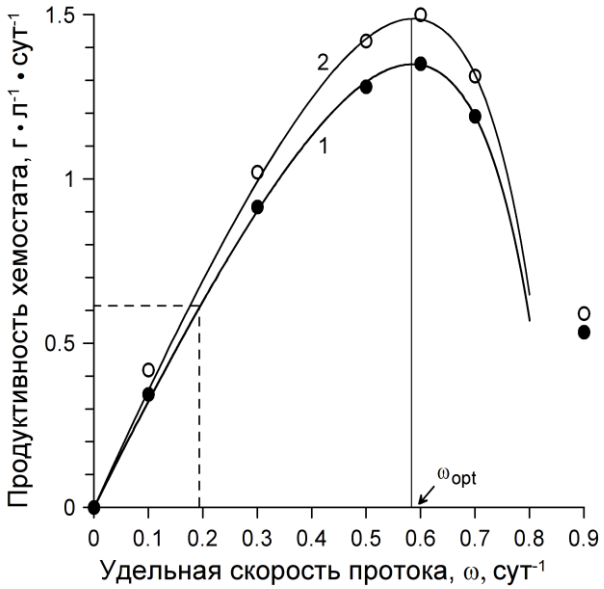

Рисунок 5 - Зависимость продуктивности хемостата в условиях стационарного динамического равновесия от удельной скорости проток. Стрелкой указано оптимальное значение удельной скорости протока, при котором достигается максимальная продуктивность. Для сравнительной оценки пунктиром указана продуктивность накопительной культуры

В проточной культуре при критической скорости разбавления предельное значение удельной скорости роста культуры достигает $\tilde{\mu}_1 = 0{,}84$ сут$^{-1}$. Для условий

эксперимента в одно- и двухступенчатом хемостате максимальная продуктивность наблюдается при оптимальной скорости протока $\omega_{opt}=0,59$ сут$^{-1}$ и составляет $R_1=1,348$ г·л$^{-1}$·сут$^{-1}$ и R_2=1,498 г·л$^{-1}$·сут$^{-1}$. Показано, что в проточной культуре продуктивность *C. closterium* выше в 2,2 раза в сравнении с периодической.

На основе экспериментальных данных проведён расчёт двух параметров уравнения Моно: максимальной удельной скорости роста $\mu_m=1,05$ сут$^{-1}$ и константы насыщения $K_S=0,028$ г·л$^{-1}$ при лимитировании роста *C. closterium* кремнием. Также рассчитана наблюдаемая потребность *C. closterium* в кремнии в проточной культуре $Y_{пр}=35$ мг·г$^{-1}$. Наблюдаемая потребность в кремнии в проточной культуре ниже, чем в накопительной на 7,9 %. Отметим, что величины μ_m, K_S и $Y_{пр}$ являются важными физиологическими характеристиками водоросли *C. closterium*, которые играют ключевую роль при проектировании промышленных систем для интенсивного культивирования микроводорослей.

Главе 4 Биохимический состав диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* при разных режимах культивирования.

Накопительный режим культивирования. Биохимический состав *C. closterium* при накопительном режиме культивирования определяли на каждой фазе роста (табл. 4). В зависимости от фазы роста содержание суммарных белков изменяется от 33 до 40 %. В экспоненциальной фазе роста содержание белка составляет 38-40 %, при достижении стационарной фазы роста снижается до 35-33 % и остаётся постоянным на протяжении всей стационарной фазы.

Таблица 4 - Биохимический состав *C. closterium* в режиме накопительного культивирования

Фазы роста	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %	Зола, %
Экспоненциальная	2±0,1	40±0,4	22±0,2	35±0,3
Замедления роста	11±0,1	36±0,4	16±0,2	33±0,3
Начало стационарной фазы (8-ые сутки)	17±0,1	35±0,4	12±0,2	31±0,3
Конец стационарной фазы (21-ые сутки)	28 ±0,1	33±0,4	7± 0,2	30±0,3

Концентрация суммарных липидов и углеводов в биомассе *C. closterium* изменяется в широких пределах в зависимости от фазы роста. Во время активного роста культуры зафиксированы максимальные концентрации углеводов (22-23 %). При переходе культуры в стационарную фазу содержание углеводов снижается до 12-13 % и уменьшается на протяжении всей стационарной фазы. В конце стационарной фазы (7-ые сутки) содержание углеводов составляет 7-8 %. В

экспоненциальной фазе биомасса характеризуется минимальным содержанием липидов (3-5 %). При переходе культуры в стационарную фазу наблюдается достаточно высокие накопление суммарных липидов – от 25 до 28 %. Высокая концентрация липидов в стационарной фазе обусловлена снижением облученности на единицу биомассы, а также лимитированием биогенными элементами.

