



Проект «Наукова книга»

**С.С. СТЕПАНОВ,
В.М. МОКРОСНОП**

МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ ТА ЦІННІ РЕЧОВИНИ ВОДОРОСТЕЙ



НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ім. М.Г. ХОЛОДНОГО

•

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
M.G. KHOLODNY INSTITUTE OF BOTANY

S.S. STEPANOV, V.M. MOKROSNOP

METABOLIC
PROCESSES
AND VALUABLE
SUBSTANCES
OF ALGAE

*«SCIENTIFIC BOOK»
(YOUNG SIENTISTS)*

KYIV NAUKOVA DUMKA 2021

С.С. СТЕПАНОВ, В.М. МОКРОСНОП

МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ ТА ЦІННІ РЕЧОВИНИ ВОДОРОСТЕЙ

*ПРОЄКТ «НАУКОВА КНИГА»
(МОЛОДІ ВЧЕНІ)*

КИЇВ НАУКОВА ДУМКА 2021

У монографії описано метаболізм основних груп цінних для біотехнології речовин водоростей: антиоксидантів (флавоноїдів, токоферолів), каротиноїдів, полісахаридів, біоводню і нейтральних ліпідів. Наведено приклади використання водоростей у біотехнології, отримання основних груп цінних речовин. Описано метаболічні процеси, відповідальні за синтез окремих класів цінних речовин, охарактеризовано різноманіття біофлавоноїдів, токоферолів, нейтральних ліпідів і полісахаридів. Особливу увагу приділено отриманню «ідеального біопалива майбутнього» — біоводню. Описано використання методів генної інженерії з метою підвищення виходу цінних речовин.

Для широкого кола читачів, які цікавляться сучасним станом і перспективами використання водоростей у біотехнології, отриманням цінних продуктів їх метаболізму, а також для студентів за спеціальністю «біотехнологія» та спеціалістів, які вивчають метаболізм водоростей.

The monograph describes the metabolism of the main groups of algae substances valuable for biotechnology application: antioxidants (flavonoids, tocopherols), carotenoids, polysaccharides, biohydrogen and neutral lipids. Examples of the use of algae in biotechnology, obtaining certain groups of valuable substances are given. Metabolic processes responsible for the synthesis of certain classes of valuable substances, such as bioflavonoids, tocopherols, neutral lipids and polysaccharides has been characterized. Particular attention is paid to obtaining the «ideal biofuel of the future» — biohydrogen. The use of genetic engineering methods to increase the yield of valuable substances has been described.

For a wide range of readers who are interested in the current state and prospects of using algae in biotechnology, obtaining valuable products of their metabolism. Designed for students majoring in biotechnology and specialists who study the metabolism of algae.

Р е ц е н з е н т и:

доктор біологічних наук *Н.О. Білявська*,
кандидат біологічних наук *О.П. Ольхович*

*Рекомендовано до друку вченою радою
Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України
(протокол № 5 від 12.09.2019 р.)*

***Видання здійснено за кошти Цільової комплексної програми НАН України
«Наукові основи функціонування та забезпечення умов розвитку
науково-видавничого комплексу НАН України»***

Науково-видавничий відділ медико-біологічної, хімічної
та геологічної літератури

Редактор *Т.Л. Горбань*

© С.С. Степанов, В.М. Мокросноп, 2021

© НВП «Видавництво “Наукова думка”
НАН України», дизайн, 2021

ISBN 978-966-00-1786-3

ПЕРЕДМОВА

Для сучасного суспільства значення рослин складно переоцінити. Глобальне їх значення полягає в трансформації сонячної енергії фотонів в органічні сполуки у процесі фотосинтезу. Вперше «космічну» роль фотосинтезу і рослин популяризував К.А. Тімірязєв на початку ХХ ст. Особливістю водоростей, яка вирізняє їх серед інших представників царства рослин, є водне середовище існування. Традиційно водорості вважають предками наземних рослин, проте деякі сухопутні рослини у процесі еволюції повертались до водного середовища існування. У монографії описано представників еукаріотичних водоростей, для яких водне середовище є первинним. Фотосинтезувальні прокаріоти становлять окрему групу мікроводоростей.

У розд. 1 описано біорізноманіття водоростей, звертається увага на особливості пігментного складу, тип запасних полісахаридів та інші відмінності, за якими можна відрізнити водорості різних таксономічних груп. Описано основні напрями застосування біомаси водоростей у біотехнології. З технологічного погляду найпростішим є використання її в їжу людиною або як корм для тварин. Наведено опис способів промислового культивування мікроводоростей, їх переваги та особливості. Для отримання рідких або газоподібних видів палива з біомаси водоростей застосовують спеціальну обробку. Розглянуто особливості окремих процесів первинної та попередньої обробки біомаси мікроводоростей.

Сучасному стану досліджень добування водню з використанням водоростей присвячено розд. 2—4. Особливості метаболізму *Chlamydomonas reinhardtii*, які дають змогу удосконалювати процес утворення водню і ліпідних тілець у напрямі підвищення його ефективності, докладно описано у розд. 4—5. Історично склалося, що вперше процес утворення водню був помічений у *C. reinhardtii*. Ця мікроводорість є модельним об'єктом для генетичних, біохімічних і біотехнологічних досліджень, оскільки з нею легко працювати в лабораторних умовах. Вона швидко росте на простих мінеральних середовищах, має життєвий цикл із гаплоїдним геномом у вегетативних клітинах, тому ефекти мутацій виявляються відразу. Саме у цієї зеленої одноклітинної мікроводорості найдосконаліше вивчено метаболічні процеси, що впливають на ефективність утворення водню і ліпідних тілець.

Унікальність біохімічного складу водоростей полягає у здатності до синтезу та накопичення потенційно корисних для людини сполук. Полісахариди морських водоростей застосовують у різних галузях людської діяльності, що пов'язано з їхніми властивостями, які обумовлені середо-

вищем існування цієї групи організмів. У розд. 6 описано структуру і синтез запасних, структурних та екзополісахаридів різних груп водоростей, різноманіття структури сульфатованих полісахаридів і сфери їх застосування. Особливу увагу приділено сульфатованим полісахаридам, які входять до складу клітинних стінок морських водоростей. Парамілон є унікальним запасним полісахаридом, оскільки має висококристалічну структуру та біологічно активні властивості. Представники *Euglenophyceae* можуть накопичувати парамілон, наприклад мікроводорість *Euglena gracilis*, яка є перспективним продуцентом не тільки цього полісахариду, а й низки інших біологічно активних сполук.

У розд. 7 проаналізовано вплив умов культивування *Euglena gracilis* на накопичення парамілону в її клітинах і визначено найоптимальніші з них. Встановлено, що для збільшення вмісту полісахариду в біомасі мікроводорості в живильне середовище потрібно вносити екзогенний субстрат, для цього успішно використовують побічні продукти харчової промисловості та нетиповий для водоростей субстрат — етанол. Висвітлено перспективи застосування парамілону в фармакології та ветеринарії.

Вітамін Е забезпечує антиоксидантний захист не лише організмам, здатним до фотосинтезу, в клітинах яких відбувається його біосинтез, а й має бути наявним у щоденному раціоні людини. Токохроманолі рослинних клітин, а саме їх найактивніша ізоформа — α -токоферол — є молекулами з біологічною активністю вітаміну Е. Їх поділяють на дві групи: токоферолі і токотрієнолі, структура, синтез і функції яких у клітинах рослин докладно описано у розд. 8. У ньому розглянуто відомі на сьогодні способи підвищення вмісту α -токоферолу в рослинах-продуцентах вітаміну Е, де значну роль відіграють методи генної інженерії. На противагу створенню трансгенних рослин розвивається біотехнологія мікроводоростей, яка ґрунтується на модифікації умов культивування, спрямованих на накопичення біомаси культурою та активацію синтезу α -токоферолу в її клітинах.

У розд. 9 і 10 описано ще дві групи антиоксидантних молекул рослинних клітин: каротиноїди та поліфенольні сполуки. Розглянуто різноманітність каротиноїдів, їх синтез і фактори, що на нього впливають, функції у рослинних клітинах, способи застосування людиною, а також поліфенольних сполук мікро- і макроводоростей, їх функціональну роль. Особливу увагу приділено ролі поліфенолів у захисті водоростей від важких металів. Визначення антиоксидантної активності екстрактів водоростей має значення при проведенні експериментальних досліджень, воно може бути покладено в основу дослідження і використано для доповнення основних результатів. У розд. 11 наведено методи спектрофотометричного визначення антиоксидантної активності екстрактів водоростей.

Автори щиро вдячні науковому керівнику — доктору біологічних наук, професору Золотарьовій Олені Костянтинівні за слушні поради і рекомендації, які допомогли удосконалити і систематизувати матеріал, викладений у монографії.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДОРОСТЕЙ ТА ЇХ ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Термін «водорості» об'єднує гетерогенну групу фотосинтезувальних організмів, життєвий цикл яких пов'язаний з водним середовищем. Серед них є представники як Eukaryota, так і Prokaryota (ціанобактерії). Еволюція водоростей тісно пов'язана з еволюцією пластид. Представники ціанобактерій з погляду еволюції є окремими пластидами простої структури, що дали початок пластидам усіх інших еукаріотичних водоростей у процесі так званого первинного ендосимбіозу. Еукаріотичні водорості з'явилися 1,9 млрд років тому і в еволюційному аспекті значно молодші за ціанобактерії (2,7 млрд років) (Pulz, Gross, 2004). В результаті первинного ендосимбіозу еукаріотичної клітини з ціанобактеріальною архепластидою виникли еволюційні лінії еукаріотичних водоростей — червоні та зелені, що мають найбільше характерних особливостей. Водорості інших відділів виникли набагато пізніше внаслідок так званого вторинного ендосимбіозу, коли червоні або зелені водорості трансформувалися у пластиди всередині еукаріотичного хазяїна. Внаслідок цього процесу виникли гетероконтні водорості, динофлагеляти, криптофіти та евгленіди.

