ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2501
https://elibrary.ru/EFYVTB

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Скрининг и характеристика антиоксидантных свойств психрофильных микроводорослей и цианобактерий Балтийского моря

В. Ф. Долганюк[1], С. А. Сухих[1,*], Е. В. Каширских[1], Е. В. Ульрих[2], О. Е. Кремлева[3], О. О. Бабич[1]

[1] *Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия*

[2] *Калининградский государственный технический университет, Калининград, Россия*

[3] *Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь*

Поступила в редакцию: 17.03.2023
Принята после рецензирования: 31.08.2023
Принята к публикации: 05.09.2023

**С. А. Сухих: stas-asp@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7910-8388*
В. Ф. Долганюк: https://orcid.org/0000-0003-0603-7456
Е. В. Каширских: https://orcid.org/0000-0003-0442-5471
Е. В. Ульрих: https://orcid.org/0000-0003-4107-7277
О. О. Бабич: https://orcid.org/0000-0002-4921-8997

© В. Ф. Долганюк, С. А. Сухих, Е. В. Каширских, Е. В. Ульрих, О. Е. Кремлева, О. О. Бабич, 2024

Аннотация.
Получение комплекса биологически активных веществ с антиоксидантной активностью из психрофильных микроводорослей и цианобактерий вызывает научный интерес, расширяет область их промышленного применения и открывает новые перспективы их использования. Целью работы являлся сбор и идентификация психрофильных микроводорослей и цианобактерий Балтийского моря, а также изучение их соединений, которые проявляют антиоксидантные свойства.
Объекты исследования – образцы психрофильных микроводорослей (*Skeletonema pseudocostatum*, *Thalassiosira pseudonana* и *Fragilariopsis kerguelensis*) и цианобактерий (*Aphanizomenon gracile* и *Anabaena cylindrica*). Образцы отобрали из природных источников в акватории Балтийского моря в Калининградской области (Куршский залив и Балтийский залив) в период с марта по май 2022 г. Анализ выделенных чистых культур осуществляли методами Пастера и проточной цитофлуориметрии. Антиоксидантную активность психрофильных микроводорослей и цианобактерий определяли путем анализа активности поглощения радикалов, восстанавливающей способности и хелатной активности с помощью спектрофотометрии.
Наибольшей антиоксидантной активностью по трем методам анализа обладала психрофильная микроводоросль *S. pseudocostatum*, которая по методу ABTS составила 17,62 мкмоль/г эквивалентов тролокса, по методу DPPH 58,16 мкмоль/г эквивалентов тролокса, по методу FRAP 3,91 мкмоль/г эквивалентов тролокса. Антиоксидантная активность *T. pseudonana* равна 12,08, 12,42 и 3,13 мкмоль/г эквивалентов тролокса. Для психрофильной микроводоросли *F. kerguelensis* этот показатель составил 13,53, 11,84 и 1,09 мкмоль/г эквивалентов тролокса. Антиоксидантная активность психрофильной цианобактерии *A. gracile* равна 15,73, 19,89 и 2,47 мкмоль/г эквивалентов тролокса. Значения антиоксидантной активности психрофильной цианобактерии *A. cylindrica* составили 12,62, 13,16 и 2,16 мкмоль/г эквивалентов тролокса.
Отобрали образцы психрофильных микроводорослей и цианобактерий из природных источников в акватории Балтийского моря (Калининградская область), которые продуцируют компоненты с высокой антиоксидантной активностью. Полученные результаты могут стать основой для разработки новой фармацевтической субстанции.

Ключевые слова. *Skeletonema pseudocostatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Fragilariopsis kerguelensis*, *Aphanizomenon gracile*, *Anabaena cylindrica*, микроводоросли, биологически активные вещества, скрининг, идентификация, антиоксидантная активность

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России) (грант Президента Российской Федерации), проект № МК-484.2022.1.4 (соглашение № 075-15-2022-393).

Для цитирования: Скрининг и характеристика антиоксидантных свойств психрофильных микроводорослей и цианобактерий Балтийского моря / В. Ф. Долганюк [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 2. С. 212–221. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2501

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2501
https://elibrary.ru/EFYVTB

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Screening and Profiling the Antioxidant Properties of Psychrophilic Microalgae and Cyanobacteria from the Baltic Sea

Vyacheslav F. Dolganyuk[1], Stanislav A. Sukhikh[1,*], Egor V. Kashirskih[1], Elena V. Ulrikh[2], Olga E. Kremleva[3], Olga O. Babich[1]

[1] *Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

[2] *Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia*

[3] *Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus*

Received: 17.03.2023
Revised: 31.08.2023
Accepted: 05.09.2023

**Stanislav A. Sukhikh: stas-asp@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7910-8388*
Vyacheslav F. Dolganyuk: https://orcid.org/0000-0003-0603-7456
Egor V. Kashirskih: https://orcid.org/0000-0003-0442-5471
Elena V. Ulrikh: https://orcid.org/0000-0003-4107-7277
Olga O. Babich: https://orcid.org/0000-0002-4921-8997

© V.F. Dolganyuk, S.A. Sukhikh, E.V. Kashirskih, E.V. Ulrikh, O.E. Kremleva, O.O. Babich, 2024