Доля жирных кислот от общего содержания липидов и в пересчете на сухую массу возрастает на протяжении всей стационарной фазы. В условиях экспоненциального роста на 4-ые сутки доля ЖК составляет 41 % общих липидов или 1,7 % сухой массы, в начале стационарной фазы роста (7-ые сутки) доля ЖК достигает 42 % общих липидов или 7,14 % сухой массы и в конце стационарной фазы (21-ые сутки) содержание жирных кислот составляет 50 % общих липидов или 12,5 % сухой массы. Возможно, это обусловлено изменением пропорции отдельных классов липидов в процессе роста микроводоросли, а также изменением состава ЖК в самих классах липидов (Liang et al., 2002; Demirel et al., 2015). Концентрации индивидуальных ЖК указаны в таблице 5. Жиры *C. closterium* по кислотному составу представляют собой смесь, состоящую из ненасыщенных и насыщенных кислот с C_{14} – 1-2 %, C_{16} – 50-62 %, C_{18} – 7-8 %, C_{22}-1-3 % и C_{20} – 27-34 %.

Среди моноеновых кислот преобладает пальмитолеиновая кислота (27,5-39 %), максимальное содержание которой зарегистрировано в экспоненциальной фазе роста (39 % от суммы ЖК); при достижении культуры стационарной фазы концентрация данной кислоты существенно снижается и составляет 29,7 % ЖК, и продолжает уменьшаться на протяжении всей стационарной фазы роста. Это можно объяснить тем, что данная кислота находится в начале цепочки биосинтеза длинноцепочечных жирных кислот (Li et al., 2014).

Основную долю насыщенных жирных кислот составляет пальмитиновая кислота (19-19,5 % суммы ЖК). Доля данной кислоты от суммы ЖК при накопительном культивировании не изменяется, что обуславливает неизменную долю насыщенных жирных кислот во всех фазах роста. Данный факт можно объяснить тем, что насыщенные жирные кислоты в основном входят в состав триацилглицеридов, которые могут накапливаться внутри клетки в виде жировых вакуолей и служить запасным энергетическим субстратом при неблагоприятных условиях (Sayanova et al., 2017). Среди полиеновых кислот наиболее высокое содержание зарегистрировано эйкозопентаеновой (16-20 %), гексадекатриеновой (15 %) и арахидоновой (7-13 %) кислот (табл. 5).

Микроводоросль *C. closterium* отличается высоким содержанием эйкозапентаеновой (16 -20 %) и арахидоновой (7-13 %) кислот во всех фазах роста, что имеет большое прикладное значение. В целом, у *C. closterium* преобладают ω3 ПНЖК. Соотношение ω-6/ω-3 варьирует от 0,57 до 0,89 в зависимости от фазы роста.

Таблица 5 - Жирнокислотный состав *C. closterium* при различных фазах роста в накопительном режиме культивирования

Наименование жирных кислот	Концентрация, % от суммы ЖК		
	Экспоненциальная фаза	Начало стационарной фазы	Конец стационарной фазы
Миристиновая (С14:0)	1,23±0,09	2,06±0,15	2,05±0,15
Пентадекановая (С15:0)	0,36±0,055	0,25±0,038	0,38±0,057
Пальмитиновая (С16:0)	19,17±1,2	19,42±1,23	19,21±1,21
Стеариновая (С18:0)	1,28±0,122	0,79±0,075	0,42±0,04
Сумма насыщенных ЖК	22,04	22,45	22,01
Пальмитолеиновая (С16:1ω7)	39±2,60	29,74±2,0	27,49±1,85
Олеиновая (С18:1ω9c)	1,47±0,26	1±0,25	1±0,25
10-транс октадеценовая кислота (С18:1ω9t)	2,76±0,23	2,9±0,23	3,95±0,24
Сумма моноеновых ЖК	43,23	33,6	32,5
Гексадекатриеновая (С16:3ω4)	1,33±0,06	8,33±0,36	15,07±0,77
γ-линоленовая (С18:3ω6t)	1,16±0,1	1,91±0,16	1,92±0,16
Линолевая (С18:2ω6c)	0,83±0,13	1,28±0,21	1,00±0,17
Арахидоновая (С20:4ω6)	7,92±0,93	13 ±1,45	10,6±1,18
Эйкозопентаеновая (С20:5ω3)	19,17±1,37	20±1,39	16±1,11
Дигомо-γ-иноленовая (С20:3ω6)	0,34±0,042	0,3±0,042	0,31±0,38
Докозапентаеовая (С22:4 ω6)	1,27±0,04	0,85±0,08	0,88±0,08
Докозагексаеновая (ДГК) С22:6 ω3	1,71±0,44	0,35±0,09	0,33±0,085
Сумма ПНЖК	33,6	45,7	45,2
Отношение ω6/ω3	0,57	0,86	0,89

