

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 581.6:[577.115+633.529.3]

Новые штаммы рода *Vischeria* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta): состав жирных кислот и их возможное использование в качестве биодобавок для животных и человека

Е.С. Кривина¹ , М.А. Синетова² , В.В. Редькина¹ , А.В. Соромотин³ ,
Н.В. Жеребятнева³ , А.Д. Темралеева¹

¹Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина, Российская академия наук, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук», Россия, 142290, г. Пущино, проспект Науки, д. 5;

²Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Российская академия наук, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35, стр. 2;

³Тюменский государственный университет, Россия, 625003, г. Тюмень, ул. Володарского, д. 6
*e-mail: pepelisa@yandex.ru

В последние годы в условиях нарастающего дефицита ресурсов отмечается устойчивая тенденция к поиску новых биотехнологически ценных штаммов водорослей. В данной работе представлены результаты исследования таксономического положения и ростовых характеристик, а также анализа профиля жирных кислот двух штаммов, VKM AI-463 и VKM AI-480, эустигматофитовых микроводорослей рода *Vischeria*, изолированных из Надымского района Ямало-Ненецкого автономного округа (Россия), с целью выяснения их биотехнологического потенциала. По результатам морфологического и филогенетического анализа с использованием внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 (internal transcribed spacer 2) штаммы были идентифицированы как *Vischeria* sp. В работе были подробно изучены скорости роста исследуемых штаммов, проведена оценка продуктивности, определено содержание суммарных липидов и исследован жирнокислотный состав. Показано, что оба штамма являются активными продуцентами пальмитиновой, эйкозапентаеновой и пальмитолеиновой кислот. Примечательно, что по содержанию пальмитолеиновой кислоты оба исследуемых штамма превосходят ее традиционные источники. У штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 конечная концентрация пальмитиновой кислоты составила $419,6 \pm 18,1$ мг/л и $501,3 \pm 57,0$ мг/л, пальмитолеиновой кислоты — $896,5 \pm 22,5$ мг/л и $1312,5 \pm 109,0$ мг/л, эйкозапентаеновой кислоты — $109,0 \pm 7,5$ мг/л и $113,7 \pm 8,8$ мг/л соответственно. В ходе сравнительного анализа установлено, что хотя оба штамма обладают несомненной биотехнологической ценностью, но именно штамм VKM AI-480 наиболее эффективно накапливает биомассу, обогащенную данными кислотами. Это делает его привлекательным в качестве альтернативного источника сырья для производства пищевых и кормовых добавок, косметических средств и биодизельного топлива.

Ключевые слова: микроводоросли, ITS2, биопроспектинг, биотехнологический потенциал, эйкозапентаеновая кислота, пальмитолеиновая кислота

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-3

Введение

В последние годы отмечается устойчивый рост интереса к поиску новых биотехнологических разработок и природоподобных технологий, а также их внедрению на промышленных предприятиях с целью обеспечения перехода к экологически чистому производству и преодолению неизбежного и усугубляющегося дефицита природных ресурсов. Биотехнологическая ценность микроводорослей обусловлена широким спектром

синтезируемых ими ценных соединений (пигментов, белков, фенолов, жирных кислот, витаминов и др.), быстротой роста, способностью увеличивать синтез целевых метаболитов при изменении условий культивирования. Использование этих фотосинтезирующих микроорганизмов как альтернативы традиционным источникам растительного сырья может способствовать наращиванию объемов производства кормовых добавок, нутрицевтиков, фармацевтических препаратов и других

биопродуктов без увеличения посевных площадей и позволит осуществлять подобную деятельность в регионах, климатические условия в которых неблагоприятны для ведения традиционного сельского хозяйства [1, 2]. Однако важным фактором, сдерживающим промышленное производство различной продукции из биомассы микроводорослей, является более высокая себестоимость производства по сравнению с традиционным растительным сырьем. Одним из способов решения данной проблемы является поиск новых штаммов с высоким биотехнологическим потенциалом, которые характеризуются увеличенным содержанием целевых метаболитов и более быстрыми темпами накопления биомассы [2, 3].

Способность микроводорослей продуцировать и запасать жирные кислоты (ЖК) может быть весьма востребована для удовлетворения растущего спроса на продукты питания, кормовые и пищевые добавки, сырье для производства биотоплива третьего поколения и т.д. Во многом биотехнологический потенциал таких штаммов определяется составом ЖК, поскольку их свойства различаются. Представители рода *Vischeria* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta) все чаще становятся объектом биотехнологических исследований, поскольку некоторые из них способны продуцировать значительное количество эйкозапентаеновой (ЭПК) и пальмитолеиновой (ПОК) кислот [3–5]. ЭПК входит в состав липидов большинства тканей людей и животных и, хотя эта ЖК может синтезироваться из линолевой и линоленовых ЖК, скорость этого превращения очень низкая, поэтому ЭПК должна поступать в организм вместе с пищей [6]. Традиционным источником ЭПК являются рыбий и крилевый жир, а также морепродукты. ЭПК снижает синтез триглицеридов и холестерина в организме животных и человека, уменьшает риск возникновения тромбов, оказывает противовоспалительное действие и дает положительный эффект при лечении воспалительных заболеваний кишечника, артритов, сердечно-сосудистых заболеваний и некоторых типов рака [6, 7]. Также дополнительное введение ЭПК в рацион животных оказывает влияние на состав жирных кислот молока и молочного жира, способствует увеличению доли ЖК, полезных для здоровья молодняка и человека. В последнее время значительное внимание в исследованиях уделяется кормовым добавкам, полученным из микроводорослей, для различных видов жвачных животных [8]. Было показано, что у коров присутствующая в значительном количестве во всех микроводорослях пальмитиновая кислота (ПК) повышает усвояемость корма, удои, концентрацию и выход молочного жира, а также эффективность производства молока по сравнению с контрольным рационом [9]. ЭПК вместе с линолевой кислотой может повысить эффективность репродук-