Abstract.
At present, the issue of obtaining a complex of biologically active substances with antioxidant activity from psychrophilic Psychrophilic microalgae and cyanobacteria are a prospective source of biologically active antioxidant substances. New antioxidant complexes could expand the scope of their industrial application. The research objective was to identify psychrophilic microalgae and cyanobacteria from the Baltic Sea in order to study their antioxidant properties.
The research featured psychrophilic microalgae and cyanobacteria obtained from the Curonian Lagoon and the Baltic Bay in the Baltic Sea, Kaliningrad Region, Russia, in March – May 2022. The authors used the Pasteur method and the flow cytometry method to isolate pure cultures of psychrophilic microalgae and cyanobacteria. The method of spectrophotometry made it possible to study the antioxidant activity by analyzing radical scavenging, reducing ability, and chelating.
The psychrophilic microalga *Skeletonema pseudocostatum* demonstrated the highest antioxidant activity in all three methods: 17.62 µmol/g trolox equivalents according to the ABTS method, 58.16 µmol/g trolox equivalents according to the DPPH method, and 3.91 µmol/g trolox equivalents according to the FRAP method. The psychrophilic microalga *Thalassiosira pseudonana* exhibited the following values of antioxidant activity: 12.08, 12.42, and 3.13 µmol/g trolox equivalents, respectively. The antioxidant activity of the psychrophilic microalgae *Fragilariopsis kerguelensis* was 13.53, 11.84, and 1.09 µmol/g trolox equivalents, respectively. The antioxidant activity of the psychrophilic cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* was 15.73, 19.89, and 2.47 µmol/g trolox equivalents, respectively. The antioxidant activity of the psychrophilic cyanobacterium *Anabaena cylindrica* was 12.62, 13.16, and 2.16 µmol/g trolox equivalents, respectively.
The samples of psychrophilic microalgae and cyanobacteria obtained from natural environment in the Russian Baltic Sea demonstrated good antioxidant properties, which makes them a potential raw material for new pharmaceutical substances.

Keywords. *Skeletonema pseudocostatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Fragilariopsis kerguelensis*, *Aphanizomenon gracile*, *Anabaena cylindrica*, microalgae, biologically active substances, screening, identification, antioxidant activity

Funding. The research was supported by the Presidential Grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Minobrnauki), project no. MK-484.2022.1.4, agreement no. 075-15-2022-393.

For citation: Dolganyuk VF, Sukhikh SA, Kashirskih EV, Ulrikh EV, Kremleva OE, Babich OO. Screening and Profiling the Antioxidant Properties of Psychrophilic Microalgae and Cyanobacteria from the Baltic Sea. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(2):212–221. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2501

Введение

Образование активных форм кислорода при недостаточной антиоксидантной защите приводит к окислительному стрессу или нарушению прооксидантно-антиоксидантного баланса в пользу прооксидантов. Это может вызывать повреждение клеток, что влечет за собой развитие ряда патологических изменений [1–3].

Антиоксидантная система включает ферментативное (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза и др.) и неферментативное

звено (α-токоферол, ретинол, аскорбиновая кислота и др.). К биоантиоксидантам относятся вещества биогенного происхождения, способные при химическом взаимодействии тормозить свободнорадикальное окисление, независимо от механизма их действия, но без необратимой инактивации ферментативных и генетических систем. В нормальных физиологических концентрациях они необходимы для осуществления биоокисления (дыхания, гликолиза), стимулируют и нормализуют его. Создание суммарной антиокислительной активности тканей является результатом совместного действия жирорастворимых (α-токоферол) и водорастворимых (сульфгидрильные соединения) групп биоантиокислителей [4]. По механизму действия биоантиокислители можно разделить на четыре группы: 1) антирадикальные ингибиторы (фенолы); 2) соединения, которые восстанавливают пероксиды (серусодержащие); 3) вещества, которые связывают катализаторы перекисного окисления липидов (ионы металлов переменной валентности); 4) тушители, безызлучательно инактивирующие синглетный кислород (α-токоферол, каротиноиды) [1].

Вещества, которые обладают антиоксидантной активностью, широко применяются в медицине для коррекции процессов свободнорадикального окисления при различных заболеваниях. Антиоксиданты способны восстановить окислительные процессы, защищая молекулы-мишени и удаляя из среды активные формы кислорода [5]. В организме человека существует физиологическая антиоксидантная система, которая поддерживает окислительно-антиоксидантный баланс в органах и системах. Однако из-за ее сложности существует низкая вероятность того, что заболевания современного человека будут являться следствием дефицита одного единственного вещества [6]. Эндогенный антиоксидантный механизм защиты человека, несмотря на свою эффективность, недостаточен. Поэтому требуется дополнительное введение антиоксидантов извне. Теоретические и практические данные позволяют предположить, что использование внешних антиоксидантов может привести к снижению риска сердечно-сосудистых заболеваний, рака и большой группы других заболеваний, в которых свободные радикалы играют важную роль [7].

Широкий интерес вызывает вопрос получения комплекса биологически активных веществ с антиоксидантной активностью из макро- и микроводорослей. Водоросли отличаются высоким содержанием разнообразных антиоксидантов, молекулы которых относятся к нескольким классам: полифенолы, хлорофиллы, β-каротины (ксантофильные каротины), стероиды, аминокислоты и др. [8]. Богатый состав биологически активных веществ позволяет использовать водоросли в качестве перспективного источника комплекса антиоксидантов [9, 10].

Микроводоросли, являясь одноклеточными фотосинтезирующими микроорганизмами, преобразуют солнечную энергию в биомассу эффективнее, чем наземные растения [11, 12]. Основными производимыми видами микроводорослей являются *Skeletonema pseudocostatum*, *Thalassiosira pseudonana* и *Fragilariopsis kerguelensis*, а также сине-зеленые микроводоросли (цианобактерии) *Aphanizomenon gracile* и *Anabaena cylindrica*. Они находят применение в производстве кормов для рыбы и сельскохозяйственных животных, органических удобрений, а также ценных экстрактов полиненасыщенных жирных кислот, пигментов, нутрицевтиков, антиоксидантов, противораковых и антимикробных агентов [13].

Микроводоросли рассматриваются как новый источник ценных химических веществ. Данный факт привел к развитию технологий их культивирования в фотобиореакторах с дальнейшей переработкой биомассы [14]. Возможности использования биомассы микроводорослей и их метаболитов, таких как полисахариды, в биотехнологических производствах приводят к снижению себестоимости продуктов биосинтеза [15]. К эукариотическим и прокариотическим микроводорослям, продуцирующим и выделяющим большое количество полисахаридов в окружающую среду, относятся *S. pseudocostatum*, *T. pseudonana* и *F. kerguelensis*, а также цианобактерии *A. gracile* и *A. cylindrica*.