При накопительном культивировании установлено, что концентрация Фк в начале стационарной фазы сильно варьировала в зависимости от соотношения N : P в среде RS. Эксперименты проводили с соотношением N : P, равными 6, 9, 12,15 и 23. При увеличении соотношения до 15 концентрация Фк в биомассе в начале стационарной фазы линейно возрастает и достигает 7 мг·г$^{-1}$ (табл. 6). Дальнейшее увеличение соотношения N : P не приводит к значительным изменениям содержания Фк в биомассе. Следовательно, для максимально высокого выхода Фк в *C. closterium* в начале стационарной фазы необходимо оптимальное соотношение N : P = 15 в среде RS. В дальнейшем исследовали динамику изменения Фк в

интенсивной культуре *C. closterium* в различных фазах роста при соотношении азота к фосфору, равном 15. В течение всей стационарной фазы зафиксировано постоянное увеличение содержания Фк в биомассе *C. closterium* и в конце стационарной фазы (на 16-е сутки) концентрация фукоксантина достигала своего максимального значения 19 мг·г$^{-1}$.

Таблица 6 - Концентрация и скорость синтеза фукоксантина у *C. closterium* на разных фазах роста при культивировании на среде RS при соотношении N : P = 15

Фаза роста	Концентрация, мг·г$^{-1}$	Скорость синтеза, мг·г$^{-1}$·сут$^{-1}$
Экспоненциальная	1,5 ± 0,2	0,3 - 0,4
Начало стационарной	7,0 ±0,2	1,0 - 1,1
Конец стационарной	19,0 ± 0,2	1,3 – 1,2

Установлена линейная зависимость между концентрациями Фк в диапазоне от 0 до 10 мг·г$^{-1}$и общих липидов в биомассе *C. closterium* (рис. 6). Затем концентрация Фк увеличивается, а содержание липидов остается неизменным. Возможно, линейная зависимость между концентрациями Фк и общих липидов до определенного значения Фк в культуре можно объяснить тем, что и Фк и липиды являются структурными компонентами пластид (Тренкеншу, 2016) и синтез липидов, в основном, идет по прокариотическому пути метаболизма, а не по эукариотическому пути (Pratiwi et al., 2009). Зная концентрацию Фк у *C. closterium*, можно определить концентрацию липидов по уравнению: $С_{лп} = К \cdot С_{Фк}$, где $С_{лп}$ – концентрация липидов, %; $С_{фк}$ – концентрация Фк, мг·г$^{-1}$; К = 2,28 – коэффициент перехода от концентрации Фк (м·г$^{-1}$) к концентрации общих липидов (%).

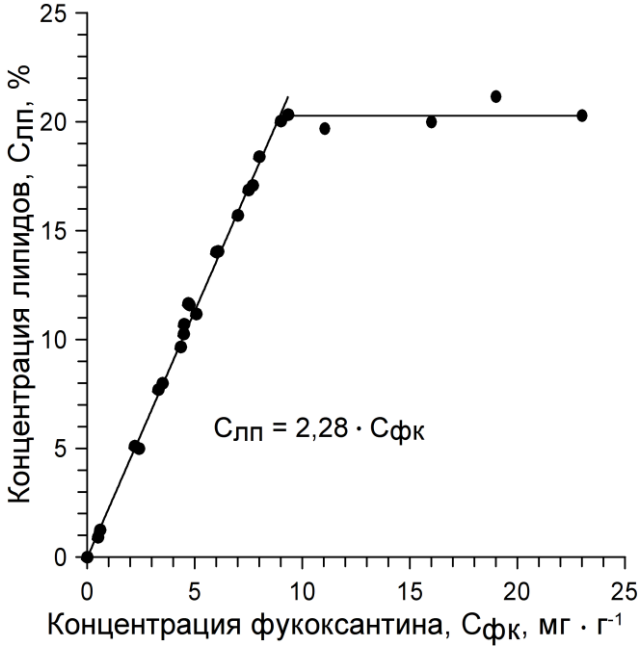

Рисунок 6 - Зависимость между концентрацией фукоксантина и суммарных липидов в биомассе *C. closterium*