тивного управления и фертильности у молочных коров [10]. Что касается эустигматофитовых водорослей, то уже успешно использовалось добавление *Nannochloropsis oculata* в рацион нубийских коз, что улучшило молочную продуктивность и питательную ценность молока [11]. Учитывая тенденции к росту спроса на полиненасыщенные ЖК (ПНЖК) и ограниченность рыбных запасов в природных экосистемах, встает вопрос о создании стабильного промышленного метода производства продуктов с высоким содержанием омега-3 и омега-6 ПНЖК в целом и ЭПК в частности [1, 2].

ПОК, обладающая рядом уникальных свойств полезных для здоровья животных и человека, в последние годы привлекает значительное внимание исследователей. ПОК может действовать в организме животных и человека подобно гормону. При нормальном поступлении в ткани способствует снижению уровня белка, что вызывает уменьшение интенсивности воспалительных проявлений и помогает внутренним системам противостоять болезням более эффективно. Многочисленные исследования показали, что ПОК уменьшает содержание свободного холестерина, повышает чувствительность к инсулину в печени и скелетных мышцах, увеличивает текучесть клеточных мембран, подавляет онкогенез, снижает воспаление, связанное с диабетом, болезнями сердца и другими проблемами со здоровьем [12, 13]. В силу этого ПОК имеет большое значение для производства функциональных продуктов питания, косметики, товаров для здоровья и фармацевтических препаратов, а также кормовых добавок в животноводстве. В небольших количествах ПОК содержится в различных растительных маслах, животных жирах и в «морском масле» [14, 15]. Значительное количество ПОК содержит масло облепихи [16] и орехов макадамии [17], однако эти растения имеют низкую урожайность и их трудно выращивать в больших масштабах, что делает полученное из них масло очень дорогим. Учитывая ее разнообразное применение и предполагаемый спрос на рынке, поиск надежного и эффективного альтернативного продуцента ПОК приобретает особое значение.

В то же время ряд исследователей утверждает, что польза от применения полиненасыщенных жирных кислот сильно преувеличена. Так, в одном из обзоров [18] отмечается, что употребление омега-3-ПНЖК не влияет на риск сердечно-сосудистых заболеваний и смертность, а исследования влияния ПНЖК ставят под сомнение их позитивное влияние на сохранение и восстановление когнитивных функций пожилых пациентов [19, 20]. Кроме того, чрезмерное увеличение доли некоторых ПНЖК в рационе также может оказывать негативное влияние на здоровье человека и животных. Например, чрезмерное потребление омега-6-ПНЖК способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний, психиатрических откло-

нений, иммунодефицита и может стимулировать развитие раковых опухолей [21, 22]. Поэтому при разработке новых препаратов крайне важно соблюдать все этапы тестирования, перед употреблением нельзя пренебрегать консультацией специалистов и крайне важно соблюдать рекомендованные дозировки.

Данная статья посвящена определению таксономического положения, изучению ростовых характеристик и анализу профиля ЖК двух штаммов эустигматофитовых микроводорослей рода *Vischeria* (Heterokontophyta), изолированных из Надымского района Ямало-Ненецкого автономного округа (Россия), с целью выяснения их биотехнологического потенциала.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами исследования стали два штамма микроводорослей, VKM AI-463 (=11L-4) и VKM AI-480 (=5-5), которые были выделены из накопительных культур с поверхности таллома лишайника и из почвенной пробы, отобранных в Надымском районе Ямало-Ненецкого автономного округа соответственно.

Характеристика района исследования и отбор образцов. Район исследования расположен в пределах северной тайги Западной Сибири с преобладанием хвойных видов древесных растений и расположен на второй надпойменной террасе в нижнем течении реки Надым. Территория представляет собой эоловый песчаный ландшафт площадью около 3 км² (N65,356081° E72,965710°). Полевые работы, включавшие отбор проб почвы и талломов лишайников, были проведены в августе 2022 г. в пределах молодого леса. Пробы почвы (Albic Podzols) отбирали с поверхности в объеме 5×5×5 см, талломы лишайника отбирали целиком. Все образцы помещали в стерильные пластиковые контейнеры для дальнейшей транспортировки в лабораторию.

Изоляция и культивирование штаммов микроводорослей. Штамм VKM AI-463 был изолирован из накопительной культуры, для получения которой отделяли часть лишайника из 5 точек исходного образца с помощью стерильного пинцета и помещали в питательную среду 3N BBM в стерильном стеклянном бюксе. Накопительная культура, из которой был выделен штамм VKM AI-480, была получена путем добавления 5 г изучаемой почвы к 20 мл среды 3N BBM+Vit в стерильный стеклянный бюкс. Затем содержимое было тщательно перемешано. Бюксы были помещены в осветительную установку. На 7-е сут из каждого бюкса отобрали по 30 мкл накопительной культуры и перенесли на чашку Петри со средой 3N BBM+Vit. Суспензия была распределена по поверхности агара стерильным шпателем Дригальского. Монокультуры были получены путем посева штрихом с последующей изоляцией

отдельных колоний с помощью пипетки. Полученные штаммы культивировали в климатостате в стандартных условиях (температура +23–25°C, свет 60–75 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹, фотопериод 12 ч). Все изученные штаммы были депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Световая микроскопия, выделение тотальной ДНК, амплификация, очистка и секвенирование ампликонов проводились по ранее описанным протоколам [23]. Условия и праймеры для амплификации популярного ДНК-баркода – ITS2 – использовались из работы [24].