Экзополисахариды – это высокомолекулярные полимеры, состоящие из остатков сахаров, которые секретируются микроводорослями в окружающую среду и могут служить барьером между клетками и окружающей средой [16, 17]. Эти соединения привлекают к себе внимание в качестве потенциального источника лекарственных субстанций, поскольку они не токсичны и обладают иммуномодулирующим, антиоксидантным, противовоспалительным, антимикробным и антибиопленочным действиями [18]. Экзополисахариды морских цианобактерий и микроводорослей отличаются от полисахаридов из наземных растений тем, что для них можно создать определенные воспроизводимые контролируемые параметры производства. В результате этого исключается экологическое воздействие и достигается высокое качество конечного продукта [19]. В последние годы исследования ученых нацелены на изучение экзополисахаридов из цианобактерий и микроводорослей. Поскольку эти микроорганизмы выживают в сложных условиях высокой или низкой температуры и высокого атмосферного давления, то экзополисахариды, выделенные из них, обладают уникальными свойствами [20]. Экзополисахариды рассматриваются авторами не как ценные молекулы, а как побочные продукты при получении пигментов или липидов [21].

Выделение антиоксидантного комплекса из психрофильных микроводорослей и цианобактерий, которые еще не были изучены, может расширить область их промышленного применения и открыть новые перспективы использования. Из-за разнообразия психрофильных микроводорослей и цианобактерий, их

высокой метаболической гибкости и различных условий культивирования их реальный потенциал еще не оценен полностью [22]. Инновационные разработки фундаментальных основ биосинтеза антиоксидантных соединений психрофильных микроводорослей и цианобактерий, выделенных из акватории Балтийского моря, и создание на их основе новых фармацевтических субстанций будут востребованы в настоящее время [23].

Целью работы являлся сбор и идентификация психрофильных микроводорослей и цианобактерий Балтийского моря, а также изучение их соединений, которые проявляют антиоксидантные свойства.

Новизна работы заключается в отборе и изучении антиоксидантных свойств психрофильных микроскопических водорослей и цианобактерий из акватории Балтийского моря (Калининградская область) для последующего их использования при создании новых фармацевтических субстанций.

Объекты и методы исследования

Провели отбор образцов психрофильных микроводорослей и цианобактерий из природных источников (вода, песок, почва). Отбор природных образцов осуществляли в период с марта по май 2022 г. в акватории Балтийского моря Калининградской области (Куршский залив (55°07′00″ с.ш. 21°01′00″ в.д.) и Балтийский залив (54°29′ с.ш. 19°46′ в.д.)). Отбор проб микроводорослей проводили следующим образом [24].

При изучении микроводорослей поверхностных слоев воды пробы отбирали, зачерпывая воду в сосуд определенного объема. В водоемах с бедным фитопланктоном отбирали пробы объемом не менее 1 л параллельно с сетевыми сборами, которые позволяют улавливать малочисленные и сравнительно крупные объекты. В водоемах с богатым фитопланктоном объем количественной пробы уменьшали до 0,5 л и даже до 0,25 л (например, при «цветении» воды).

Сгущение количественных проб микроводорослей осуществляли осадочным методом после их предварительной фиксации и отстаивания в темном месте в течение 15–20 дней путем отсасывания среднего слоя воды с помощью стеклянной трубки, один конец которой затянут мельничным ситом № 77 в несколько слоев, а второй соединен с резиновым шлангом. Отсасывание проводили медленно и осторожно, чтобы не допустить нарушения осадка и засасывания поверхностного слоя пробы. Сгущенную таким способом пробу взбалтывали и, замерив ее объем, переносили в сосуд меньшего размера. После забора образцы исследовали в течение 3-х суток.

Выделение чистых культур психрофильных микроводорослей и цианобактерий, способных активно накапливать биомассу и целевой продукт – антиоксидантный комплекс – и пригодных для культивирования в лабораторных условиях, проводили из накопительных культур, в которых наблюдался их рост [25]. Для получения накопительных культур исследуемые образцы природных источников (вода, песок, почва) вносили в питательную среду ВВМ (ООО «Диа-М», Москва, Россия) [26]. Использовали 50 образцов психрофильных микроводорослей и цианобактерий, выделенных в акватории Балтийского моря в различных регионах Калининградской области. У 10 образцов на первичном этапе получения накопительных культур обнаружили рост и развитие психрофильных микроводорослей и цианобактерий.

Выделение чистых культур психрофильных микроводорослей и цианобактерий из накопительной культуры осуществляли двумя методами:

– методом Пастера, основанным на последовательном разведении психрофильных микроводорослей и цианобактерий и последующем разделении образующихся колоний микроорганизмов на агаризованной питательной среде ВВМ [27];
– методом проточной цитофлуориметрии, основанным на регистрации оптических параметров находящихся в потоке клеток по сигналам светорассеяния и флуоресценции. Для детекции клеток штаммов психрофильных микроводорослей и цианобактерий проводили измерения светового рассеяния вперед и флуоресценцию хлорофилла α (красная область спектра, длина волны более 650 нм) [28].

Для доказательства способности психрофильных микроводорослей и цианобактерий продуцировать полисахариды определяли их антиоксидантную активность путем анализа активности по поглощению радикалов, восстанавливающей способности и хелатной активности [29].

При определении антиоксидантной активности методом DPPH 20 мкл образца психрофильных микроводорослей и цианобактерий или стандартного раствора (тролокса) смешивали с 300 мкл свежеприготовленного 0,1 мМ раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Снижение оптической плотности, по сравнению с контролем, состоящем из 0,1 мМ раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила и растворителя (метанола), регистрировали с использованием двухлучевого спектрофотометра UV-3600 (Shimadzu, Киото, Япония) при 515 нм [30].