Проточный режим культивирования. Для обеспечения оптимальных условий культивирования *C. closterium*, которые не изменяются во времени, применили проточное культивирование. Важным преимуществом проточного культивирования является возможность достижения оптимальных условий внешней среды для роста клеток и биосинтеза ценных веществ, что обеспечивает постоянство биохимического состава получаемой биомассы. В тех случаях, когда процессы роста и накопления БАВ разобщены, используется многоступенчатая система культивирования, в частности, двухступенчатый хемостат. В связи с этим, был определён биохимический состав *C. closterium* в проточной культуре при различных удельных скоростях протока: 0,1; 0,3; 0,5и 0,7 сут$^{-1}$. Биохимический состав водоросли в первой ступени хемостата при различных удельных скоростях протока представлен в табл. 7.

Таблица 7 - Биохимический состав *C. closterium* в первой ступени хемостата при различных скоростях протока

Удельная скорость протока, сут$^{-1}$	ФК, мг·г$^{-1}$	ПНЖК, %	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %	Зола, %
ω = 0,1	3±0,1	2,86	6,8±0,1	39±0,5	15±0,4	39,0
ω = 0,3	2,6±0,1	2,36	5,9±0,1	40±0,5	17±0,5	38,0
ω = 0,5	1,5±0,1	1,32	3,4±0,1	40±0,5	19±0,4	37,6
ω = 0,7	0,7±0,1	0,60	1,59±0,1	42±0,5	22±0,4	35,0
ω = 0,9	0,5±0,1	0,4	1,14±0,1	42±0,5	24±0,4	35,0

В условиях одноступенчатого хемостата при удельной скорости протока 0,1 сут$^{-1}$ биомасса *C. closterium* характеризуется высокой концентрацией Фк, липидов и ПНЖК. С повышением удельной скорости протока наблюдается повышение продуктивности культуры и снижение содержания БАВ на единицу биомассы. Данный факт можно объяснить тем, что с увеличением скоростей протока концентрация лимитирующего субстрата в питательной среде увеличивается, как следствие, увеличивается и продуктивность. Рассчитаем скорости синтеза Фк, липидов и ПНЖК при различных удельных скоростях протока в первой ступени хемостата (табл. 8). Расчёт скоростей синтеза БАВ проводили по формуле:

$$P_{фк} = \omega \cdot Fx \cdot B_i;\ P_{PUFA} = \omega \cdot C_{PUFA} \cdot B_i;\ P_{Lip} = \omega \cdot C_{Lip} \cdot B_i;$$

где $P_{фк}$, P_{PUFA}, P_{lip} – продуктивность Фк, ПНЖК и липидов, мг·л$^{-1}$·сут$^{-1}$; ω – удельная скорость протока, сут$^{-1}$; B_i – текущая плотность культуры при заданной удельной скорости протока, г·л$^{-1}$; Fx – концентрация Фк, мг·г$^{-1}$; C_{lip} - концентрация липидов, мг·г$^{-1}$; C_{PUFA} - концентрация ПНЖК, мг·г$^{-1}$. В первой ступени хемостата

максимальный выход ФК, липидов и ПНЖК наблюдается при удельной скорости протока, равной 0,3 $сут^{-1}$.