Традиційно водорості класифікують за забарвленням, яке зумовлено наявністю основних і допоміжних фотосинтетичних пігментів. За цим показником виокремлюють відділи — Cyanophyta (синьозелені водорості), Chlorophyta (зелені водорості), Rhodophyta (червоні водорості), Phaeophyta (бурі водорості) та ін. Далі буде наведено більш детальну класифікацію тих водоростей, що становлять найбільший інтерес для біотехнології.

Водорості не лише колонізують усі водні екосистеми, а й трапляються майже в усіх інших екологічних нішах, у тому числі в екстремальних умовах. Так, галофітна мікроводорість *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) здатна рости в навколишньому середовищі, майже насиченому хлоридом натрію. Кріофільні зелені водо-

рості, наприклад *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae), пристосовані до росту в умовах низьких температур, дефіциту основних макро- і мікроелементів, постійних циклів заморожування-відтавання та інтенсивного опромінення. В гарячих кислих водах живе червона водорість *Cyanidium caldarium* (Bangiophyceae), яка може рости, хоча і повільно, за рН ≈ 1 і температури до ~ 56 °С. Інші види водоростей віддають перевагу симбіотичному росту з тваринами або грибами. Так, одноклітинні зооксантели (Dinoflagellates), наприклад *Symbiodinium microadriaticum*, живуть симбіотично в гастродермісі рифових коралів. *Chlorohydra viridissima* (Hydrozoa) має яскраво-зелене забарвлення за наявності водоростей зоохлорел (*Chlorella* sp., Chlorophyta). Симбіоз між кораловими поліпами і водоростями найбільш поширений у тропічних водах, бідних на органічні речовини (Hallmann, 2015).

За розміром водорості поділяють на мікро- і макроводорості. Макроводорості можна бачити неозброєним оком, а мікроводорості — лише під мікроскопом. Лінійні розміри водоростей охоплюють вісім порядків і варіюють від крихітних одноклітинних до гігантських багатоклітинних організмів (рис. 1.1, див. вклейку). Найменша одноклітинна еукаріотична водорість *Ostreococcus tauri* (Prasinophyceae) має діаметр приблизно 1 мкм і є найменшим відомим вільноіснуючим еукаріотичним організмом, тоді як бура *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) (див. рис. 1.1), відома як «гігантська водорість», виростає до 60 м.

1.1. Прокаріотичні водорості

Відомо близько 2 тис. видів ціанобактерій, які поділяють на 150 родів. Представники цієї групи існують у найрізноманітніших екологічних нішах — від океанів до гірських хребтів та від гарячих джерел до поверхонь льодовиків. Оскільки морфологію і філогенетичну спорідненість ціанобактерій ще недостатньо вивчено, їх систематика часто змінюється і доповнюється. За морфологією, ціанобактерії поділяють на одноклітинні та нитчасті форми. Серед нитчастих форм виокремлюють гетероцистні та безгетероцистні. Гетероцисти — це спеціалізовані клітини, в яких відсутня друга фотосистема (ФС II), тому вони не продукують кисень у процесі фотосинтезу.

Такі особливості метаболізму гетероцист забезпечують оптимальні умови для фіксації атмосферного азоту. Фотосинтетичними пігментами є хлорофіл *a*, фікоціаніни і фікоеритрин, які за-

звичай надають клітинам синьо-зеленого забарвлення, хоча у деяких видів воно може бути червоно-коричневим і рожевим. Більшість ціанобактерій є облигатними фототрофами і лише кілька видів можуть рости міксотрофно або навіть гетеротрофно. Деякі планктонні ціанобактерії для отримання оптимальної сонячної радіації регулюють плавучість з використанням газових вакуолей, наприклад *Anabena flos-aquae*. Інші види виділяють позаклітинні полісахариди, кількість яких може становити до 30 % загальної кількості синтезованих полісахаридів і утворюють плавні агрегати. На твердій поверхні багато видів, кокцидних і нитчастих, здатних рухатись ковзанням, наприклад *Oscillariaceae*. Одна з причин, чому ціанобактерії часто посідають домінантне положення серед інших водоростей в екосистемі, — це їх здатність до надзвичайно швидкого поглинання і зберігання макроелементів: фосфати накопичуються в поліфосфатних гранулах, натомість азот, вуглець і енергія запасуються у ціанофіціні — полімері аспарагінової кислоти і аргініну. Розмноження відбувається поділом, тоді як статевий процес відсутній.

Ціанобактерії продукують низку біологічно активних речовин. Деякі з них є сильними гепатотоксинами або нейротоксинами і можуть становити серйозну загрозу здоров'ю населення, коли відбувається масове розмноження ціанобактерій в річках або у питній воді. Інші нетоксичні вторинні метаболіти можуть мати терапевтичне значення як противірусні засоби, імуномодулятори, інгібітори або цитостатики (Sivonen, Jones, 1999; Skulberg, 2000). В біотехнології нині широко використовують ціанобактерії *Spirulina (Arthrospira) platensis*, *Nostoc commune* і *Aphanizomenon flos-aquae*.

1.2. Еукаріотичні водорості

Chlorophyta (зелені водорості). Chlorophyta поділяють на чотири групи.

Prasinophyceae — джгутикові одноклітинні водорості, розмір клітин становить 10—15 мкм, покриті органічними лусочками. Більшість видів живе у солоних водоймах, проте трапляються і прісноводні види. Описано 13 родів і 120 видів цих зелених водоростей. *Tetraselmis*, *Pyramimonas* і *Micromonas* швидко ростуть, їх використовують у відкритих культурах як корм для риб і моллюсків (De Pauw, Persoone, 1988). У культурі, в умовах міксотрофного росту, деякі види можуть досягати великої концентрації клітин (Xie et al., 2001).

Chlorophyceae представляють найбільшу групу, яка налічує близько 4 тис. видів, 350 родів. Більшість видів — це одноклітинні або нитчасті прісноводні форми. Найвідоміші біотехнологічно цінні водорості, такі як *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella* і *Haematococcus*, належать до цієї групи. Деякі види за певних умов культивування накопичують високі концентрації каротиноїдів. Наприклад, *Dunaliella salina* використовують у промислових масштабах для отримання β -каротину (Enzing et al., 2014). Ще один перспективний каротиноїд — це астаксантин, його застосовують як високоцінне джерело пігментації в аквакультурі, особливо для форелі та лосося. Проведено дослідження з метою економічно вигідного отримання астаксантину з *Haematococcus pluvialis*, який здатний накопичувати до 3 % сухої маси астаксантину (Lorenz, Cysewski, 2000).

Ulvophyceae і Charophyceae представлено переважно макроскопічними водоростями. Жодну з їх одноклітинних або нитчастих форм не застосовують у біотехнології, хоча *Spirogyra* здатна продукувати біологічно активні речовини з бактерицидними властивостями.

Rhodophyta (червоні водорості). Червоний колір у водоростей зумовлений наявністю великої кількості біліпротеїнового пігменту фікоеритрину, тоді як синій відтінок пов'язаний з фікоціаніном. На відміну від зелених водоростей *Rhodophyta* накопичують крохмаль у цитозолі, а не у пластидах. Галактани з клітинних стінок *Rhodophyta* внаслідок їх желювальних властивостей були одними з перших речовин з водоростей, які почали застосовувати у промисловості. Типові родофіти є морськими макрофітами. Лише кілька видів належать до мікроводоростей, об'єднаних у підкласі Bangiophycidae. *Porphyridium cruentum* легко культивується на морській воді, не потребує вітаміну B_{12} , необхідного для більшості інших червоних мікроводоростей. Це одна з причин біотехнологічної привабливості видів *Porphyridium* для отримання арахідонової кислоти, пігментів (фікоціанін, фікоеритрин) і екзополісахаридів (ЕПС) (Borowitzka, 1997).

Euglenida. Євгленіди об'єднують рослинні й тваринні характеристики, їх відносять до відділу Kinetoplastida. Ця група виникла внаслідок вторинного ендосимбіозу між протистоподібним організмом і хлорелоподібною зеленою водорістю. Euglenida — дуже різноманітна та ізольована група, вміщує приблизно 1 тис. видів у 43 родах. Усі види представлено джгутиковими одноклі-

тинними організмами, часто вкритими еластичною клітинною стінкою, що дає змогу деяким видам здійснювати метаболічні (ковзні) рухи (наприклад, *Euglena*). Близько 70 % видів не містять фотосинтетичних пігментів, живляться гетеротрофно, при цьому утилізують органічні речовини. Навіть пігментовані види часто поєднують фотосинтез з орґано- або фаготрофним харчуванням і зазвичай інтенсивно розмножуються в евтрофічних стічних водах або у водоймах, забруднених органічними речовинами. Більшість *Euglenida* потребують складних середовищ для росту, тому їх складно культивувати в лабораторних умовах. Виняток — *Euglena gracilis*, яку можна вирощувати на мінімальному середовищі, тому її успішно використовують для масового промислового культивування. *Euglenida* перспективні для біотехнологічного застосування, оскільки вони продукують низку унікальних метаболітів. Наприклад, їх запасний парамілоновий крохмаль є β -1,3-поліглюканом із різнобічною біологічною активністю. Здатність до поглинання важких металів і висока толерантність до них, яку демонструють деякі евґленіди, також може бути застосована в біотехнології.