При определении антиоксидантной активности методом ABTS предварительно готовили раствор с реактивом ABTS. Данный раствор получали путем смешивания аликвот 7,0 мМ раствора реактива ABTS и 2,45 мМ раствора персульфата калия. Раствор выдерживали 16 ч в темном месте при комнатной температуре. Для запуска реакции 300 мкл раствора катионрадикала ABTS+ добавляли к 20 мкл психрофильных микроводорослей и цианобактерий или стандарта (тролокс). Оптическую плотность измеряли с использованием двухлучевого спектрофотометра UV-3600 при 734 нм после инкубации смеси в течение 15 мин при 37 °C в темноте. В качестве контроля использовали пробу с реактивом ABTS и соответствующим растворителем (метанолом) [31].

Для определения восстанавливающей активности психрофильных микроводорослей и цианобактерий использовали свежеприготовленный реагент FRAP. Его получали путем смешивания 10 частей 0,3 М ацетатного буфера (pH 3,6), одной части 10 мМ раствора 2,4,6-трипиридил-s-триазина в 40 мМ HCl и одной части 20 мМ водного раствора хлорида железа $FeCl_3 \times 6H_2O$. Реакцию запускали смешиванием 300 мкл реагента FRAP и 20 мкл испытуемого антиоксидантного комплекса или стандартного раствора (тролокс). Время реакции 10 мин при 37 °C в темноте. Оптическую плотность измеряли с использованием двухлучевого спектрофотометра UV-3600 при 593 нм. В качестве контроля использовали пробу с реагентом FRAP и соответствующим растворителем (метанолом).

При измерении антиоксидантной активности методами DPPH, ABTS и FRAP в качестве стандартного раствора использовали растворы тролокса (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) известной концентрации. Результаты анализов психрофильных микроводорослей и цианобактерий выражали в мкмоль на грамм эквивалентов тролокса (мкмоль/г эквивалентов тролокса). Все спектрофотометрические измерения были выполнены с использованием устройства для чтения CLARIOstar (BMG Labtech, Ортенберг, Германия) [12].

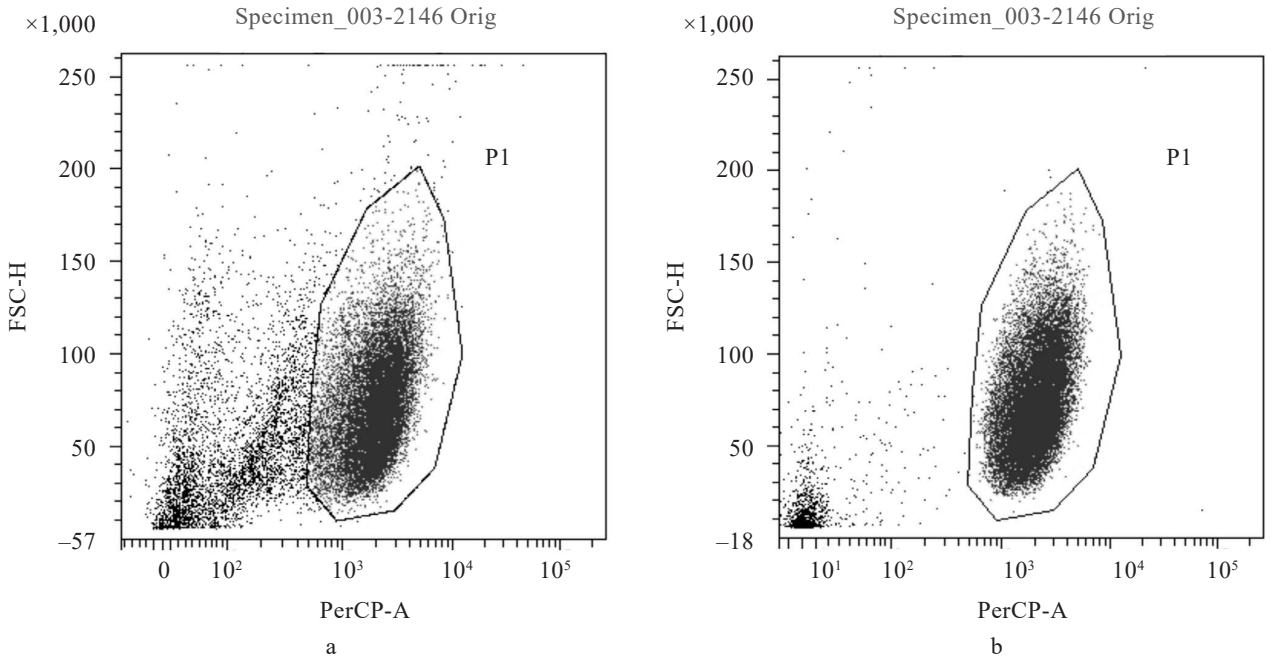
Все реактивы чистотой х.ч. и выше приобретали в ООО «Диа-М.

Результаты и их обсуждение

Антиоксидантный комплекс психрофильных микроводорослей и цианобактерий – это комплекс полисахаридов, который обладает способностью ингибировать окисление молекул и имеет множество медицинских и фармакологических применений [23].

Пример цитограммы, полученной с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США), образца накопительной культуры до и после сортировки клеток психрофильных микроводорослей и цианобактерий, локализованных в накопительной культуре, представлен на рисунке 1. На полученных цитограммах обнаружено несколько кластеров частиц и клеток микроорганизмов. Анализ цитограмм позволил сделать вывод о том, что накопительная культура содержит в себе разнородный состав микроорганизмов.