Молекулярно-филогенетический анализ проводили по стандартным алгоритмам, описанным ранее [23]. Для сравнения топологий деревьев использовали данные соответствующих статей [5, 25, 26].

Условия культивирования для характеристики биотехнологического потенциала. Перед началом эксперимента штаммы подращивали 14 сут в колбах со 100 мл среды 3N BBM при температуре 27°C (по данным предварительного тестирования эта температура является оптимальной) и постоянном освещении с интенсивностью 30 мкмоль м⁻² с⁻¹. Интенсивное культивирование проводили в лабораторной установке, в сосудах с 250 мл 3N BBM при температуре 27±1°C и двустороннем освещении с интенсивностью 150 мкмоль м⁻² с⁻¹ с каждой стороны. Аэрацию проводили стерильным воздухом с 1,5–2% CO₂. Для адаптации каждый штамм предварительно выращивали до экспоненциальной фазы в указанных условиях, затем разбавляли свежей средой до ОП₇₅₀=0,02 и распределяли по трем сосудам, в которых проводился эксперимент. Пробы для определения сухой массы, содержания суммарных липидов (СЛ) и определения ЖК СЛ отбирали в конце экспоненциальной фазы (на 3-и сут) и при переходе к стационарной фазе (на 10-е сут).

Измерение скорости роста и оценка продуктивности. Рост культуры ежедневно оценивали по изменению оптической плотности культуры, измеренной при 750 нм и по приросту биомассы, как описано ранее [4].

Определение содержания СК и жирнокислотного состава. Для определения жирнокислотного состава суммарных липидов предварительно зафиксированную биомассу омыляли 1М КОН в 80%-ном этаноле, отмывали неомыляемые компоненты от свободных ЖК н-гексаном. Свободные ЖК получали добавлением 20%-ной серной кислоты, экстрагировали н-гексаном и метилировали. Метилловые эфиры ЖК анализировали на приборе

Хроматэк Кристалл 5000.2 NP с квадрупольным МС детектором и колонкой Restek Rtx-2330 (60 м, кат. № 10726, Роклин, США). СЛ оценивали по количеству этерифицированных ЖК на 1 г сухой массы клеток. Внутренний стандарт — добавленная маргаиновая кислота.

Статистическая обработка данных. Оценка топологии для деревьев ML основывалась на 1 тыс. реплик теста SH-aLRT. Эффективность результатов, полученных методом Байеса, была оценена с помощью программы Трасег версии 1.7. Более подробно методы оценки изложены в работе [23]. Средние значения результатов измерений

содержания ЖК в трех биологических повторностях и стандартные отклонения рассчитаны с использованием программы Excel (Microsoft Office ver. 2010).

Результаты и обсуждение

Морфология штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 была схожа (рис. 1А–Г). Клетки одиночные, преимущественно шаровидные, однако у штамма VKM AI-463 иногда в культуре встречались широкоовальные клетки. В среднем размер вегетативных клеток у исследуемых штаммов был близок: штамм VKM AI-463 — 5,7–10 мкм в диаметре, штамм VKM