Таблица 8 - Скорость синтеза фукоксантина, липидов и ПНЖК *C. closterium* в первой ступени хемостата при различных скоростях протока

Удельная скорость протока, $сут^{-1}$	Максимальная продуктивность культуры	Выход Фк, $мг \cdot л^{-1} \cdot сут^{-1}$	Выход липидов, $мг \cdot л^{-1} \cdot сут^{-1}$	Выход ПНЖК, $мг \cdot л^{-1} \cdot сут^{-1}$
ω = 0,1	0,34	1,03	28,49	8,57
ω = 0,3	0,92	2,38	62,1	21,24
ω = 0,5	1,28	1,92	50,49	19,89
ω = 0,7	1,19	0,83	20,8	8,51
ω = 0,9	0,76	0,3	6,9	3,24

Сопоставляя накопительное культивирование и одноступенчатый хемостат, отметим, что в накопительной и проточной культуре средняя скорость биосинтеза БАВ практически одинаковая. В режиме накопительного культивирования и условиях одноступенчатого хемостата при удельной скорости протока 0,3 $сут^{-1}$ в течение 20-ти суток культивирования выход Фк составляет 51 и 49 $мг \cdot л^{-1}$. В таком случаем проточное культивирование в одноступенчатом хемостате для накопления ценных веществ никаких преимуществ не даёт. Однако существенным недостатком накопительного культивирования является необходимость в продолжительной стационарной фазе роста (в нашем случае 15 суток) для получения биомассы с высоким содержанием целевых продуктов. В стационарной фазе роста культура характеризуется нестабильностью: клетки агглютинируют, прикрепляются к стенкам фотобиореактора, велика вероятность перехода культуры в фазу отмирания.

Таким образом, для непрерывного производства целевых веществ из культуры *C. closterium*, а также для управления их синтезом в самой биомассе, целесообразно использовать проточную культуру. Рассмотрим двухступенчатый хемостат с равным объёмом каждой из ступеней и одинаковой удельной скоростью протока. В первой ступени, куда попадает свежая среда, наблюдается активный рост клеток, в то время как во второй ступени создаются стрессовые условия из-за лимитирования роста культуры биогенными элементами, что приводит к накоплению в биомассе Фк, липидов и ПНЖК во второй ступени.

В табл. 9 представлены средние концентрации БАВ в биомассе *C. closterium* в двухступенчатом хемостате. При возрастании скорости протока от 0,1 до 0,5 $сут^{-1}$ отмечено снижение концентраций Фк с 11 до 3 $мг \cdot г^{-1}$ и липидов с 18 до 3 %. При больших скоростях протока из первой ступени питательная среда попадает во вторую и скорость роста во второй ступени увеличивается. Поскольку с во второй

ступени хемостата концентрация БАВ снижается, для получения максимального выхода Фк использование скоростей выше 0,5 сут$^{-1}$ не имеет смысла. Таким образом, в двухступенчатом хемостате биомасса характеризуется максимальной калорийностью и содержанием БАВ при удельной скорости протока 0,1 сут$^{-1}$.

Таблица 9 - Биохимический состав *C. closterium* во второй ступени хемостата при различных скоростях протока

Удельная скорость протока, сут$^{-1}$	Фк, мг·г$^{-1}$	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %	Зола, %	ПНЖК, %
ω = 0,1	10,50±0,1	18,00±0,1	37,00±0,5	11,00±0,4	33,0	8,64
ω = 0,3	5,10±0,1	10,70±0,1	36,47±0,5	17,50±0,4	36,2	4,82
ω = 0,5	3,40±0,1	2,89±0,1	35,50±0,5	24,00±0,4	36,0	1,24
ω = 0,7	1,10±0,1	2,10±0,1	36,00±0,5	25,00±0,4	37,0	0,5
ω = 0,9	0,70±0,1	1,40±0,1	34,5±0,5	25,50±0,4	37,0	0,32

Данный факт можно объяснить тем, что при удельной скорости протока 0,1 сут$^{-1}$ во вторую ступень не попадают фосфор и кремний. Для определения удельной скорости протока, при которой будет наблюдаться максимальный выход ценных веществ в режиме двухступенчатого хемостата, рассчитаем скорости синтеза Фк, липидов и ПНЖК в сутки при различных скоростях протока (табл. 10). В двухступенчатом хемотате максимальные скорости биосинтеза ценных веществ наблюдаются при удельной скорости протока, равной 0,3 сут$^{-1}$.