На рисунке 1 зона, которая характеризуется наибольшим поглощением и рассеиванием при длине волны 650 нм, выделена красным цветом (в центре окружности) и представляет собой область P1. Область P1 соответствует наличию живых клеток психрофильных микроводорослей в накопительной культуре. После соответствующего разделения из 10 накопительных культур, в которых наблюдался рост и развитие микроорганизмов, выявлено 5 штаммов психрофильных микроводорослей и цианобактерий, которые являлись аксеничными и показывали стабильность при культивировании в лабораторных условиях. Отобрали образцы



Ось X (PerCP-A) соответствует каналу флюоресценции 695/40 нм, ось Y (FSC-H) – светорассеянию вперед, область P1 – сигналу в области эмиссии хлорофилла микроводорослей

Рисунок 1. Цитограмма, полученная с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX, образца накопительной культуры до (a) и после (b) сортировки клеток микроводорослей

Figure 1. Cytogram obtained using a CytoFLEX flow cytometer of enrichment culture sample before (a) and after (b) microalgae cell sorting

психрофильных микроводорослей и цианобактерий из природных источников в акватории Балтийского моря (Калининградская область) в количестве 50 шт. У 10 образцов на первичном этапе получения накопительных культур обнаружили рост и развитие психрофильных микроводорослей и цианобактерий.

Результаты выделения штаммов психрофильных микроводорослей и цианобактерий в акватории Балтийского моря из природных источников Калининградской области представлены в таблице 1.

Для идентификации выделенных из накопительной культуры штаммов психрофильных микроводорослей и цианобактерий определили частичные последовательности гена 18S и/или 16S рРНК. После этого провели сравнительный анализ с последовательностями из базы Genbank. Результаты сравнительного анализа последовательности гена 18S рРНК свидетельствуют о том, что в акватории Балтийского моря из природных источников (почва, вода, песок) выделены зеленые микроводоросли *Skeletonema pseudocostatum*, *Thalassiosira pseudonana* и *Fragilariopsis kerguelensis*, а также сине-зеленые микроводоросли (цианобактерии) *Aphanizomenon gracile* и *Anabaena cylindrica*.

Среди антиоксидантных соединений микроводорослей можно выделить аскорбиновую кислоту, глутатион, токоферолы, фенольные соединения и пигменты [32]. Аскорбиновая кислота участвует в защите фотосинтетического аппарата посредством участия в регенерации каротиноидов ксантофиллового цикла (кофактор виолаксантиндеэпоксидазы) и α-токоферола, которые связанны с мембранами [33]. Глутатион представляет собой водорастворимый трипептид (l-γ-глутамил-l-цистеинилглицин), присутствующий во всех клеточных компартментах, которые играют решающую роль в антиоксидантном ответе [34]. Токоферолы или витамин Е и токотриенолы являются жирорастворимыми молекулами, синтезируемыми только фотосинтезирующими организмами и расположенными в липидных бислоях мембран, главным образом в мембранах хлоропластов. Основными молекулами фенольных соединений, идентифицированными в микроводорослях, являются флороглюцинол, флавоноиды и фенольные кислоты: галловая, протокатеховая, кофейная, хлорогеновая, ванилиновая, п-оксибензойная и салициловая [35]. Среди пигментов можно упомянуть мареннин – это сине-зеленый пигмент, который проявляет уникальные антиоксидантные свойства против свободных радикалов [32].

Результаты определения количества полисахаридов и антиоксидантной активности психрофильных микроводорослей и цианобактерий *S. pseudocostatum*, *T. pseudonana*, *F. kerguelensis*, *A. gracile* и *A. cylindrica*, представлены в таблице 2.

Анализ экспериментальных данных показывает, что наибольшее количество полисахаридов накапливается в культуральной жидкости (КЖ) *S. pseudocostatum* (1,17 ± 0,01 мг/г с.в.) при среднем содержании клеток в КЖ 1,409 ± 0,050 г/л, наименьшее – в КЖ *T. pseudonana* (0,45 ± 0,01 мг/г с.в.) при среднем содержании клеток в КЖ 0,790 ± 0,030 г/л. При наибольшем среднем содержании клеток в КЖ *A. gracile* (1,507 ± 0,050 г/л) содержание полисахаридов в данной цианобактерии составило 1,09 ± 0,01 мг/г с.в. В микроводоросли *F. kerguelensis* при среднем содержании клеток в КЖ 1,262 ± 0,050 г/л накапливалось 0,89 ± 0,01 мг/г с.в. полисахаридов. В цианобактерии *A. cylindrica* при среднем содержании клеток в КЖ 0,879 ± 0,030 г/л накапливалось 0,69 ± 0,01 мг/г с.в. полисахаридов.

Таблица 1. Результаты выделения штаммов психрофильных микроводорослей и цианобактерий в акватории Балтийского моря из природных источников Калининградской области

Table 1. Strains of psychrophilic microalgae and cyanobacteria isolated from the Russian Baltic Sea

Наименование пункта сбора образца	Количество отобранных образцов	Количество накопительных культур, в которых наблюдался рост и развитие психрофильных микроводорослей и цианобактерий	Количество выделенных культур психрофильных микроводорослей и цианобактерий
Куршский залив, поселок Морское (песок, почва и вода)	13	2	1
Куршский залив, поселок Лесной (почва и вода)	8	1	0
Куршский залив, поселок Матросово (почва и вода)	4	2	1
Куршский залив, поселок Рыбачий (почва и вода)	7	1	1
Балтийский залив, поселок Дивное (почва и вода)	8	1	0
Балтийский залив, поселок Цветное (песок, почва и вода)	3	2	2
Балтийский залив, поселок Лунино (почва, вода)	7	1	0

Таблица 2. Содержание полисахаридов и антиоксидантная активность психрофильных микроводорослей и цианобактерий

Table 2. Polysaccharide content and antioxidant activity of psychrophilic microalgae and cyanobacteria