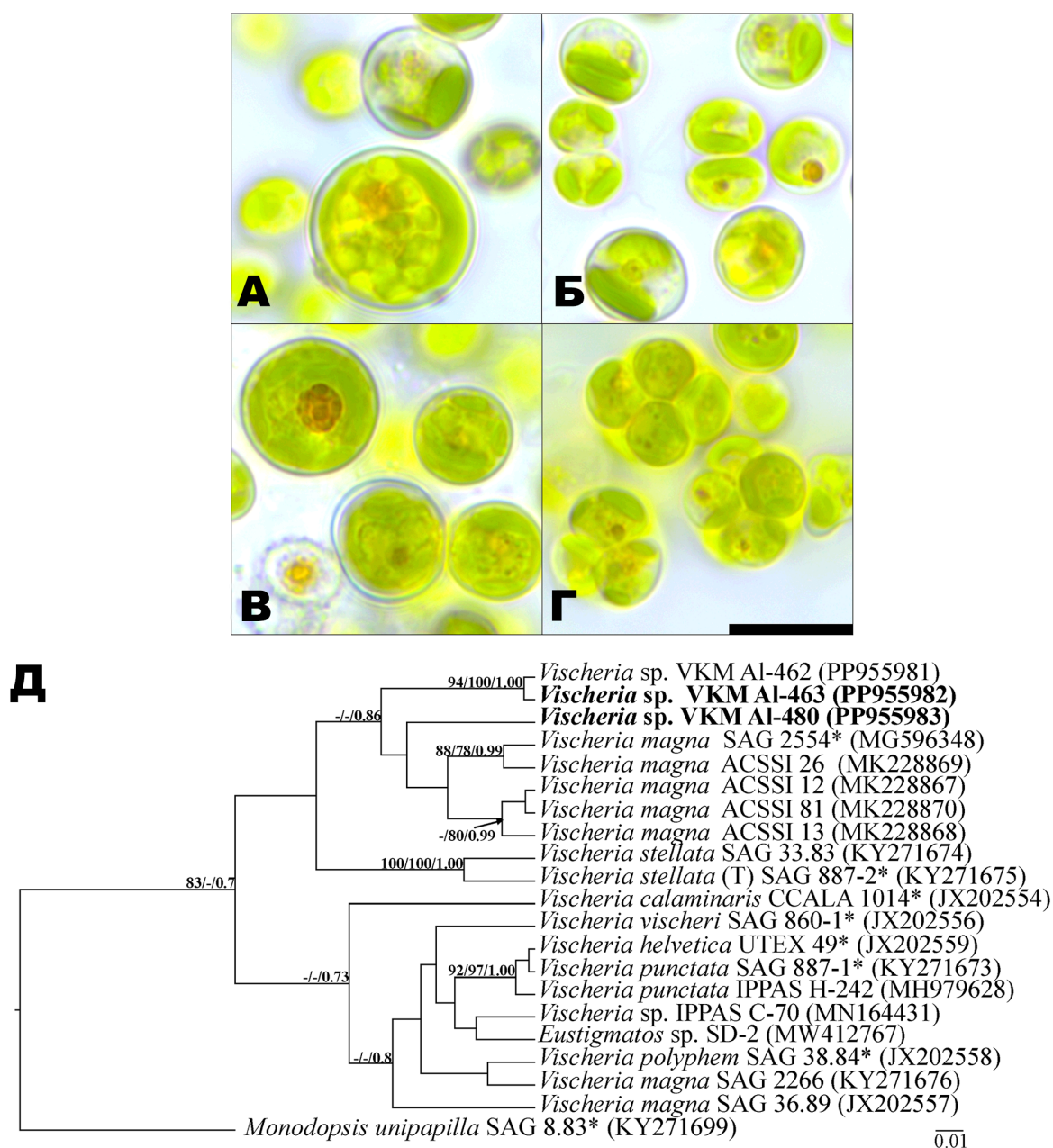


Рис. 1. Штамм *Vischeria* sp. VKM AI-463: А — зрелые вегетативные клетки, Б — автоспорангии; *Vischeria* sp. VKM AI-480: В — зрелые вегетативные клетки, Г — автоспорангии. Шкала 10 мкм. Д — укорененное Байесовское филогенетическое дерево эустигматофитовых микроводорослей рода *Vischeria*, построенное на основе последовательностей ITS2 (длина выравнивания — 310 н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT/BP/PP. Значения SH-aLRT и BP менее 70% и PP менее 0,7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: TIM2e+G4. Обозначения: * — аутентичный штамм; (Т) — типовой вид.

Al-480 – 6,8–12,1 мкм. При этом в культуре VKM Al-463 единично встречались клетки до 17 мкм в диаметре. Клеточная оболочка гладкая. Хлоропласт пристенный, чашевидный или корытовидный, со временем лопающийся, с одним полиэдрическим пиреноидом и красной глобулой. В клетках часто имеется от одной до нескольких вакуолей, окруженных гранулами. Размножение осуществлялось с помощью автоспор: 2–4 у VKM Al-463 и до 8 у VKM Al-480. Оболочки автоспорангиев также довольно прочные и могут сохраняться некоторое время в культуре. Половой процесс и зооспоры не наблюдали. По итогам морфологического анализа оба исследуемых штамма были идентифицированы как *Vischeria* sp.

Филогенетический анализ с использованием ITS2 подтвердил, что исследуемые штаммы VKM Al-463 и VKM Al-480 принадлежат к роду *Vischeria* (рис. 1Д). Штаммы VKM Al-463 и VKM Al-462 объединились в хорошо поддерживаемую группу, а VKM Al-480 представлял отдельную филогенетическую линию. Перечисленные штаммы являлись сестринскими к кластеру *V. magna*. Однако кластеризация внутри рода характеризовалась преимущественно низкими статистическими поддержками, и в целом использование ITS2 не позволило разрешить топологию рода *Vischeria* и однозначно установить таксономический статус исследуемых штаммов. В свою очередь, морфологические характеристики штаммов VKM Al-463 и VKM Al-480 близки к таковым у представителей *V. magna*. Однако анализ генетических дистанций ставит принадлежность исследуемых штаммов к *V. magna* под сомнение. Так, генетические различия между штаммом VKM Al-463 и аутентичным штаммом *V. magna* SAG 2554 – 2,6%, между штаммами VKM Al-480 и VKM Al-463 – 4,8%, между VKM Al-480 и *V. magna* SAG 2554 – 3,9%. На примере штаммов *V. stellata*, кластеризующихся с аутентичным штаммом *V. stellata* SAG 887-2, и штаммов *V. magna*, группирующихся с аутентичным штаммом *V. magna* SAG 2554, можно предположить, что вну-

тривидовые генетические дистанции составляют 0–2,1%. При этом межвидовые дистанции варьируют от 0% (*V. helvetica* и *V. punctata*) до 9,6% (*V. stellata* и *V. vischeri*). Таким образом, уровень генетических различий между VKM Al-463, VKM Al-480 и аутентичным штаммом *V. magna* нельзя однозначно интерпретировать как внутри- или межвидовой. В целом данный вопрос нуждается в дополнительном исследовании, т.к. в статье Кривенда с соавт. [26] была показана внутривидовая вариабельность ITS2. Анализ вторичных структур ITS2 не внес дополнительной ясности, поскольку компенсаторные замены между исследуемыми штаммами и аутентичным штаммом *V. magna* отсутствовали. Проблема неинформативности традиционных филогенетических маркеров – гена 18S рРНК и ITS2 для видовой идентификации внутри рода *Vischeria* отмечалась также в ряде исследований [25, 26]. Поэтому для установления точного видового статуса в дальнейшем планируется провести дополнительное исследование пластидного гена *rbcL*. На данном этапе штаммы VKM Al-463 и VKM Al-480 идентифицированы как *Vischeria* sp.