Таблица 10 Скорость синтеза фукоксантина, липидов и ПНЖК в биомассе *C. closterium* в двухступенчатом хемостате при различных скоростях протока

Удельная скорость протока	Максимальная продуктивность, мг·г^{1}·сут$^{-1}$	Выход Фк в сутки, мг·л$^{-1}$·сут$^{-1}$	Выход липидов, мг·л$^{-1}$·сут$^{-1}$	Выход ПНЖК, мг·л$^{-1}$·сут$^{-1}$
ω = 0,1	0,42	4,4	75,42	36,2
ω = 0,3	1,05	6,1	105,3	45,2
ω = 0,5	1,48	5,0	42,92	17,2
ω = 0,7	1,3	1,44	27,62	11,0
ω = 0,9	0,63	0,38	8,82	3,53

В двухступенчатым хемостате проведены исследования с фиксированными удельными скоростями протока. Однако если стоит задача оптимизации продуктивности культуры и концентрации Фк в биомассе от удельной скорости протока, воспользуемся графическим методом (рис. 7). Отобразим на одном графике две зависимости: продуктивности культуры и концентрации Фк в биомассе от удельной скорости протока. Точка пересечения двух зависимостей указывает на оптимальную скорость протока, при которой наблюдается максимальный выход биомассы с максимальным содержанием Фк. Для двухступенчатого хемостата оптимальная удельная скорость протока равна 0,26 сут$^{-1}$, при которой зафиксирована максимальная продуктивность Фк (6,5 мг·л$^{-1}$·сут$^{-1}$), а, следовательно, липидов и ПНЖК, так как содержание Фк и липидов связаны линейно. Следовательно, если стоит задача получить высокий выход биомассы с высоким содержанием ФК, липидов и ПНЖК в двухступенчатом хемостате, тогда необходимо устанавливать удельную скорость протока, равную 0,26 сут$^{-1}$.

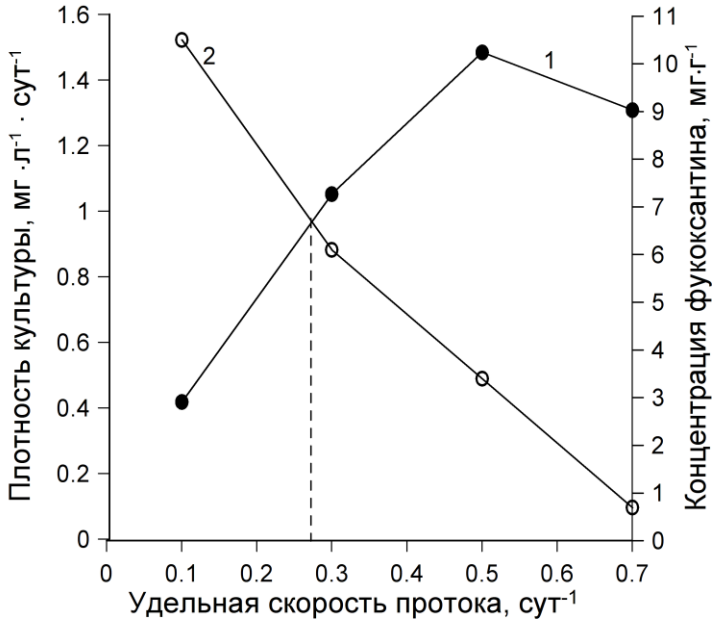

Рисунок 7 - Зависимость продуктивности (1) и концентрации фукоксантина (2) в биомассе *C. closterium* от удельной скорость протока. Пунктир – оптимальная скорость протока для двухступенчатого хемостата

Сопоставляя максимальный выход Фк, липидов и ПНЖК при накопительном режиме культивирования и при режиме одноступенчатого и двухступенчатого хемостата, отметим, что при двухступенчатом хемостате показатели максимальной продуктивности БАВ превышают в 2,4 раза аналогичные показатели при накопительном культивировании и при режиме одноступенчатого хемостата.

Глава 5 Разработка технологий получения целевых продуктов из диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*. Приведены технологические регламенты хранения микроводоросли, чтобы биомасса не потеряла полезные свойства БАВ. Установлено, что сырая биомасса при комнатной температуре на свету не подлежит хранению, т.к. в течение суток в ней происходят процессы разложения органических веществ. Поэтому с целью сохранения биологически

активных веществ биомассу необходимо обезвоживать. В сухой биомассе фукоксантин при температуре 24 °С разрушается со скоростью 0,047 мг·сут$^{-1}$, а при 5 °С – 0,018 мг·сут$^{-1}$.

В результате использования новой питательной среды RS разработаны технологические условия выращивания *C. closterium* с высоким содержанием фукоксантина (до 19 мг на 1 г сухой массы). Биомасса водоросли, полученная данным способом, содержит не только Фк, но и имеет высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот. Концентрация ПНЖК в биомассе в конце стационарной фазы роста достигает 52 % общих липидов или в пересчете на сухую биомассу 4 % (Патент 2655221 RU).