Название психрофильных микроводорослей и цианобактерий	Среднее содержание клеток в КЖ (ОП 750) в конце культивирования, г/л	Среднее общее содержание полисахаридов в КЖ (ОП 750) в конце культивирования, мг/г с.в.	Антиоксидантная активность, мкмоль/г эквивалентов тролокса		
			ABTS	DPPH	FRAP
Skeletonema pseudocostatum	1,409 ± 0,050	1,17 ± 0,01	17,62 ± 0,91	58,16 ± 3,90	3,91 ± 0,12
Thalassiosira pseudonana	0,790 ± 0,030	0,45 ± 0,01	12,08 ± 0,62	12,42 ± 0,43	3,13 ± 0,26
Fragilariopsis kerguelensis	1,262 ± 0,050	0,89 ± 0,01	13,53 ± 0,73	11,84 ± 0,36	1,09 ± 0,13
Aphanizomenon gracile	1,507 ± 0,050	1,09 ± 0,01	15,73 ± 0,82	19,89 ± 0,97	2,47 ± 0,23
Anabaena cylindrica	0,879 ± 0,030	0,69 ± 0,01	12,62 ± 0,64	13,16 ± 0,53	2,16 ± 0,24

Примечание: КЖ – культуральная жидкость; ОП – оптическая плотность.
Note: КЖ – culture fluid; ОП – optical density.

Согласно данным таблицы 2 наибольшей антиоксидантной активностью по всем трем методам обладает психрофильная микроводоросль *S. pseudocostatum*. Антиоксидантная активность по методу ABTS для данной микроводоросли составила 17,62 ± 0,91 мкмоль/г эквивалентов тролокса, по методу DPPH – 58,16 ± 3,90 мкмоль/г эквивалентов тролокса, по методу FRAP – 3,91 ± 0,12 мкмоль/г эквивалентов тролокса. Психрофильная микроводоросль *T. pseudonana* проявляла следующие значения антиоксидантной активности: 12,08 ± 0,62, 12,42 ± 0,43 и 3,13 ± 0,26 мкмоль/г эквивалентов тролокса. Антиоксидантная активность психрофильной микроводоросли *F. kerguelensis* составила 13,53 ± 0,73, 11,84 ± 0,36 и 1,09 ± 0,13 мкмоль/г эквивалентов тролокса. Антиоксидантная активность психрофильной цианобактерии *A. gracile* составила 15,73 ± 0,82, 19,89 ± 0,97 и 2,47 ± 0,23 мкмоль/г эквивалентов тролокса. Величина антиоксидантной активности психрофильной цианобактерии *A. cylindrica* оказалась равной 12,62 ± 0,64, 13,16 ± 0,53 и 2,16 ± 0,24 мкмоль/г эквивалентов тролокса.

Повышенная антиоксидантная активность выделенных и очищенных психрофильных микроводорослей и цианобактерий *S. pseudocostatum*, *T. pseudonana*, *F. kerguelensis*, *A. gracile* и *A. cylindrica* связана со взаимным экранированием восстанавливающих центров антиоксидантного комплекса (экзо- и энодополисахаридов) и увеличением их доступности за счет конформационных изменений макромолекул, вызванных образованием внутри- и межмолекулярных водородных связей [36].

Особенность накопления биомассы микроводорослей заключается в наличии в ней большого количества биологически активных веществ, лабильных к различным условиям. Количество биомассы микроводорослей возрастает в весенние месяцы с увеличением количества освещения и протеканием процесса фотосинтеза. На весенние месяцы приходится логарифмическая фаза развития – наибольшее накопление биомассы и соединений, обладающих антиоксидантной активностью [37]. Дальше наступают фаза замедления и стационарная фаза.

К антиоксидантным соединениям относятся также редуцирующие (восстанавливающие) сахара микроводорослей – это биомолекулы, которые действуют как восстановители, т. е. они могут отдавать электроны другой молекуле.

Подобно клеточным анализам оценка антиоксидантной активности экстрактов микроводорослей в экспериментах *in vivo* ограничена по сравнению с анализами *in vitro*. В этих исследованиях использовались различные анализы антиоксидантов *in vitro* в сочетании с другими физиологическими измерениями, такими как активность антиоксидантных ферментов на различных моделях животных (например, креветки, курицы, сомы, крысы, палтусы или форели) для оценки влияния микроводорослей [38, 39]. Микроводоросли (*Schizochytrium* sp., *Chlorella vulgaris*, *Amphora coffeaformis*, *Schizochytrium limacinum*, *Acutodesmus obliquus*, *Nannochloropsis* spp., *Tetraselmis chuii* и *Botryococcus braunii*) включались в корм животным в виде сухих микроводорослей с процентом включения от 1 до 10 % или в виде молекулярного эквивалента данных антиоксидантных соединений. Результаты варьировались в зависимости от вида микроводорослей из-за отсутствия протестированных микроводорослей к снижению показателей окислительного стресса, таких как содержание малонового диальдегида или перекиси водорода, или к уменьшению повреждения ДНК [39–41]. Включение микроводорослей в корм положительно влияет на физиологию животных. Это является перспективным для использования микроводорослей в пищевой промышленности как в питании людей, так и животных в качестве функциональных ингредиентов. Это поднимает вопрос о биодоступности антиоксидантного соединения в матрице водорослей и перевариваемости протестированных микроводорослей [42].

Выводы

Выявили 5 штаммов психрофильных микроводорослей и цианобактерий, которые являлись аксеничными и показывали стабильность при культивировании в лабораторных условиях. С помощью сравнительного анализа последовательности генов 16S ribosomal RNA и 18S rRNA идентифицировали 3 штамма психрофильных зеленых микроводорослей *Skeletonema pseudocostatum*, *Thalassiosira pseudonana* и *Fragilariopsis kerguelensis*, а также 2 штамма психрофильных сине-зеленых микроводорослей (цианобактерий) *Aphanizomenon gracile* и *Anabaena cylindrica*.