Рост штаммов VKM Al-463 и VKM Al-480 описывался классической сигмоидной кривой (рис. 2). Лаг-фаза ни у одного из штаммов не наблюдалась (скорость роста была максимальной уже в 1-е сут), т.к. они были предварительно адаптированы к условиям интенсивного культивирования. Максимальная удельная скорость роста ($\mu_{\max}$) штамма VKM Al-480 равнялась $1,258 \pm 0,09$ /сут, что соответствует $T_{\text{удв}}$ $13,3 \pm 1,0$ ч. У штамма VKM Al-463 $\mu_{\max}$ составляла $1,00 \pm 0,06$ /сут, что соответствует $T_{\text{удв}}$ $16,7 \pm 1,0$ ч. Продуктивность в линейной фазе роста у штаммов VKM Al-480 и VKM Al-463 была 1,1 г/л·сут и 0,74 г/л·сут соответственно. Конечная концентрация биомассы на 10-е сут культивирования у штаммов VKM Al-480 и VKM Al-463 достигла $8,1 \pm 0,8$ г/л и $5,4 \pm 0,2$ г/л соответственно. По накоплению биомассы штамм VKM Al-480 ($8,1 \pm 0,8$ г/л на 10-е сут) сходен с другими уже исследованными

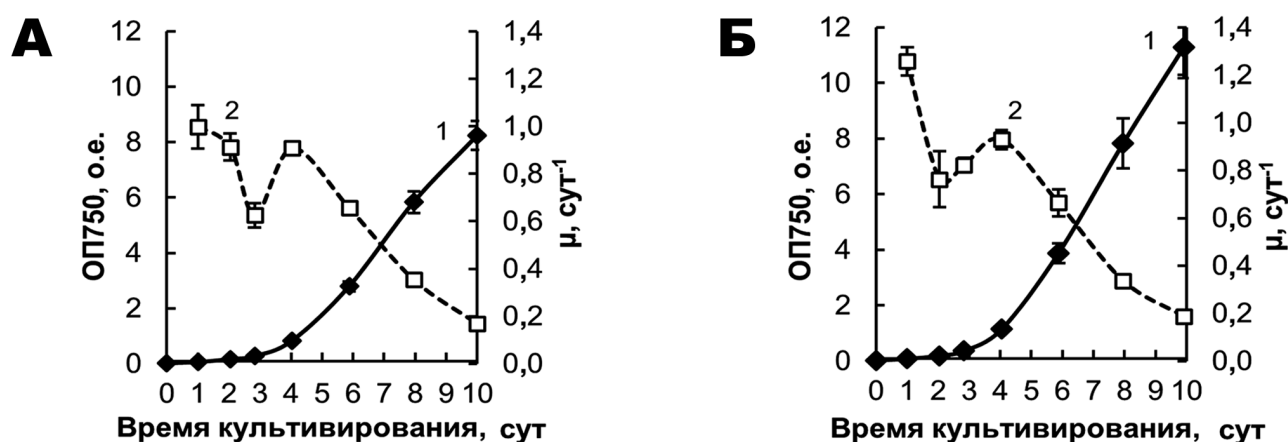


Рис. 2. Кривые роста и удельные скорости роста исследованных штаммов VKM Al-463 (А) и VKM Al-480 (Б). 1 – кривая роста, 2 – удельная скорость роста, μ .

штаммами рода *Vischeria*, выращенными при том же содержании азота в течение аналогичного периода времени (6–8,27 г/л) [4, 5, 27–29].

Профили ЖК исследуемых штаммов представлены в таблице. Основными ЖК у обоих исследуемых штаммов были ПК, ПОК, олеиновая и линолевая кислоты, а также ЭПК. Содержание ЖК СЛ у штамма VKM AI-463 в экспоненциальной фазе составляло $25,1 \pm 1,4\%$ от сухого веса, в стационарной фазе – $31,8 \pm 2,4\%$. У штамма VKM AI-480 содержание ЖК СЛ было несколько ниже как в экспоненциальной ($15,4 \pm 1,9\%$), так и в стационарной ($30,4 \pm 1,2\%$) фазах. По содержанию липидов при переходе в стационарную фазу (30,4% и 31,8% от сухой массы) изучаемые штаммы также сходны с другими представителями рода *Vischeria*, имеющими биотехнологический потенциал и выращенными при том же содержании азота (СЛ 34,1–42%) [27, 29].