Установлено, что экстракция фукоксантина спиртом не влечёт за собой его разрушения и Фк достаточно хорошо сохраняется в водно-спиртовом растворе длительное время. В спиртовой вытяжке помимо Фк присутствуют полиненасыщенные жирные кислоты, хлорофилл *a*, хлорофилл *c*, диадиноксантин и каротин. Из-за ограничений в приеме настоек, содержащих этанол, разработан и запатентован новый биологически активный продукт без спирта – растительное масло, насыщенное фукоксантином (Патент 2629276 RU). Полученный продукт характеризуется хорошими органолептическими показателями – приятным вкусом и ароматом, коричневым цветом с красноватым оттенком, высоким содержанием Фк. Поскольку Фк имеет хорошие перспективы применения в медицине для создания функциональных лечебно-профилактических продуктов (Патент 2582182 RU), разработана полупромышленная технология получения Фк в кристаллической форме из биомассы культивируемой микроводоросли.

Заключение. В диссертационной работе определены оптимальные условия роста *C. closterium* в накопительной и проточной культуре: диапазон температур, освещённости и pH среды. Существенным недостатком накопительного культивирования является необходимость в продолжительной стационарной фазе роста для получения биомассы с высоким содержанием целевого продукта. В качестве альтернативы накопительному культивированию предложено использовать проточное культивирование. В проточном двухступенчатом режиме показатели максимальной продуктивности липидов, Фк и ПНЖК превышают в 2,4 раза аналогичные показатели при накопительном культивировании. В проточном режиме двухступенчатого хемостата зафиксированы максимальные скорости биосинтеза Фк, липидов и ПНЖК. На основе использования биомассы диатомовой водоросли *C. closterium* разработаны технологии получения продуктов с высоким содержанием ценных веществ для дальнейшего создания функциональных лечебно-профилактических продуктов. *C. closterium* является перспективной водорослью для использования в биотехнологии и удобным объектом для дальнейшего исследования в проточном режиме культивирования. Такой режим культивирования позволяет более гибко управлять биосинтезом ценных веществ в биомассе *C. closterium* посредством смены лимитирующих факторов, которые способствую увеличению скоростей биосинтеза Фк и ПНЖК.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая питательная среда RS для получения интенсивной плотной культуры диатомовой водоросли *C. closterium* на основе установленных потребностей в основных биогенных элементах.
2. Оптимальными условиями для культивирования *C. closterium* являются: питательная среда RS, температура – 16-20 °С, поверхностная облученность – 170-235 мкЕ·м$^{-2}$·с$^{-1}$, pH – 8,4-9,4.
3. Максимальная продуктивность *C. closterium* в одно- и двухступенчатом хемостате отмечена при скорости протока 0,59 сут$^{-1}$ и составляет 1,34 г·л$^{-1}$·сут$^{-1}$ и 1,49 г·л$^{-1}$·сут$^{-1}$, соответственно. Максимальные скорости биосинтеза фукоксантина, липидов и ПНЖК в двухступенчатом хемостате зафиксированы при удельной скорости протока 0,3 сут$^{-1}$.
4. Обнаружена линейная зависимость между концентрациями общих липидов и фукоксантина (в диапазоне от 0 до 10 мг·г$^{-1}$) в биомассе *C. closterium* при различных условиях проточного и накопительного культивирования.
5. Производительность проточной системы культивирования *C. closterium* в 2,2 раза выше накопительной. Скорость биосинтеза фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот в двухступенчатом хемостате превышает в 2,4 раза аналогичные показатели при накопительном культивировании. При различных режимах культивирования выявлено преобладание ω3 полиненасыщенных жирных кислот в биомассе *C. closterium*. Соотношение ω-6/ω-3 варьирует от 0,57 до 0,89.
6. Разработаны и запатентованы новые технологии получения целевых продуктов лечебно-профилактического назначения из биомассы и БАВ *C. closterium*: биомасса с высоким содержанием фукоксантина и ПНЖК как биологически ценный продукт; спиртовой экстракт БАВ; оливковое масло, обогащённое фукоксантином; кристаллический фукоксантин.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Геворгиз Р.Г., **Железнова С.Н.** Эффективность фиксации углерода в биомассе *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J. C. Lewin (Bacillariophyceae) в условиях накопительного культивирования // Морской биол. журнал. 2020. Т. 5, № 1. С. 12-19. doi: 10.21072/mbj.2020.05.1.02 (**Scopus**).
2. **Железнова С.Н.** Продукционные характеристики морской диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin в интенсивной культуре при различных источниках азота в питательной среде // Морской биол. журнал. 2019. Т. 4, № 1. С. 33-44. doi: 10.21072/mbj.2019.04.1.04 (**Scopus**)