Hauprophyta. Гаптофіти, яких ще називають Prymnesiophyta, налічують приблизно 500 видів у 50 родах. Вони представлені джгутиковими або кокцидними одноклітинними організмами від жовто-зеленого до коричневого кольору, що зумовлено наявністю ксантофілів, переважно фукоксантину. Запасний полісахарид — хризоламіарин (розчинний β -1,3-поліглюкан). Гаптофіти здебільшого містяться в морському планктоні, але відомі також їх прісноводні та наземні форми. Деякі види є фаготрофними. Морські види часто спричиняють масове «цвітіння» води (наприклад, *Chrysochromulina* spp., *Emiliana* spp.), що негативно впливає на екосистему. Багато примнезіофітів виділяють значну кількість позаклітинних полісахаридів. Нині кілька видів примнезіофітів, наприклад *Pavlova lutheri* та *Isochrysis* spp., використовують як корм для молюсків, особливо устриць (Borowitzka, 1997).

Heterokonta. Організми цієї групи, які також називають Stramenopiles, переважно представлено водоростями. Назва «Heterokonta» походить від неоднакової довжини джгутиків їх генеративних клітин. Це так звана бура лінія в межах філогенезу водоростей, до складу якої входять бурі водорості (Phaeophyta), жовтозелені водорості (Xanthophyta), золотисті водорості (Chrysophyta) та діатомові водорості (Bacillariophyta). Їх переважно буре забарв-

лення зумовлене великим вмістом допоміжного фотосинтетичного пігменту — фукоксантину. Запасними речовинами є здебільшого хризоламінарин і ліпідні тільця цитоплазми.

Phaeophyta майже виключно представлено морськими макрофітами, що відрізняються наявністю пігменту фукоксантину, який надає їм оливково-коричневого відтінку (Cock et al., 2010). Налічують приблизно 1,5—2,0 тис. видів бурих водоростей. Деякі з них, такі як *Macrocystis pyrifera* (гігантські водорості), відіграють важливу роль в екосистемі, досягають в довжину 60 м і утворюють під водою «морські ліси». Багато видів вживається в їжу людиною, наприклад *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiformis* і *Laminaria japonica* (Fitzgerald et al., 2011). Як корм для тварин використовують кілька видів бурих водоростей, зокрема *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* і *Fucus vesiculosus* (Fleurence, 1999).

Eustigmatophyta і Xanthophyta тісно пов'язані філогенетично. Відомо приблизно 600 видів і більш ніж 90 родів цих жовтозелених водоростей. Більшість видів є одноклітинними або нитчастими, вони поширені переважно в наземних або прісноводних ареалах. Хоча деякі з них мають високі показники росту, лише *Olisthodiscus* і *Nannochloropsis* використовують як корм в аквакультурі (Borowitzka, 1997).

Chrysophyta представляють групу з майже 1 тис. видами, поділену на 120 родів. Більшість видів — це джгутикові одноклітинні водорості, що живуть як прісноводний планктон. Їх клітини можуть бути вкриті панциром із діоксиду кремнію. Хоча більшість видів здатні до фотосинтезу, в цій групі також доволі поширений міксотрофний ріст. Деякі види живляться переважно фаготрофно. В лабораторних умовах для забезпечення високого темпу росту більшості видів необхідним є додавання вітамінів, органічних поживних речовин або ґрунтових екстрактів.

Bacillariophyta, або діатомові водорості, ймовірно, є основними продуцентами біомаси на Землі та однією з наймолодших в еволюційному сенсі групою водоростей. Діатомеї колонізували майже всі місця проживання і диференціювались на велику кількість різноманітних видів. За приблизною оцінкою налічується як мінімум 10 тис. видів у 250 родах. Хоча деякі види утворюють псевдофіламентні або колоніальні агрегати, всі вони на вегетативній стадії представлені одноклітинними і безджгутиковими формами. Діатомеї легко розпізнати за клітинним покривом, що складається з двох силікатних пластин, з'єднаних між собою як

чашка Петрі, часто зі складною тонкою структурою. Їх основними запасними речовинами є хризоламінарин і ліпідні тільця, які можуть, особливо в умовах азотного голодування, становити до 60 % сухої маси речовини (наприклад, *Phaeodactylum tricorneratum*). Нейтральні ліпіди виконують не лише функцію акумуляції енергії: через зміну їх внутрішньоклітинного вмісту регулюється плавучість планктонних діатомей. У зв'язку з високою продуктивністю і здатністю накопичувати нейтральні ліпіди Bacillariophyta в майбутньому можуть становити значний інтерес для виробництва палива (біодизель) і незамінних жирних кислот. Особливою цінністю для біотехнології є великий внутрішньоклітинний вміст ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК) в діатомеях. Вони широко застосовуються також в аквакультурі (Borowitzka, 1997), переважно як корм для молюсків.

Dinoflagellata. Хоча ці джгутикові одноклітинні водорості представляють доволі велику групу, що налічує приблизно 4 тис. видів у 550 родах, про їх фізіологію та екологію відомо порівняно небагато. За наявними даними можна зробити висновок, що Dinoflagellata — це дуже різноманітна група з малою спорідненістю до інших водоростей. Вони населяють прісну і морську воду. Близько 50 % видів не здатні до фотосинтезу, а утилізують органічні сполуки або поглинають бактерії чи інші дрібні водорості. Навіть у фотосинтетично активних видів часто домінує міксотрофний ріст. Водночас особливо у прибережних водах динофлагеляти роблять суттєвий внесок у первинне продукування біомаси. Деякі види можуть бути потенційною загрозою рибному господарству і аквакультурі, оскільки вони виробляють надзвичайно шкідливі токсини. На відміну від останніх основним кормом для личинок риб у аквакультурі є види *Gymnodinium*. Крім ліпідних тілець і крохмалю динофлагеляти містять широкий спектр унікальних стеролів, жирних кислот (наприклад, докозагексанову — ДГК) та інших метаболітів, які мають високий потенціал для біотехнології. Однак культивування динофлагелят у лабораторних умовах супроводжується великими труднощами, тому що більшість видів потребують складного середовища культивування і спеціального світлового режиму або зазнають стрес під час перемішування середовища. Втім велика цінність певних сполук, таких як ДГК, може компенсувати вартість промислового масштабу вирощування.

1.3. Значення водоростей для біотехнології

Водорості містять унікальний комплекс необхідних організму людини компонентів. Їх клітини багаті на мікро- і макроелементи не лише кількісно, а й якісно. Історично у деяких регіонах певні види водоростей використовують у харчових цілях. Сьогодні в усіх країнах світу дозволено вживання в їжу такі види: *Arthrospira platensis*, *A. maxima*, *Chlorella vulgaris*, *C. pyrenoidosa*, *C. sorokiniana*, *Dunaliella salina*; регіонально дозволено: *Nostoc pruniforme* (у країнах Південно-Східної Азії), в США — *Aphanizomenon flos-aquae*.

На рис. 1.2 (див. вклейку) проілюстровано основні напрями раціонального використання біомаси мікроводоростей, яку отримують як при вирощуванні в промислових фотобіореакторах різного типу, так і збиранням водоростей з прісних і морських водойм.

Особливий інтерес становить використання мікроводоростей як організмів, здатних запасати енергію світла в результаті фотосинтезу, оскільки ефективність перетворення сонячної енергії у них значно вища, ніж у вищих рослин. Застосування фотосинтетичного принципу трансформації сонячної енергії для створення сучасної альтернативної енергетики привертає велику увагу через кризу традиційної невідновлюваної енергетики. Технологічна біоенергетика сьогодні розгортається переважно у двох напрямках: 1) переробка біомаси, яка накопичується в результаті фотосинтезу, на дешеве і висококалорійне паливо — метан, етанол, бутанол та ін.; 2) модифікація самого процесу фотосинтезу, внаслідок чого енергія світла з максимальною ефективністю спрямовується на утворення водню або іншого палива, обминаючи стадію фотоасиміляції CO₂ і синтезу компонентів клітини. Перспективними є розробки з використання фотосинтезувальних біосистем — біофотоелектричних перетворювачів енергії як первинного генератора електроенергії.

Біомаса мікроводоростей — це не лише відновлюване і майже безкоштовне джерело енергії, а й альтернатива використанню корисних копалин, запаси яких швидко зменшуються. Очевидно, що мікроводорості як джерело біопалива мають величезний потенціал, але водночас багато компаній, зокрема в США, переоцінили їх продуктивність і не змогли організувати рентабельне виробництво. Насправді, продуктивність водоростей в культурі не набагато вища, ніж у C4 рослин, проте їх промислова експлуа-

тація обмежена: стійке вирощування відібраних штамів у масштабах сотень гектарів потребує великих витрат енергії. Через негативний енергетичний баланс отримання біопалива з біомаси водоростей нині є занадто дорогим, щоб конкурувати з викопними видами палива.

Біодизель. Біодизель синтезують з триацилгліцеролів ліпідів, що отримують за екстракції з біомаси мікроводоростей. Триацилгліцероли складаються із трьох залишків жирних кислот, етерифікованих молекулою гліцеролу. За трансетерифікації, або алкохолізу, залишок гліцеролу замінюється на метильну групу. Цей процес відбувається поетапно, в результаті утворюються три молекули метильних етерів жирних кислот (FAME) і одна молекула гліцеролу. FAME є основою біодизеля, гліцерол — це високоцінний побічний продукт його виробництва. Для спрямування реакції етерифікації на синтез FAME потрібен великий надлишок метанолу (Chisti, 2008). Факторами, що перешкоджають промислому використанню мікроводоростей з метою отримання біодизеля, є недостатньо швидкий ріст мікроводоростей і низька щільність їх біомаси, а також затратний процес екстрагування ліпідів з останньої. Детальніше ліпіди мікроводоростей описано в розд. 5.