Изучили способность психрофильных микроводорослей и цианобактерий *S. pseudocostatum*, *T. pseudonana*, *F. kerguelensis*, *A. gracile* и *A. cylindrica* продуцировать антиоксидантный комплекс, в состав которого входят полисахариды: эндо- и экзополисахариды. Способность психрофильных микроводорослей и цианобактерий *S. pseudocostatum*, *T. pseudonana*, *F. kerguelensis*, *A. gracile* и *A. cylindrica* продуцировать антиоксидантный комплекс доказана наличием антиоксидантной активности психрофильных микроводорослей и цианобактерий. Антиоксидантную активность определили методами удаления радикалов с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом и восстановления с ионами железа и раствора 2,4,6-трипиридил-s-триазином. Наибольшей антиоксидантной активностью обладает психрофильная микроводоросль *S. pseudocostatum*.

Критерии авторства

Фактический вклад каждого автора: В. Ф. Долганюк – 20 %, С. А. Сухих – 20 %, Е. В. Каширских – 10 %, Е. В. Ульрих – 15 %, О. Е. Кремлева – 10 %, О. О. Бабич – 2 %.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

V.F. Dolganyuk – 20%, S.A. Sukhikh – 20%, E.V. Kashirskih – 10%, E.V. Ulrikh – 15%, O.E. Kremleva – 10%, O.O. Babich – 25%.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Sobakar' MS, Shih EV. Antioxidant therapy and metabolic approaches to treatment of cardio-vascular system diseases. Journal Biomed. 2010;(3):10–21. (In Russ.). [Собакарь М. С., Ших Е. В. Антиоксидантная терапия и метаболические подходы к лечению заболеваний сердечно-сосудистой системы // Биомедицина. 2010. № 3. С. 10–21.]. https://www.elibrary.ru/NUJCKZ

2. Faskhutdinova ER, Sukhikh AS, Le VM, Minina VI, Khelef MEA, Loseva AI. Effects of bioactive substances isolated from Siberian medicinal plants on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Foods and Raw Materials. 2022;10(2):340–352. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-2-544

3. Prosekov AYu, Dyshlyuk LS, Milentyeva IS, Sykhikh SA, Babich OO, Ivanova SA, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. Progress in Nutrition. 2017;19(1):67–80. https://doi.org/10.23751/pn.v19i1.5147

4. Nikitina OA, Darenskaya MA, Semenova NV, Kolesnikova LI. Antioxidant defense system: Regulation of metabolic processes, genetic determinants, methods of determination. The Siberian Scientific Medical Journal. 2022;42(3):4–17. (In Russ.). https://doi.org/10.18699/SSMJ20220301

5. Coulombier N, Nicolau E, le Déan L, Antheaume C, Jauffrais T, Lebouvier N. Impact of light intensity on antioxidant activity of tropical microalgae. Marine Drugs. 2020;18(2):122. https://doi.org/10.3390/md18020122

6. Coulombier N, Blanchier P, le Dean L, Barthelemy V, Lebouvier N, Jauffrais T. The effects of CO_2-induced acidification on *Tetraselmis* biomass production, photophysiology and antioxidant activity: A comparison using batch and continuous culture. Journal of Biotechnology. 2021;325:312–324. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.005

7. Coulombier N, Nicolau E, le Déan L, Barthelemy V, Schreiber N, Brun P, *et al.* Effects of nitrogen availability on the antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae *Nephroselmis* sp. Marine Drugs. 2020;18(9):453. https://doi.org/10.3390/md18090453

8. Paliwal C, Mitra M, Bhayani K, Bharadwaj VSV, Ghosh T, Dubey S, *et al.* Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. Bioresource Technology. 2017;244:1216–1226. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058

9. Alloyarova YuV, Kolotova DS, Derkach SR. Nutritional and therapeutic potential of functional components of brown seaweed: A review. Foods and Raw Materials. 2024;12(2):398–419. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-616

10. Sathasivam R, Ki J-S. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. Marine Drugs. 2018;16(1):26. https://doi.org/10.3390/md16010026

11. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 2010;48(12):909–930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016

12. Dolganyuk V, Belova D, Babich O, Katserov D, Patyukov N, Sukhikh S, *et al.* Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. Biomolecules. 2020;10(8):1153. https://doi.org/10.3390/biom10081153

13. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. Archives of Toxicology. 2020;94:651–715. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3

14. Huang JJ, Lin S, Xu W, Cheung PCK. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. Biotechnology Advances. 2017;35(5):597–618. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.001

15. Ribeiro D, Freitas M, Silva AMS, Carvalho F, Fernandes E. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. Food and Chemical Toxicology. 2018;120:681–699. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.060

16. Yu M, Chen M, Gui J, Huang S, Liu Y, Shentu H, *et al.* Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Biological Macromolecules. 2019;137:139–150. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.222

17. Sukhikh SA, Budenkova EA, Boychenko Yu-DS, Anokhova VD, Dolganyuk VF, Kashirskih EV. Optimizing the production of polysaccharides from *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Food Processing: Techniques and Technology. 2023; 53(3):630–641. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2463

18. Gürlek C, Yarkent Ç, Köse A, Tuğcu B, Gebeloğlu IK, Öncel SŞ, *et al.* Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. Health and Technology. 2020;10:111–117. https://doi.org/10.1007/s12553-019-00388-3

19. Allen KM, Habte-Tsion H-M, Thompson KR, Filer K, Tidwell JH, Kumar V. Freshwater microalgae (*Schizochytrium* sp.) as a substitute to fish oil for shrimp feed. Scientific Reports. 2019;9:6178. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41020-8

20. Laroche C. Exopolysaccharides from microalgae and cyanobacteria: Diversity of strains, production strategies, and applications. Marine Drugs. 2022;20(5):336. https://doi.org/10.3390/md20050336