Оба штамма являются активными продуцентами ПК, ПОК и ЭПК. При переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста доля ПОК в составе ЖК у обоих штаммов возрастала от 41,1% до 52,5–53,3%, а доли ПК и ЭПК, наоборот, снижались от 29,1–32,8% до 20,3–24,6% и от 10,8–12,1% до 4,6–6,4% соответственно. У штамма VKM AI-480 в стационарной фазе так-

же увеличивалось относительное содержание олеиновой кислоты от 5,5 до 14,2%. Однако в пересчете на сухую массу содержание ПК и ЭПК оставалось постоянным у обоих штаммов, а содержание ПОК возрастало. Максимальная концентрация этих ЖК в расчете на 1 л суспензии была достигнута в конце культивирования. У штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 конечная концентрация ПК составила $419,6 \pm 18,1$ мг/л и $501,3 \pm 57,0$ мг/л соответственно, а конечная концентрация ПОК – $896,5 \pm 22,5$ мг/л и $1312,5 \pm 109,0$ мг/л соответственно. По содержанию ПОК в суммарных ЖК и по концентрации ПОК в культуре штамм VKM AI-480 сравним с наиболее продуктивными штаммами, выращенными при том же содержании азота: >45–54,1% и 1326–1671 мг/л [28, 30, 31]. Оба изученных штамма превосходили по содержанию ПОК в биомассе такие традиционные источники ПОК, как ягоды облепихи (в среднем 4,3% от сухой массы ягод) и норковый жир (15%) [15, 16], и были сравнимы с орехами макадамии (10,4%–24,8% от сухой массы) [32]. Конечная концентрация ЭПК у штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 составила $109,0 \pm 7,5$ мг/л и $113,7 \pm 8,8$ мг/л соответственно. В то же время по максимальному содержанию ЭПК в суммарных ЖК в экспоненциальной фазе

Таблица

Содержание ЖК в штаммах VKM AI-463 и VKM AI-480

ЖК (% от суммы ЖК)	Штамм VKM AI-463		Штамм VKM AI-480	
	экспоненциальная фаза	стационарная фаза	экспоненциальная фаза	стационарная фаза
14:0	$2,4 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,1$
16:0	$32,8 \pm 0,6$	$24,6 \pm 0,4$	$29,1 \pm 2,1$	$20,3 \pm 0,4$
16:1 ^{Δ7}	$1,8 \pm 0,2$	н/о	н/о	н/о
16:1 ^{Δ9}	$41,1 \pm 1,2$	$52,5 \pm 0,6$	$41,1 \pm 0,7$	$53,3 \pm 0,8$
16:1 ^{Δ11}	$0,4 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,1$	н/о	н/о
18:0	$1,1 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,0$
18:1 ^{Δ9}	$3,9 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,9$	$14,2 \pm 0,5$
18:1 ^{Δ11}	<0,1	$0,4 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,0$
18:2 ^{Δ9,12}	$2,3 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$
18:3 ^{Δ9,12,15}	$0,6 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$
20:3 ^{Δ8,11,14}	$0,3 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$
20:4 ^{Δ5,8,11,14}	$1,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,0$
20:5 ^{Δ5,8,11,14,17}	$10,8 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,3$	$12,1 \pm 1,0$	$4,6 \pm 0,1$
Содержание ЖК СЛ, % от с.м.	$25,1 \pm 1,4$	$31,8 \pm 2,4$	$15,4 \pm 1,9$	$30,4 \pm 1,2$
Содержание ПК, % от с.м.	$8,2 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,3$
Концентрация ПК, мг/л	$17,7 \pm 2,3$	$419,6 \pm 18,1$	$13,7 \pm 2,1$	$501,3 \pm 57,0$
Содержание ПОК, % от с.м.	$10,3 \pm 0,3$	$16,7 \pm 1,2$	$6,3 \pm 0,2$	$16,3 \pm 0,4$
Концентрация ПОК, мг/л	$22,3 \pm 3,6$	$896,5 \pm 22,5$	$19,5 \pm 4,6$	$1312,2 \pm 109,0$
Содержание ЭПК, % от с.м.	$2,7 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,0$
Концентрация ЭПК, мг/л	$5,8 \pm 0,6$	$109,4 \pm 7,5$	$5,8 \pm 1,8$	$113,7 \pm 8,8$

Примечание: н/о – не обнаружено, с.м. – сухая масса.

изучаемые штаммы существенно уступают ряду продуцентов, у которых ее доля составляет 20,6%–43,2% [4, 27]. Однако за счет накопления биомассы и высокого содержания липидов в стационарной фазе концентрация ЭПК в культуре изучаемых штаммов в конечном итоге достигает высоких показателей [29]. Важно отметить, что выход целевых метаболитов исследуемых штаммов может быть повышен за счет оптимизации условий культивирования при подборе источника азота и его концентрации, интенсивности освещения и температуры [31].

Заключение

Современные проблемы и вызовы, такие как истощение природных ресурсов и рост численности населения, привели к появлению новой научной дисциплины, интегрирующей биологию и экономику, биоэкономики, одним из направлений которой является поиск биотехнологически перспективных штаммов микроорганизмов, имеющих коммерческое значение, или биопроспектинг (биоразведка). Микроводоросли, большинство из которых являются высокоадаптируемыми фототрофными микроорганизмами, продуцируют широкий спектр ценных соединений. Возможность управления метаболизмом штаммов за счет подбора культуральных условий и применения технологий генетической инженерии позволяют