Біоетанол. З біомаси рослин отримують біоетанол шляхом переробки сільськогосподарських сортів вищих рослин з великим вмістом цукрів (цукрова тростина, цукровий буряк, сорго). У 2009 р. виробництво біоетанолу становило 73,9 млрд л, що в 4 рази вище, ніж у 2000 р. (Medipally et al., 2015). Мікроводорості розглядають як перспективну сировину для отримання біоетанолу в зв'язку з великим вмістом в їх біомасі полісахаридів і цукрів, а також малим вмістом лігніну і геміцелюлози. Деякі мікроводорості, наприклад види *Spirogyra* spp. і *Chlorococum* spp., містять багато полісахаридів як у клітинних оболонках, так і у вигляді крохмалю. Після попередньої фізичної обробки і екстракції або ферментативного гідролізу з біомаси отримують суміш моносахаридів. Далі за дріжджового бродіння з моносахаридів утворюється біоетанол. Його очищують перегонкою.

Біометан. Метан — важливий прекурсор, субстрат і побічний продукт хімічної промисловості, також його можна використовувати як паливо. Він перебуває в газоподібному стані, що ускладнює його зберігання і транспортування. З мікроводоростей методами газифікації, піролізу або анаеробного бродіння можна отримати біометан, переважно для цього застосовують біомасу

морських мікроводоростей. З неї у процесі анаеробного бродіння як побічний продукт утворюється також біогаз. У відсотковому відношенні він складається з метану (55—75 %) і CO₂ (25—45 %).

Їжа для людей. Перша достовірна згадка про споживання водоростей *Nostoc* датована початком нашої ери у стародавньому Китаї в період голоду (Spolaore et al., 2006). Споживання водоростей згадується у IV ст. н. е. в Японії та у VI ст. н. е. в Китаї. Перше письмове посилання про збір «норі» датовано 530 р. н. е. У XVII ст. в Японії почали використовувати водорості родів *Chondrus*, *Gelidium* і *Gracilaria* для отримання агароподібних продуктів харчування. З бурих водоростей *Laminaria*, *Macrocystis* і *Fucus* у XIX ст. екстрагували соду та йод. Їстівні синьозелені водорості (*Nostoc*, *Arthrospira* і *Aphanizomenon*) використовують у багатьох країнах Азії та Африки як вітамінні добавки. Нині мікроводорості є переважно дієтичним компонентом, а не окремим продуктом харчування. На сьогодні головною країною-експортером їстівних водоростей є Китай — 5 млн т вологої біомаси на рік. Масштаб світового виробництва дорівнює 13 млн т на рік. Основний об'єм становить біомаса *Laminara* (переважно *L. japonica*), на другому місці — продукти з біомаси червоної макроводорості *Porphyra* («норі»). Також їстівними вважають водорості родів *Undaria*, *Kappaphycus*, *Gracilaria*, *Euclima*, *Monostroma*, *Ulva*, *Hizikia*, *Chondrus*, *Caulerpa*, *Alaria*, *Palmaria*, *Callophyllis* і *Cladophoron*.

БАДи та нутрицевтики. У зв'язку з великим вмістом антиоксидантів у біомасі деяких мікроводоростей з неї отримують оздоровлювальні біологічно активні добавки. Так, джерелом астаксантину переважно є біомаса *Haematococcus pluvialis*, хоча можна використовувати також *Chlorella vulgaris* і *Coelastrella striolata*. β-Каротин, кантаксантин і лютеїн екстрагують з біомаси *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Coelastrella striolata* і *Scenedesmus almeriensis*. Омега-3 ненасичені жирні кислоти, ейкозапентаєнову (ЕРА) і докозагексаєнову (ДНА) кислоти отримують із представників родів *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Schizochytrium* і *Cryptocodinium*.

Корм для тварин. З XX ст. водорості почали масово використовувати у рибних господарствах як живий корм. Мікроводорості слугують кормом на всіх стадіях розвитку двостулкових молюсків (устриці, морські гребінці, мідії), а також для личинок ракоподібних та іншого зоопланктону. Культури мікроводоростей, які згодують тваринам, повинні відповідати певним вимогам: швидко

рости і при цьому не змінювати властивості водного середовища, мати оптимальний розмір для поїдання зоопланктоном, не містити токсинів, мати потрібний спектр поживних речовин і мікроелементів, а також високу біодоступність при перетравленні. Види, що відповідають таким вимогам, відомі серед Bacillariophyta (*Nitzschia closterium*, *Chaetoceros* spp., *Thalassiosira pseudonana*, *Navicula* spp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Amphora* spp., *Skeletonema costatum*, *Cocconeis* spp.), Chlorophyta (*Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloris atomus*, *Pyramimonas* spp., *Tetraselmis* spp.), Cryptophyta (*Rhodomonas* spp., *Chroomonas salina*), Haptophyta (*Isochrysis* spp., *Pavlova* spp.) і Eustigmatophyta (*Nannochloropsis oculata*). В прибережних районах, де макроводорості виносить на берег, їх використовують як корм для великої рогатої худоби, овець і коней. Також застосовують порошок із макроводоростей *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata* і *Alaria esculenta* як вітамінну добавку до основного раціону. Крім макроводоростей цінні харчові добавки для тварин (коти, собаки, акваріумні рибки, декоративні птахи, коні, птиці, корови і племінні бики) отримують із представників родів мікроводоростей *Arthrospira* і *Chlorella*.

Токсини. З 60 тис. існуючих видів водоростей лише декілька сотень здатні продукувати токсини, які привертають увагу дослідників фармацевтичних компаній у зв'язку з можливістю їх використання як ліки або діагностичні препарати. Більшість водоростей, що продукують токсини, належить до таксономічних груп Cyanobacteria, Haptophyta, Dynophyceae (Myzozoa). Токсини ціанобактерій здатні спричинювати такі проблеми зі здоров'ям, як алергічні реакції на шкірі, респіраторні або неврологічні захворювання, мати канцерогенну дію. Токсичні речовини забруднюють питну воду, щоб цього уникнути, необхідно використовувати швидкі та надійні методи їх виявлення. Також токсини водоростей можна застосовувати як протигрибкові та антимікробні засоби.

Фармацевтичні препарати і косметика. Продукти з мікроводоростей використовують у косметичці як згущувачі, зволожувальні речовини і антиоксиданти (Barsanti et al., 2014). Вони входять до складу кремів, що запобігають старінню та віковим змінам шкіри, засобів для зволоження і регенерації, від засмаги і як пом'якшувачі та антиподразники у пілінгах (Barsanti et al., 2014). Екстракти з деяких водоростей проявляють бактерицидну і фунгіцидну дію, що використовують виробники косметичних препаратів і засобів догляду за шкірою. Такі екстракти застосовують

переважно як консерванти для запобігання їх негативного впливу на природну мікрофлору шкіри. Продукти з мікроводоростей можуть бути корисними при різноманітних проблемах шкіри: вікових змінах, надмірному лущенні чи порушенні пігментації. Позитивний ефект при лікуванні шкіри зумовлений наявністю таких продуктів мікроводоростей: карагенан або подібні полісахариди, протеїни чи ліпіди, вітаміни А, Е, В₁, залізо, фосфор, кальцій, мідь, магній. Виробники косметичної продукції стверджують, що компоненти мікроводоростей запобігають вільнорадикальному окисненню колагену і гіалуронової кислоти у складі шкіри і цим самим омолоджують її. Проте досі такий ефект не підтверджений клінічними дослідженнями або позитивні результати отримані на тваринах. У косметичці використовують *Chondrus crispus*, *Mastocarpus stellatus*, *Laminaria* spp., *Porphyra* spp., *Ulva lactuca*, *Ascophyllum nodosum*, *Alaria esculenta*, *Arthrospira platensis*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*.

Добрива. Бурі макроводорості вже сотні років використовують з метою підвищення родючості прибережних земель, але транспортування їх вологої біомаси вглиб материка економічно не вигідно. Натомість застосовують висушені макроводорості для розпушування ґрунту та як добриво у сільському господарстві та садівництві. На сьогодні суспензії та екстракти водоростей використовують ширше, ніж не оброблену біомасу чи порошок із водоростей. Екстракти в концентрованій формі зручніше транспортувати, також вони мають вищу біодоступність і швидше абсорбуються рослинами.

Біоремедіація. У процесі первинного і вторинного очищення стічних вод у відстійниках відбуваються видалення осаду і окиснення органічних речовин. Потім вода надходить у водойми здебільшого без подальшої обробки. За використання мікроводоростей можна здійснити третинне очищення води і поєднати цей процес з отриманням біомаси (Bohutskyi et al., 2015). Такий спосіб очищення води найбільше підходить для країн із високою інсоляцією на одиницю поверхні. Основні забруднювачі — це сполуки нітрогену і фосфору в різноманітній хімічній формі, саме ці макроелементи підтримують ріст мікроводоростей. Крім утилізації забруднень водорості також здатні поглинати органічний вуглець за їх міксотрофного росту. Мікроводорості, які застосовують для очищення стічних вод, адаптуються до різноманітних за складом і властивостями середовищ культивування (Bohutskyi et al., 2015). Найтолерантніші до середовища види з

родів *Euglena*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Stigeoclonium* (Bohutskyi et al., 2015). Макроводорості *Ulva* spp. і *Monostroma* spp. можуть зменшувати вміст азоту і фосфору в стічних водах.