21. Nacer W, Baba Ahmed FZ, Merzouk H, Benyagoub O, Bouanane S. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effects of the microalgae *Nannochloropsis gaditana* in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Diabetes and Metabolic Disorders. 2020;19:1483–1490. https://doi.org/10.1007/s40200-020-00681-3

22. Qiao H, Hu D, Ma J, Wang X, Wu H, Wang J. Feeding effects of the microalga *Nannochloropsis* sp. on juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Algal Research. 2019;41:101540. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101540

23. Kashirskikh EV, Asyakina LK, Nadtsonov DD. On physicochemical properties of microalgae of the Baltic Sea. Vestnik IKBFU. Natural and Medical Sciences. 2022;(1):88–97. (In Russ.). [Каширских Е. В., Асякина Л. К., Надцонов Д. Д. Исследование физико-химических свойств микроводорослей Балтийского моря // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Естественные и медицинские науки. 2022. № 1. С. 88–97.]. https://www.elibrary.ru/DPEBHT

24. Pereira H, Barreira L, Mozes A, Florindo C, Polo C, Duarte CV, *et al.* Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. 2011;4:61. https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-61

25. López-Hernández J-F, Kean-Meng T, Asencio-Alcudia G-G, Asyraf-Kassim M, Alvarez-González C-A, Márquez-Rocha F-J. Sustainable microalgae and cyanobacteria biotechnology. Applied Sciences. 2022;12(14):6887. https://doi.org/10.3390/app12146887

26. Temraleeva AD, Dronova SA, Moskalenko SV, Didovich SV. Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria. Microbiology. 2016;85:389–399. https://doi.org/10.1134/S0026261716040159

27. Gao S, Kong Y, Yu J, Miao L, Ji L, Song L, *et al.* Isolation of axenic cyanobacterium and the promoting effect of associated bacterium on axenic cyanobacterium. BMC Biotechnology. 2020;20:61. https://doi.org/10.1186/s12896-020-00656-5

28. Takahashi T. Routine management of microalgae using autofluorescence from chlorophyll. Molecules. 2019;24(24): 4441. https://doi.org/10.3390/molecules24244441

29. Dolganyuk VF, Kashirskikh EV, Budenkova EA, Andreeva AP, Sukhikh SA. Study of morphological features and growth parameters of psychrophilic microalgae and cyanobacteria. Food Systems. 2022;5(4):289–297. (In Russ.). https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-289-297

30. Chaves N, Santiago A, Alías JC. Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: Analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. Antioxidants. 2020;9(1):76. http://doi.org/10.3390/antiox9010076

31. Oleinik G, Dario PP, de Morais Gasperin K, Benvegnú DM, Lima FO, Soares LC, *et al.* In vitro antioxidant extracts evaluation from the residue of the *Hevea brasiliensis* seed. Scientific Reports. 2022;12:480. http://doi.org/10.1038/s41598-021-04017-w

32. Coulombier N, Jauffrais T. Lebouvier N. Antioxidant compounds from microalgae: A review. Marine Drugs. 2021; 19(10):549. https://doi.org/10.3390/md19100549

33. Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free Radical Research. 2005;39(7):671–686. https://doi.org/10.1080/10715760500104025

34. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany. 2012;2012:21703. https://doi.org/10.1155/2012/217037

35. Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, *et al.* The hydroxyl radical in plants: From seed to seed. Journal of Experimental Botany. 2015;66(1):37–46. https://doi.org/10.1093/jxb/eru398

36. Druzhinina AS. Phlorotannins in Arctic brown algae. Cand. Sci. Chem. diss. Arkhangelsk: Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov; 2019. 120 p. (In Russ.). [Дружинина А. С. Флоротаннины арктических бурых водорослей: дис. … канд. хим. наук. Архангельск, 2019. 120 с.].

37. Shinkarev CM, Samujlenko AI, Grin SA, Neminuschiy LA, Skotnikova TA, Pavlenko IV, *et al.* Prospects for the development of microalgae production technology. Bulletin of the Technological University. 2017;20(14):146–149. (In Russ.). [Перспектива развития технологии производства микроводорослей / С. М. Шинкарев [и др.] // Вестник технологического университета. 2017. Т. 20. № 14. С. 146–149.]. https://www.elibrary.ru/WQMOEQ

38. Hasanova SR, Plehanova TI, Gashimova DT, Galiahmetova EH, Klysh EA. Comparative reseach of antioxydant activity vegetative gathering. Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. 2007;(1):163–166. (In Russ.). [Сравнительное изучение антиоксидантной активности растительных сборов / С. Р. Хасанова [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2007. № 1. С. 163–166.]. https://www.elibrary.ru/KWHQXL

39. Marques AEML, Balen RE, da Silva Pereira Fernandes L, Motta CM, de Assis HCS, Taher DM, *et al.* Diets containing residual microalgae biomass protect fishes against oxidative stress and DNA damage. Journal of Applied Phycology. 2019;31:2933–2940. https://doi.org/10.1007/s10811-019-01825-6

40. Ranga Rao A, Raghunath Reddy RL, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar GA. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010;58(15):8553–8559. https://doi.org/10.1021/jf101187k

41. Rahman NA, Khatoon H, Yusuf N, Banerjee S, Haris NA, Lananan F, *et al. Tetraselmis chuii* biomass as a potential feed additive to improve survival and oxidative stress status of Pacific white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. International Aquatic Research. 2017;9:235–247. https://doi.org/10.1007/s40071-017-0173-2

42. McKenzie CH, Bates SS, Martin JL, Haigh N, Howland KL, Lewis NI, *et al.* Three decades of Canadian marine harmful algal events: Phytoplankton and phycotoxins of concern to human and ecosystem health. Harmful Algae. 2021;102:101852. https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101852