превратить их в высокоэффективные зеленые биофабрики для производства дорогостоящих продуктов. В последнее время эустигматофитовые микроводоросли привлекают все большее внимание в связи с их высоким коммерческим потенциалом. Однако научный интерес по-прежнему сильно смещен в сторону морских родов *Nannochloropsis* и *Microchloropsis*. Хотя известно, что представители рода *Vischeria* являются эффективными продуцентами биомассы, обогащенной ПОК и ЭПК. В нашей работе было показано, что оба новых штамма VKM Al-480 и VKM Al-463, выделенные с песчаных дюн, обладают биотехнологической перспективностью. Однако именно штамм VKM Al-480 характеризуется наиболее высокой продуктивностью по биомассе и высоким содержанием ПК и ПОК, а также производит значительное количество ЭПК в стационарной фазе. Это делает его привлекательным в качестве альтернативного источника сырья для производства пищевых и кормовых добавок, косметических средств и биодизельного топлива.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №24-16-00163). Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blasio M., Balzano S. Fatty acids derivatives from eukaryotic microalgae, pathways and potential applications. *Front. Microbiol.* 2021;12:718933.
2. Maltsev Y., Maltseva K. Fatty acids of microalgae: diversity and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2021;20(2):515–547.
3. Gao B., Xia S., Lei X., Zhang C. Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga *Eustigmatos* cf. *polyphem*. *J. Appl. Phycol.* 2018;30(1):215–229.
4. Sinetova M.A., Sidorov R.A., Starikov A.Y., Voronkov A.S., Medvedeva A.S., Krivova Z.V., Pakholkova M.S., Bachin D.V., Bedbenov V.S., Gabrielyan D.A., Zayadan B.K., Bolatkhan K., Los D.A. Assessment of biotechnological potential of cyanobacteria and microalgae strains from the IPPAS culture collection. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020;56(7):794–808.
5. Sidorov R.A., Starikov A.Y., Sinetova M.A., Guilmisarian E.V., Los D.A. Identification of conjugated dienes of fatty acids in *Vischeria* sp. IPPAS C-70 under oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(6):323.
6. Lenihan-Geels G., Bishop K., Ferguson L. Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients* 2013;5(4):1301.
7. Coniglio S., Shumskaya M., Vassiliou E. Unsaturated fatty acids and their immunomodulatory properties. *Biology.* 2023;12(2):279.
8. Jack A., Adegbeye M., Ekanem D., Faniyi T., Fajemisin A.N., Elghandour M.M., Salem A.Z.M., Rivas-Caceres R.R., Adewumi K., Edoh O. Microalgae application in feed for ruminants. *Handbook of Food and Feed from Microalgae*. Eds. E. Jacob-Lopez, M.I. Queiroz, M.M. Maroneze, and L.Q. Zepka. Academic Press; 2023:397–409.
9. De Souza J., Lock A.L. Milk production and nutrient digestibility responses to triglyceride or fatty acid supplements enriched in palmitic acid. *J. Dairy Sci.* 2019;102(5):4155–4164.
10. Staples C.R., Burke J.M., Thatcher W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 1998;81(3):856–871.
11. Kholif A.E., Gouda A.G., Hatem A.H. Performance and milk composition of nubian goats as affected by increasing level of *Nannochloropsis oculata* microalgae. *Animals.* 2020;10(12):2453.
12. Wu Y., Li R., Hildebrand D.F. Biosynthesis and metabolic engineering of palmitoleate production, an important contributor to human health and sustainable industry. *Prog. Lipid Res.* 2012;51(4):340–349.
13. Kolouchová I., Sigler K., Schreiberová O., Masák J., Řezanka T. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. *Bioresour.* 2015;192:726–734.
14. Okullo A.A., Temu A.K., Ogowok P., Ntalikwa J.W. Physico-chemical properties of biodiesel from jatropha and castor oils. *Int. J. Renew. Energy Res.* 2012;2(1):47–52.

15. Shinde S., Kale A., Kulaga T., Licamele J.D., Tonkovich A.L. Omega 7 rich compositions and methods of isolating omega 7 fatty acids. US20130129775 A1. 2013.
16. Yang B.R., Kallio H.P. Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different origins. *J. Agric. Food. Chem.* 2001;49(4):1939–1947.
17. Knothe G. Biodiesel derived from a model oil enriched in palmitoleic acid macadamia nut oil. *Energy Fuels.* 2010;24(3):2098–2103.
18. Abdelhamid A.S., Brown T.J., Brainard J.S., Biswas P., Thorpe G.C., Moore H.J., Deane K.H., AlAbdulghafoor F.K., Summerbell C.D., Worthington H.V., Song F., Hooper L. Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018;7(7):CD003177.
19. Forbes S.C., Holroyd-Leduc J.M., Poulin M.J., Hogan D.B. Effect of nutrients, dietary supplements and vitamins on cognition: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Can. Geriatr. J.* 2015;18(4):231–245.
20. Alex A., Abbott K.A., McEvoy M., Schofield P.W., Garg M.L. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognitive decline in non-demented adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutr. Rev.* 2020;78(7):563–578.
21. Lands B. A critique of paradoxes in current advice on dietary lipids. *Prog. Lipid Res.* 2008;47(2):77–106.
22. Зайцева Л.В., Нечаев А.П. Полиненасыщенные жирные кислоты в питании: современный взгляд. *Пищевая промышленность.* 2014;4:14–19.
23. Krivina E., Portnov A., Temraleeva A. A description of *Aliichlorella ignota* gen. et sp. nov. and a comparison of the efficiency of species delimitation methods in the Chlorella-clade (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 2024;72(3):180–190.
24. Procházková K. Diverzita a druhový koncept u komplexu *Vischeria/Eustigmatos* (Eustigmatophyceae). Praha: Karlova univerzita; 2012. 79 pp.
25. Темралева А.Д., Портная Е.А. Морфологический и молекулярно-генетический анализ рода *Vischeria* (Eustigmataceae, Ochrophyta) в альгологической коллекции АСССИ. *Бот. журн.* 2022;107(2):132–148.
26. Kryvenda A., Rybalka N., Wolf M., Friedl T. Species distinctions among closely related strains of Eustigmatophyceae (Stramenopiles) emphasizing ITS2 sequence-structure data: *Eustigmatos* and *Vischeria*. *Eur. J. Phycol.* 2018;53(4):471–491.
27. Xu J., Li T., Li C.L., Zhu S.N., Wang Z.M., Zeng E.Y. Lipid accumulation and eicosapentaenoic acid distribution in response to nitrogen limitation in microalga *Eustigmatos vischeri* JHsu-01 (Eustigmatophyceae). *Algal Res.* 2020;48:101910.
28. Wang F., Gao B., Huang L., Su M., Dai C., Zhang C. Evaluation of oleaginous eustigmatophycean microalgae as potential biorefinery feedstock for the production of palmitoleic acid and biodiesel. *Bioresour. Technol.* 2018;270:30–37.
29. Sinetova M.A., Sidorov R.A., Medvedeva A.A., Starikov A.Y., Markelova A.G., Allakhverdiev S.I., Los D.A. Effect of salt stress on physiological parameters of microalgae *Vischeria punctata* strain IPPAS H-242, a superproducer of eicosapentaenoic acid. *J. Biotechnol.* 2021;331:63–73.
30. Gao B., Yang J., Lei X., Xia S., Li A., Zhang C. 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(2):821–830.
31. Krzemińska I., Nosalewicz A., Reszcyńska E., Pawlik-Skowrońska B. Enhanced light-induced biosynthesis of fatty acids suitable for biodiesel production by the yellow-green alga *Eustigmatos magnus*. *Energies.* 2020;13(22):6098.
32. Kaijser A., Dutta P.C., Savage G.P. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. *Food Chem.* 2020;71(1):67–70.