Абсорбція і адсорбція важких металів. У стічних водах знаходять високі концентрації важких металів. Продемонстровано, що живі мікроводорості чи сорбенти, отримані з їх біомаси, здатні абсорбувати їх із водних розчинів (He et al., 2014). Водорості здатні абсорбувати іони міді, нікелю, хрому, цинку та кадмію. Встановлено, що бура макроводорість *Ascophyllum nodosum* на відміну від червоних або зелених добре абсорбує з розчинів такі важкі метали, як кадмій, нікель і цинк. *Laminaria*, *Sargassum*, *Macrocystis*, *Ecklonia*, *Ulva*, *Lessonia* і *Durvillaea* також здатні поглинати важкі метали із середовища культивування. Найкращими кандидатами для промислового застосування є види еукаріотичних водоростей: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* spp., *Chlorococcum* spp. і *C. reinhardtii*, а також ціанобактерій *Lyngbya spiralis*, *Tolypothrix tenuis*, *Stigonema* spp., *Phormidium molle*, *Aphanothece halophytica*, *Chroococcus parisi* і *Arthrospira* (Kumar et al., 2015).

Мікроводорості як біосенсиори забруднення і токсинів. Біосенсиори складаються з біологічного компонента (рецептора), який у процесі взаємодії з навколишнім середовищем передає сигнал трансдуктору, в результаті можна оцінити ступінь забруднення навколишнього середовища. Ідеальні біосенсиори мають бути специфічними, швидко реагувати та здатними до багаторазового використання. Існує два основних типи біосенсорів: на основі окремих компонентів клітин (деякі ензими, антитіла) і активності живих клітин. Порівняно з окремими біомолекулами другий тип стійкіший до умов навколишнього середовища, оскільки всередині клітини ензими захищені від негативного впливу. З використанням живих культур мікроводоростей можна визначати ступінь забруднення водного середовища. Хоча забруднювачі, а також токсини різноманітної хімічної природи можна виявити цим методом, проте їх застосовують переважно для встановлення наявності гербіцидів. Наприклад, одноклітинну зелену мікроводорість *Dunaliella tertiolecta* і діатомову водорість *Phaeodactylum tricorutum* успішно залучають для визначення основних гербіцидів: артазину, діурону, гліфосату (Durrigau et al., 2011). У разі мікроводоростей часто використовують флуоресценцію хлорофілу або позаклітинну ензиматичну активність, наприклад естеразну, для чого користуються кондуктометричними і оптичними мето-

дами. Крім суспензії клітин біосенсори також можуть бути представлені живими клітинами, іммобілізованими на альгінаті чи силікагелі. Для іммобілізації найчастіше застосовують мікроводорості *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlamydomonas reinhardtii*.

Біоводень. Біологічне отримання водню (H_2) як палива досі знаходиться на рівні пошукових розробок. Це абсолютно чисте паливо, у процесі згорання якого утворюється лише H_2O , характеризується виключно високою тепловою ємністю. Промислові способи отримання водню не є економічними, тому використання мікроорганізмів, спроможних виділяти його, вивчають як раціональну альтернативу. Деякі мікроводорості здатні до світлозалежного виділення водню під час біофотолізу H_2O . Такий спосіб отримання водню є екологічно чистим, оскільки мікроорганізми продукують його з H_2O . Процес відбувається за участю гідрогенази або нітрогенази. Мікроводорості можуть виділяти водень після анаеробної адаптації. За участю гідрогенази початкові швидкості виділення водню близькі до швидкості фотосинтезу, проте одночасно з воднем мікроводорості здатні продукувати O_2 , який токсичний для ключового ферменту виділення H_2 — гідрогенази. Внаслідок накопичення кисню активність гідрогенази знижується, і через нетривалий час (залежно від умов експерименту 10—1000 с) виділення H_2 припиняється. Отже, для отримання помітних кількостей H_2 необхідно постійне видалення із середовища культивування O_2 , що утворюється у процесі фотосинтезу.

У 2000 р. американські вчені запропонували спосіб істотно (до кількох діб) збільшити тривалість процесу виділення H_2 . З цією метою культури мікроводоростей вирощували на безсірковому середовищі. За останні 18 років цим методом скористались у десятках лабораторій світу, що дало змогу суттєво розширити розуміння механізмів процесу виділення H_2 мікроводоростями. Однак для практичного використання такого способу отримання H_2 потрібно вирішити низку фундаментальних проблем: від збільшення швидкості процесу, підвищення його стабільності до підтримання культур мікроводоростей в активному (продуктивному) стані. Серед них — проблема використання прісної води, ресурси якої на Землі не безмежні. В разі практичного застосування фотовиділення водню мікроводоростями цей процес неминуче вступить у конкуренцію з іншими процесами, які потре-

бують прісної води, — від споживання води людством до сільського господарства. Водночас на Землі існують практично невичерпні запаси морської води, тому активно вивчається можливість виділення H_2 морськими мікрободоростями, здатними до синтезу гідрогеназ і світлозалежного виділення H_2 в кількостях, порівняних із прісноводними видами.

Серед представників Chlorophyta, які продукують H_2 , найбільшу увагу приділяють *Chlamydomonas reinhardtii*. Як модельну систему *Chlamydomonas* широко використовують у дослідницьких лабораторіях для вивчення різних аспектів фотосинтезу. Ця одноклітинна водорість за сприятливих умов швидко росте, здатна подвоювати біомасу кожні 6 год, водночас не потребує значних зусиль і складних живильних середовищ для підтримки росту. *C. reinhardtii* синтезує дві практично ідентичні за будовою високоактивні [FeFe]-гідрогенази HYDA1 і HYDA2, з яких лише HYDA1 відіграє ключову роль у виділенні H_2 . У розд. 2—4 процес отримання біоводню описано детальніше.

Біологічно активні речовини водоростей. Організми з оксигенним фотосинтезом продукують широкий спектр сполук, які захищають метаболічні процеси від шкідливого впливу вільних радикалів, що утворюються в редокс-процесах, локалізованих у хлоропластних і мітохондріальних мембранах. Реакційно-активні форми кисню (АФК), такі як гідроксильні, супероксидні, пероксильні радикали, утворюються в рослинних клітинах при освітленні у процесі фотосинтезу. Проте водорості рідко зазнають серйозних фотодинамічних ушкоджень під час метаболізму, оскільки їхні клітини мають захисні механізми і антиоксиданти. Вживання рослинних продуктів з великим вмістом антиоксидантних компонентів має захисну і профілактичну дію на організми тварин і людини.

Відомими антиоксидантами є водорозчинний вітамін С і жиророзчинний вітамін Е (токоферол). У природі синтез вітаміну Е забезпечують лише фотосинтезувальні організми — рослини, еукаріотичні та прокаріотичні водорості. З огляду на хімічну реактивність і діючі концентрації α -токоферолу можна стверджувати, що він є найважливішим природним ліпофільним антиоксидантом *in vivo*. Токофероли, локалізовані в мембранах клітинних органел, максимально захищають від вільних радикалів, що окиснюють поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) та інші компоненти мембран. Види мікрободоростей, здатних до акумуляції токоферолів, — *Spirulina platensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *D. salina*,

Synechocystis sp., *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica*, *Englena gracilis*, *Isochrysis galbana*, види *Chlorella*, *Clamydomonas* і *Ochromonas*. Окремі штами прісноводної мікроводорості *E. gracilis* і морської мікроводорості *D. tertiolecta* продукують α -токоферол у вищих концентраціях, ніж у продуктах, які традиційно використовують як джерела вітаміну Е.

Серед антиоксидантів з вираженою активністю знаходяться також фенольні сполуки. Фенольна сполука — це низка молекул, локалізованих у живих організмах, які у структурі мають бензольне кільце, заміщене принаймні на одну гідроксильну групу. Зазвичай вони наявні в рослинах, у тому числі в морських водоростях. Поліфеноли — різноманітний клас сполук, до якого належать флавоноїди (флаволи, флаванони, флавоноли, халкони і флаван-3-оли), лігніни, дубильні речовини і фенольні кислоти.

За останні роки зросла увага до нових джерел природних антиоксидантів і антимикробних препаратів з метою зменшення використання синтетичних аналогів, таких як бутильований гідроксіантолан (ВНА) і бутильований гідрокситолуол (ВНТ). Природні антиоксиданти рослинного походження можуть швидко нейтралізувати вільні радикали і уповільнювати або зменшувати ступінь окисного ушкодження. Крім того, їх застосовують також для консервації харчових продуктів. Таніни — клас природних рослинних поліфенольних сполук, поширених серед морських водоростей. До їх складу входять галова або елагова кислоти, які легко гідролізуються в кислих середовищах. На відміну від дубильних речовин наземних рослин флоротаніни є сполуками танінів, які знайдені лише в морських водоростях. Вони утворюються у процесі полімеризації мономерної ланки — флороглюцинолу (1, 3, 5-тригідроксибензол) і синтезуються ацетатно-малонатним шляхом у морських водоростях. Флоротаніни з бурих водоростей мають до восьми взаємозв'язаних ароматичних кілець, тому вони є більш потужним поглиначем вільних радикалів, ніж інші поліфеноли, отримані з наземних рослин, наприклад катехинів зеленого чаю, які мають від трьох до чотирьох бензольних кілець.

Фенольні сполуки є важливим компонентом захисту рослин проти бактеріального ураження та інших видів екологічного стресу, таких як поранення, надмірне світлове або ультрафіолетове (УФ) опромінювання. Останнім часом зростає увага до натуральних, мінімально оброблених якісних продуктів, з великим вмістом антиоксидантних сполук. За умов дотримання технологічних регламентів цим вимогам, безперечно, відповідають макро- і мікроводорості.