3. Ryabushko L.I., Balycheva D.S., Bondarenko A.V., **Zheleznova S.N.**, Begun A.A., Stonik I.V. Different aspects of studying a diatom *Cylindrotheca closterium* (Reimann) et Lewin 1964 in natural and laboratory conditions // Морской биол. журнал. 2019. Т. 4, № 2. С. 52-62. doi: 10.21072/mbj.2019.04.2.06 (**Scopus**)
4. Ryabushko V.I., **Zheleznova S.N.**, Nekhoroshev M.V. Effect of Nitrogen on Fucoxanthin Accumulation in the Diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin // Intern. Journal on Algae. 2017. Vol. 19, № 1. P. 79-84. doi: 10.1615/InterJAlgae.v19. i1.70 (**Scopus**)
5. Ryabushko V.I., **Zheleznova S.N.,** Gevorgiz R.G., Bobko N.I., Lelekov A.S. The Medium for Intensive Culture of the Diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (BACILLARIOPHYTA) // Intern. Journal on Algae. 2016. Vol. 18, № 3. P. 279-286. DOI: 10.1615/InterJAlgae.v18. i3.70 (**Scopus**)
6. Патент 2655221 RU. МПК A01G 33/00 Способ получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* с повышенным содержанием фукоксантина / Рябушко В.И., Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В., **Железнова С.Н.**; заявл. 25.08.16; опубл. 24.05.2018. Бюл. № 15.
7. Патент 2629276 RU. МПК A23D 9/00. Способ обогащения растительного масла фукоксантином / Нехорошев М.В., Геворгиз Р.Г., Рябушко В.И., **Железнова С.Н.**; заявл. 14.04.2016; опубл. 28.08.2017. Бюл. No 25.
8. Патент 2582182 RU. МПК C12N 1/12, A01G 33/00, C12R 1/89. Способ получения биомассы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* / **Железнова С.Н.**, Геворгиз Р.Г., Рябушко В.И.; заявл. 25.09.2014; опубл. 20.04.2016. Бюл. №11.

Публикации в других рецензируемых изданиях

9. Ревина А.А., Геворгиз Р.Г., Лозинина С.С., **Железнова С.Н.**, Тхан Тайк, Павлов Ю.С., Нехорошев М.В., Рябушко В.И. Оптические свойства и радиационная стабильность экстрактов морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 2. С. 173–182. (**WoS**)
10. Геворгиз Р.Г., **Железнова С.Н.**, Нехорошев М.В., Бобко Н.И., Зозуля Ю.В., Уваров И. П. Промышленная технология получения фукоксантина — морского противоопухолевого каротиноида // Российский биотерапевтический журнал. 2017. Т. 16. №S. С. 22.
11. Нехорошев М.В., Рябушко В.И., **Железнова С.Н.,** Геворгиз Р.Г. Культивируемые водоросли – коммерческий источник антиоксидантов // Российский биотерапевтический журн. 2016. Т. 15, №1. С. 74.
12. **Железнова** С.Н., Геворгиз Р.Г. Интенсивная культура диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin // Вопросы современной альгологии. 2014. № 1 (5).
13. Геворгиз Р.Г., **Железнова С.Н.**, Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Репков А.П., Лелеков А.С. Промышленная технология производства биомассы морской диатомеи

Cylindrotheca closterium (Ehrenberg) Reimann & Lewin с использованием газовихревого фотобиореактора // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2016. Т. 2, № 1-1. С. 73-77.

14. **Железнова С.Н.**, Геворгиз Р.Г. Интенсивная культура диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin // Вопросы современной альгологии. 2014. № 1 (5).
15. **Железнова С.Н.**, Геворгиз Р.Г., Малахов А.С. Взаимосвязь концентраций фукоксантина и общих липидов в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Lewin // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2019. С. 472-475.
16. **Железнова С.Н.**, Геворгиз Р.Г. Измерение плотности диатомовых микроводорослей различными методами // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2020. Т. 5, № 1. С. 201-207.