Поступила в редакцию 10.04.2024

После доработки 06.09.2024

Принята в печать 11.09.2024

RESEARCH ARTICLE

New strains of the genus *Vischeria* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta): composition of fatty acids and their possible use as dietary supplements for animals and humans

E.S. Krivina¹ , M.A. Sinetova² , V.V. Red'kina¹ , A.V. Soromotin³ ,
N.V. Zheryatyeva³ , A.D. Temraleeva¹ 

¹All-Russian Collection of Microorganisms, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Nauka Prospect 5, Pushchino, 142290, Russian Federation;

²K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya st. 35, Moscow, Russian Federation;

³Tyumen State University, Volodarsky st. 6, Tyumen, 625003, Russian Federation

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

In recent years, amid an increasing shortage of resources, there has been a steady trend towards the search for new biotechnologically valuable algae strains. This paper presents the results of a study of the taxonomic position, growth characteristics and analysis of the fatty acid profile of two strains of eustigmatophyte microalgae of the genus *Vischeria* (Heterokontophyta) isolated

from the Nadymsky district of the Yamalo-Nenets Autonomous Okrug (Russia) in order to clarify their biotechnological potential. According to the results of morphological and phylogenetic analysis using internal transcribed spacer 2 (ITS2), the strains were identified as *Vischeria* sp. In the work, the growth rates of the studied strains were studied in detail, productivity was assessed, the content of total lipids was determined and the fatty acid composition was studied. It has been shown that both are active producers of palmitic, eicosapentaenoic and palmitoleic acids. It is noteworthy that in terms of the content of palmitoleic acid, both strains studied are superior to its traditional sources. In the strains VKM AI-463 and VKM AI-480, the final concentration of palmitic acid was $419,6 \pm 18,1$ mg/l and $501,3 \pm 57,0$ mg/l, palmitoleic acid – $896,5 \pm 22,5$ mg/l and $1312,5 \pm 109,0$ mg/l, eicosapentaenoic acid – $109,0 \pm 7,5$ mg/l and $113,7 \pm 8,8$ mg/l, respectively. During the comparative analysis, it was found that although both strains had undoubted biotechnological value, it was the VKM AI-480 strain that most effectively accumulated biomass enriched with these acids. This makes it attractive as an alternative source of raw materials for the production of food and feed additives, cosmetics and biodiesel.

Keywords: *microalgae, ITS2, bioprospecting, biotechnological potential, eicosapentaenoic acid, palmitoleic acid*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 24-16-00163.

Сведения об авторах

Кривина Елена Сергеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. ИБФМ РАН. Тел.: 8-937-667-42-72; e-mail: pepelisa@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0849-5832>

Синетова Мария Андреевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаборатории экофизиологии микроводорослей ИФР РАН. Тел.: 8-499-678-54-00; e-mail: maria.sinetova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9931-1762>

Редькина Вера Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ИБФМ РАН. Тел.: 8-937-667-42-72; e-mail: kalmykova_v_v@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4908-5098>

Соромотин Андрей Владимирович — док. биол. наук, директор НИИ экологии и РИПР Тюменского государственного университета. Тел.: 8-3452-41-00-59; e-mail: asoromotin@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7771-4592>

Жеребятьева Наталья Владимировна — канд. геогр. наук, доц. кафедры физической географии и экологии Тюменского государственного университета. Тел.: 8-3452-59-74-29, e-mail: jerebiatieva@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9492-1377>

Темралева Анна Диссенгалиевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ИБФМ РАН. Тел.: 8-4967-73-86-20; e-mail: temraleeva@pbcras.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3445-0507>