1.4. Промислове культивування водоростей

Масове культивування водоростей для промислових цілей здійснюють переважно відкритим способом (у природних або штучних водоймах) чи у закритих фотобіореакторах із контрольованими умовами (Carvalho et al., 2006; Posten, 2009; Chen et al., 2011; Wang et al., 2014). Відкритим способом водорості культивують у штучних водоймах або резервуарах без перемішування чи з перемішуванням у разі круглих або звивистих озер (рис. 1.3). Відкриті плоскі озера без перемішування найекономічніші та водночас найменш продуктивні для отримання біомаси водоростей. У круглих озерах перемішування водоростей забезпечує центральний ротор, тоді як у звивистих резервуарах цей процес здійснюють з використанням веслоподібного рухомого елемента. Озера для промислового культивування мають площу поверхні приблизно від 1,0 до 200 га (в разі культивування *Dunaliella salina*). До недоліків культивування водоростей відкритим способом відносять:

- не контрольовані умови росту, які нерідко залежать від погодних умов;
- здатність до контамінації сторонніми організмами, що часто негативно впливає на ріст культури;
- заборона в деяких країнах культивування генетично модифікованих водоростей відкритим способом.

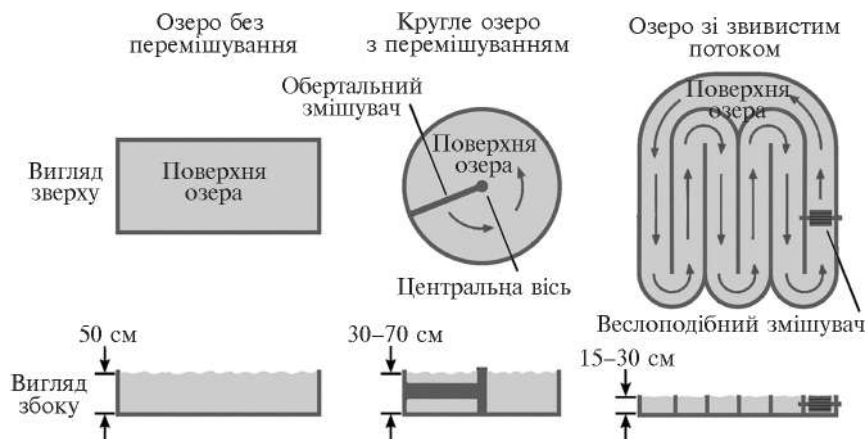


Рис. 1.3. Приклади промислового культивування водоростей відкритим способом (Hallmann, 2015)

Середньорічні рівні накопичення біомаси навіть у найпродуктивніших культур за умови вирощування відкритим способом становлять не більш як $1 \text{ г м}^2/\text{год}$. Це у кілька разів менше, ніж продуктивність кукурудзи, цукрової тростини або тих самих водоростей в закритих фотобіореакторах. Обмеження росту мікробіореакторів в неконтрольованих умовах пов'язують з ефектом світлового насичення, флуктуацією зовнішніх умов протягом дня, контамінацією культури і неоптимальним газообміном.

Біопродуктивність водоростей значно зростає в разі дотримання оптимальних параметрів вирощування у спеціально сконструйованих закритих біореакторах, основними перевагами яких є:

- вони дають змогу контролювати параметри росту, а також потоки газу і рідини в реакторі;

- у сучасних фотобіореакторах освітлення культур здійснюється світлодіодами в імпульсному режимі, воно оптимізовано не лише спектрально, а й за розподілом у часі, що може забезпечити усереднене опромінювання, постійне протягом доби. При цьому світло просторово рівномірно розподіляється на поверхні або всередині фотобіореактора. У сучасних моделях світловий потік, який насичує фотосинтез, становить зазвичай $\sim 200\text{--}400 \text{ мкмоль фотонів}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$, що запобігає фотоінгібуванню;

- термін служби світлодіодів — близько 100 тис. год;

- фотобіореактори можна розміщувати у пустелях, а сонячну енергію використовувати як для виробництва необхідної електроенергії, так і для вирощування водоростей. На непридатних для землеробства ділянках заводи з виробництва біомаси водоростей не витісняють родючі сільськогосподарські культури;

- здатність не лише до фотоавтотрофного, а також міксотрофного і гетеротрофного росту, наприклад за додавання глюкози або органічних кислот (Chen, 1996; Gim et al., 2014). Міксотрофне і гетеротрофне культивування має значно більшу продуктивність порівняно з фотоавтотрофним, такий ріст ефективніший в плані отримання багатьох цінних речовин із мікробіореакторів, таких як ПНЖК і каротиноїди (Gim et al., 2014). Недоліками гетеротрофних або міксотрофних культур є збільшення витрат енергії (додаткові витрати в результаті додавання органічного субстрату), ризик контамінації сторонніми організмами, потенційна можливість гальмування росту надлишком органічного субстрату, відсутність або знижена здатність синтезувати цінні речовини, які утворюються за умови освітлення і, нарешті, той факт, що лише незначна кількість водоростей є факультативни-

ми гетеротрофами, більшість видів мікробіодоростей — облигатні фотоавтотрофи) (Gim et al., 2014).

Із сучасних досягнень у сфері культивування водоростей в біореакторах увагу привертає розробка послідовного фотоавтотрофно-гетеротрофного способу культивування (Zhou et al., 2012; Moheimani et al., 2015). При цьому мікробіодорості спочатку культивують у фотоавтотрофних умовах, а потім змінюють спосіб живлення на гетеротрофний. Існують також циклічні фотоавтотрофно-гетеротрофні способи культивування: у світлу пору доби водорості культивують фотоавтотрофно з використанням сонячного освітлення, а в темну — гетеротрофно з додаванням в культуру необхідної кількості органічного субстрату (Moheimani et al., 2015). Вибір способу культивування залежить від виду водорості, цінного продукту, що можна отримати з її біомаси, а також від деяких інших ситуаційних факторів.

Продуктивність біореакторів залежить від кількості контрольованих ним параметрів росту водоростей. У фотобіореакторах, в яких ріст водоростей відбувається в результаті фотосинтезу і фіксації CO_2 , особливу увагу приділяють способам оптимізації освітлення їх робочої поверхні (Monkonsit et al., 2011; Croze et al., 2013). Середнє значення відношення поверхні до об'єму в фотобіореакторах становить $80\text{--}100\text{ м}^2/\text{м}^3$ (Posten, 2009). Найпоширеніші їх типи — плоскі, циліндричні, кільцеві й трубчасті реактори (рис. 1.4) (Posten, 2009). У плоских, циліндричних і кільцевих фотобіореакторах перемішування і аерація культури пов'язані з висхідним потоком бульбашок повітря. В кільцевих фотобіореакторах система аероліфта забезпечує циклічне перемішування середовища культивування (Monkonsit et al., 2011) або

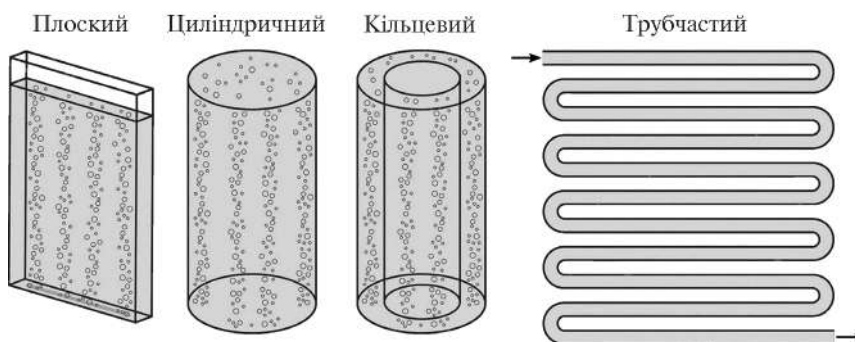


Рис. 1.4. Основні типи сучасних фотобіореакторів (Hallmann, 2015)

це відбувається механічно із застосуванням насоса (Zhang, 2013). Трубчасті реактори можуть бути розміщені вертикально, горизонтально площині або під нахилом. Перемішування і аерація в них також може здійснюватись з використанням повітряного насоса або системи аероліфта. Відомі деякі інші типи реакторів і модифікації трубчастого реактора: реактори на основі плівки (поліетиленові або полівінілхлоридні ємності), скляні ферментери, реактори зі спіральним потоком, конусоподібні біореактори, реактори типу «водяний матрац» (Solix) та ін.

1.5. Збір біомаси водоростей

За фотоавтотрофного росту мікроводорості накопичують значно менше біомаси на одиницю об'єму середовища культивування порівняно з міксотрофним або гетеротрофним ростом. Так, за відкритого способу культивування у штучних водоймах, який найчастіше використовують для промислового виробництва, концентрація біомаси зрідка перевищує 0,5 г/л (Venemann, 2013). Цей показник значно нижчий, ніж у культурах бактерій, дріжджів і гетеротрофних мікроводоростей (наприклад, *Schizochytrium* або *Scurthecodinium*), в яких концентрація біомаси може становити 100 г/л (Ganuza et al., 2008). У зв'язку з цим потрібно більші об'єми автотрофних культур для отримання однакової кількості біомаси з гетеротрофними культурами мікроводоростей або іншими мікроорганізмами. Під час збору біомаси зазвичай необхідно отримати пасту мікроводоростей з вмістом сухої речовини близько 20 %, або 200 г/л. Оскільки концентрація культури становить лише 0,5 г/л, її концентрують у 400 разів. Щоб досягти такого результату, використовують комбінації відразу кількох методів збору біомаси (Pahl et al., 2013): седиментацію, флокуляцію, флотацію, фільтрування та центрифугування. Вибір конкретного методу визначається специфікою мікроводорості. В разі промислового застосування способи збору мають бути енергоефективними і малозатратними.

Вимоги до способів збору біомаси. Технології збору біомаси мають забезпечувати переробку значних об'ємів культури і при цьому залишатись низьковартісними і енергоефективними, не впливати на подальше використання біомаси, особливо на вживання мікроводоростей в їжу. Особливості штамів мікроводоростей — розмір їх клітин, наявність ЕПС, здатність до секреції органічних речовин у середовище культивування — визначають

перелік технології збору біомаси, які можна застосовувати в кожному конкретному випадку. Підготовка середовища культивування мікроводоростей потребує значної затрати води. Способи збору біомаси мають сприяти повторному використанню води, тобто запобігати її забрудненню. Фільтрацію часто застосовують для збору біомаси з можливістю подальшого використання середовища культивування, при цьому клітини меншого, ніж пори фільтрів, розміру забезпечують його повторну інокуляцію після збору біомаси (Bull, Collins, 2012).

Осідання мікроводоростей за дії їх власної маси — найпростіший і найдешевший спосіб, проте він досить повільний, кінцева концентрація мікроводоростей низька. Його застосовують лише для видів мікроводоростей зі щільними нерухомими клітинами.

Флокуляція. В процесі флокуляції окремі клітини мікроводоростей об'єднуються з утворенням великих агрегацій (флокулятив), які надалі концентрують осадженням або фільтрацією. Спонтанній флокуляції клітин мікроводоростей перешкоджає негативний заряд на поверхні їх клітинної оболонки, обумовлений наявністю карбоксильних груп у складі полісахаридів ($pK_a = 4-5$). У середовищі культивування він нейтралізується позитивно зарядженими іонами металів. Флокуляція відбувається при заміщенні таких іонів сполуками, які здатні утворювати містки між окремими клітинами. Її можна досягти фізичними, хімічними, біологічними методами, а також за умови використання генетично трансформованих штамів мікроводоростей. Також флокуляція може відбуватись спонтанно в культурах мікроводоростей за зростання рН середовища культивування ($pH \sim 9$) у зв'язку зі зменшенням вмісту CO_2 у середовищі культивування та в результаті активного фотосинтезу. За зміщення рН у лужні значення кальцій може випадати в осад у вигляді $CaCO_3$ або $CaPO_4$, а магній — $MgHPO_4$. Адсорбція осаду на поверхні клітин забезпечує їх флокуляцію.

Для хімічної флокуляції використовують солі металів ($AlCl_3$, $MgCl_2$, $FeCl_3$), при цьому утворюються агрегати з окремих клітин мікроводоростей. Проте доволі висока концентрація солей металів залишається в біомасі, а їх видалення збільшує вартість кінцевого продукту. Також застосовують синтетичні полімери поліакриламід, що містять токсичний акриламід як домішку, тому більш екологічні природні біополімери, такі як хітозан або полі- γ -глутамінова кислота. Хітозан — дорогий біополімер для індук-

ції флокуляції у зв'язку з його використанням у медицині. Дешевші катіонний крохмаль або танфлок — крохмаль чи танін з амонієвими групами (Roselet et al., 2016). Недолік способів флокуляції за участю полімерів полягає в тому, що вони не ефективні у розчинах з високою іонною силою і тому їх не можна застосовувати для осадження мікроводоростей, відмінних від прісноводних (Vandamme et al., 2013).

Осадження біомаси водоростей можна досягти і фізичним впливом, наприклад за дії ультразвуку. Ультразвукову флокуляцію не застосовують у промислових масштабах, оскільки ультразвук погано проникає в товщу культури і впливає лише на невеликий її об'єм. Різновид фізичної флокуляції — електрофлокуляція, опосередкована електрофоретичним вивільненням іонів металів з електрода, тому вона подібна до хімічної флокуляції за участю солей металів. Для морських мікроводоростей це є найекономічнішим способом збору біомаси.

Флокуляція мікроводоростей відбувається також з використанням магнетитових наночастинок (Fe_2O_3), що адсорбуються клітинною оболонкою мікроводоростей. Це дає змогу здійснювати як флокуляцію, так і сепарацію мікроводоростей за дії магнітного поля (Vandamme et al., 2013). Для біологічної флокуляції використовують окремі флокуляційні види з метою осадження промислово цінного виду мікроводоростей, ним можуть бути інша мікроводорість, бактерія чи грибок, які культивують окремо або разом із біомасою мікроводоростей. Бактерії здатні індукувати флокуляцію мікроводоростей секретією полімерів в середовища культивування (Oh et al., 2001), філаментні грибки також мають таку властивість. Механізм цього процесу вивчений недостатньо. Здатність до флокуляції можна досягти генетичною трансформацією мікроводоростей. Флокуляція за генетичної трансформації відбувається при змішуванні або різних видів, які мають рецептори на поверхні одних і відповідні ліганди на поверхні інших клітин, або одного виду, що містить на клітинній оболонці як рецептори, так і ліганди (Vandamme et al., 2013). Проте в багатьох країнах генетично модифіковані мікроводорості можна культивувати лише закритим способом.

Наступним кроком збору біомаси мікроводоростей є подальше згущення осаду культури в результаті осідання за впливу гравітації або центрифугуванням. Швидкість осідання клітин мікроводоростей за дії сили тяжіння (седиментація) досить незначна (~1 см/год) у зв'язку з невеликими розмірами самих клітин та їх

густиною, близькою до густини води. Концентрування біомаси методом седиментації застосовують для великих мікрободоростей або здатних утворювати багатоклітинні агрегати. Наприклад, в ізраїльській компанії «Альготех» («Algatech») його використовували для збору біомаси *Haematococcus* з метою отримання астаксантину. Однак процес був занадто повільний, в результаті чого погіршувалась якість біомаси, тому був замінений на центрифугування. Седиментацію застосовують для концентрування нитчатої ціанобактерії *Arthrospira*, яку культивують з метою отримання глікогену. Оскільки клітини мікрободорості здатні накопичувати його до 50 %, за нестачі азоту вони мають велику щільність і швидко осідають (64 см/год), тому для них придатний метод гравітаційної седиментації (Depraetere et al., 2015).

У процесі пропускання бульбашок повітря через товщу культури клітини мікрободоростей спливають з утворенням плівки, такий спосіб збору біомаси називають флотацією. Ним можна швидко концентрувати біомасу, проте він підходить не для всіх видів мікрободоростей. Під час електрофлокуляції у середовище культивування виділяються іони алюмінію або заліза, одночасно H_2O відновлюється з утворенням бульбашок кисню та водню. В результаті відбуваються флокуляція і флотація клітин мікрободоростей, які при цьому спливають на поверхню і утворюють плівку. Для запобігання забрудненню біомаси залізом чи алюмінієм використовують неелектролітичні карбонові електроди (Misra et al., 2015).

Також біомасу мікрободоростей концентрують фільтрацією (Bilad et al., 2014). Особливості цього методу полягають у тому, що процес енергозатратний, а пори фільтрів мають тенденцію швидко закупорюватись. Для запобігання цьому статичну фільтрацію замінюють на фільтрацію з поперечним плином (динамічна фільтрація), у процесі якої створюється турбулентний плин, тангентальний до поверхні мембрани. Іншим фінансово-затратним способом концентрування біомаси є центрифугування, в результаті якого відцентрова сила утворює гомогенну пелету з біомаси мікрободоростей. Більшість їх видів, які становлять інтерес для біотехнології, можна концентрувати центрифугуванням.

1.6. Руйнування клітинної оболонки мікрободоростей

Клітинна оболонка захищає протопласт мікрободорості від висихання, несприятливого впливу навколишнього середовища, потрапляння патогенних бактерій і вірусів. Її руйнування у про-

цесі біотехнології отримання цінних речовин із мікроводоростей збільшує біодоступність внутрішньоклітинного вмісту для його подальшої переробки. Залежно від полісахаридного складу оболонки, розмірів мікроводорості та особливостей культивування можна застосовувати різні методи руйнування. Під час безпосереднього використання мікроводоростей як продуктів харчування руйнування їх клітинної оболонки підвищує харчову цінність, оскільки збільшується біодоступність основних поживних речовин і вітамінів.

Фізичні методи руйнування клітинних оболонок. На початковому етапі часто проводять попередню термічну обробку клітин мікроводоростей, яку, залежно від діапазону температур, поділяють на високотемпературну (≥ 100 °C), середніх значень (50°—100 °C) і низькотемпературну (≤ 0 °C). За деструкції методом заморожування кристали льоду утворюються в товщі клітинної оболонки мікроводоростей, потім у процесі танення льоду клітинна оболонка розм'якшується. Здійснюють заморожування і наступне висушування (ліофілізацію) мікроводоростей, клітинна оболонка яких повільно замерзає. За тиску 1 кПа і температури -40 °C утворюються великі кристали льоду, згодом вони сублімуються. Нагрівання до 50 °C протягом попередньої термообробки застосовують переважно для активації термофільних бактерій, які руйнують оболонку (біологічні способи). Високотемпературну обробку застосовують зазвичай в біотехнологічному виробництві біодизеля і біогазу в процесі піролізу біомаси. Термічну попередню обробку під тиском поділяють на гідротермічну обробку (повільна декомпресія), що має термін експозиції 5—30 хв за температури 100 °C і підвищеного тиску 152 кПа, і паровий вибух (швидка декомпресія). Подібно до автоклавування під час парового вибуху біомаса мікроводоростей знаходиться під тиском насиченої водяної пари за температури 140—180 °C протягом 5—60 хв. Руйнування клітин відбувається внаслідок різкого падіння тиску в результаті декомпресії (Cargere et al., 2016).

За механічної обробки клітини мікроводоростей руйнуються під дією прикладеного фізичного впливу. Для цього найчастіше використовують деструкцію із застосуванням кульок, гомогенізації під тиском і ультразвуку. У процесі деструкції за участю кульок (скляних, керамічних, пластикових або сталевих) зовнішня кінетична енергія передається їм у результаті зіштовхування їх між собою та з клітинами мікроводоростей і, як наслідок, клітинні оболонки руйнуються. У високошвидкісних клітинних го-

могенізаторах деструкція клітинних оболонок відбувається внаслідок поєднання гідродинамічного ефекту кавітації, що спостерігається за високих обертів ротора та його ударних коливань. Гомогенізація за високого тиску, або прес Френча, — один із перших методів руйнування клітинної оболонки. Концентровану суспензію мікроводоростей протискають крізь мембрану з порами діаметром ~80—200 мкм за тиску 138—400 МПа. Вибір оптимальних розмірів мембрани та її пор у пресі Френча дає змогу краще екстрагувати цінні речовини з клітин мікроводоростей.

Ультразвук створює в товщі водного середовища зони високого і низького тиску. В зонах низького тиску утворюються порожнини, що змикаються у зонах із високим тиском, в результаті виникають ударні хвилі, які створюють акустичні коливання і екстремальні температурні піки, на поверхні порожнин відбувається термоліз води з утворенням вільних радикалів (процес кавітації). З метою руйнування клітинної оболонки застосовують ультразвук різної частоти (20 і 40 кГц та 1 МГц), проте у промисловому масштабі для здешевлення технології застосовують більш низькі частоти — до 30 кГц. Ефект кавітації виникає частіше за низьких частот ультразвуку (18—40 кГц) порівняно з високочастотним ультразвуком (400—800 кГц). Крім частоти ультразвуку ефективність такого способу попередньої обробки залежить від особливостей виду мікроводоростей (розміру і форми клітин, внутрішньоклітинного вмісту), температурного режиму і концентрації біомаси (Gunerken et al., 2015). Для отримання біодизеля, біоетанолу і біогазу з рідкої біомаси мікроводоростей використовують ультразвук. У дослідженні Р. Silva та співавт. (2014) режим 40 МГц протягом 60 хв забезпечував екстрагування ліпідів із біомаси суміші мікроводоростей (*Chlorophyceae*, *Cyanophyceae*, *Euglenophyceae*, *Bacillariophyceae*) з ефективністю 13,3 %. Проте за таких умов висока температура руйнувала протеїни і відбувся синтез токсичних метаболітів.

Попередню обробку мікрохвилями застосовують як варіант термічної обробки для біомаси мікроводоростей зі збільшеним вмістом лігноцелюлози, а також для макроводоростей (Ju et al., 2016). Електромагнітні хвилі частотою 0,3—300 ГГц взаємодіють з полярними групами клітин, в результаті чого виникають локальний нагрів і зона підвищеного тиску. За умови застосування режиму 400 Вт протягом 4 хв вдалося збільшити вихід ліпідів у процесі екстракції до 33,7 %, без такої обробки — 4,8 % (Silva et al., 2014).

Новим методом руйнування клітин є використання пульсуючого електричного поля високої напруги (Joannes et al., 2015). Суспензію мікроводоростей розміщують між двома електродами і створюють пульсуюче електричне поле, в результаті в клітинних оболонках утворюються пори, що спричинює оборотне або необоротне руйнування клітин (залежно від сили струму).

Біологічні та біохімічні методи руйнування клітинних оболонок. Останнім часом інтенсивно вивчають можливість лізису клітин мікроводоростей за дії різноманітних хімічних сполук, таких як антибіотики, детергенти, хелатери, окисники, кислоти і луги (Gunerken et al., 2015). Хімічні способи руйнування клітин зазвичай більш селективні порівняно з механічними, оскільки хімічні речовини взаємодіють безпосередньо з полісахаридами клітинних оболонок. Методи із застосуванням кислот або лугів подібні до кислотного чи лужного гідролізу біомаси, що відбувається при нагріванні. Найчастіше для кислотного гідролізу використовують розчин H_2SO_4 , тоді як для лужного — $NaOH$. Реакція може відбуватись як за нормальних умов, так і за підвищеного тиску. Кислотне руйнування клітин — більш швидкий метод, але водночас більш затратний, спричинює корозію обладнання та унеможливорює повторне використання кислот. У лужному середовищі може відбуватись гідроліз протеїнів, тоді як у кислому — деградація пігментів (Gunerken et al., 2015). Відносно новим методом є екстракція з використанням іонних розчинів. Переваги цього методу полягають в низькому випаровуванні летких речовин, великій здатності розчинювати органічні речовини, повторному використанні іонних розчинників, можливо застосовувати також для трансетерифікації та екстрагування ліпідів. Так, з використанням іонних розчинів вдалося підвищити на 19 % ефективність екстрагування ліпідів з *Chlorella vulgaris* за 65 °C протягом 18 год (Kim et al., 2012). Надкритичні рідини мають характеристики рідин і газів, а також потенціал для руйнування клітинних оболонок. Рідкий CO_2 найчастіше застосовують для екстрагування ліпідів і вуглеводів із біомаси мікроводоростей. Так, методом екстракції рідким CO_2 (50 МПа, 70 °C, 4 год) вдалося збільшити вихід астаксантину до 84 % з біомаси *Haematococcus pluvialis*. Перевага такого способу полягає в нетоксичності CO_2 , однак такий процес досить енергоємний.

Ензиматичний гідроліз клітинної оболонки супроводжується розщепленням полімерів клітинної стінки до відповідних мономерів за дії специфічних ензимів. Вид ензиму визначає затратність

і умови проведення лізису клітин: температура, рН, концентрація біомаси і самого ензиму. Найчастіше застосовують целюлази, амілази, протеази, ксиланази, пептидази і ліпази (Lam, Lee, 2015). Переваги ензиматичного гідролізу порівняно з лужно-кислотним полягають у його специфічності, високій ефективності, проведенні за нормальних умов, можливості використовувати у промислових масштабах. Недоліки — висока вартість, тривалий проміжок реакції, труднощі повторного застосування ензимів. Так, за різних сумішей ензимів підвищили ефективність екстракції культури *Nannochloropsis* від 16 до 140 % порівняно з культурами без ензиматичної обробки (Zuorro et al., 2016). Для здешевлення такого способу руйнування клітинної оболонки використовують бактерії, які здатні екстрагувати ензими у середовище культивування, або іммобілізовані ензими.

Окисники, такі як H_2O_2 або озон, взаємодіють з біополімерами клітинної оболонки, що призводить до її розм'якшення і руйнування (Concas et al., 2015). Обробка такими речовинами поліпшує ефективність екстрагування, проте час експозиції не має бути занадто тривалим для запобігання пошкодження цінних речовин, які екстрагують. Озоноліз має переваги над традиційними методами попередньої обробки, серед яких: не утворюються речовини-інгібітори процесу, відсутня водна фаза, зберігається інтактність полісахаридів, немає потреби у високій температурі. З недоліків — висока собівартість, потреба у спеціальному обладнанні, легкозаймистість (Travaini et al., 2016).

Часто застосовують комбінацію кількох методів руйнування клітинної оболонки з метою підвищення ефективності подальшої екстракції цінних речовин із мікроводоростей. Так, за комбінації хімічного гідролізу і парового вибуху вдалося досягти майже повної екстракції цукрів і вдвічі кращої ліпідів із біомаси трьох окремих видів мікроводоростей (Lorente et al., 2015). Попередня обробка H_2O_2 біомаси *Ulva prolifera* після водної екстракції підвищила ефективність виходу полісахаридів у процесі ензиматичного гідролізу (Li et al., 2016). Екстракція становила 420 мг цукрів на 1 г біомаси порівняно з 232 мг/г.

1.7. Генна інженерія водоростей

Біотехнологічне виробництво мікроводоростей щорічно утворює 10^7 т біомаси. Переважно використовують біомасу нетрансгенних рослин насамперед через заборону культивування гене-

тично модифікованих організмів у багатьох країнах, а також у зв'язку з обмеженим продажем модифікованих мікроводоростей. Проте використання генетично модифікованих водоростей має певні переваги, серед яких: швидкий ріст, цінніша біомаса (внаслідок значного накопичення цінних речовин), більша щільність клітин у культурі, підвищена стресостійкість.

Основним недоліком промислового використання трансгенних мікроводоростей є епігенетичний сайленсинг чужорідних генів. Одним із варіантів вирішення цієї проблеми може бути вбудовування специфічних промоторів, наприклад HSP70A, в гетерологічну ДНК. Організм для генетичної трансформації має відповідати низці вимог: бути невибагливим до середовища культивування, мати широкий оптимум для факторів навколишнього середовища, швидко рости і накопичувати біомасу. Мікроводорості в разі трансформації мають такі переваги порівняно з макроводоростями: легше проводити скринінг мутантів, мають швидкий життєвий цикл, швидше проявляється генетична трансформація. Наявність розшифрованого геному, а також знання метаболізму і фізіології також є перевагами для організмів, які можна використати для трансформації.

На сьогодні виконуються програми з розшифровки геному низки зелених, бурих, червоних і діатомових мікро- та макроводоростей. Так, вже розшифровано геноми червоної мікроводорості *Cyanidioschyzon merolae*, діатомової *Thalassiosira pseudonana* і зелених водоростей *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri* і *Ostreococcus tauri* (Hallmann, 2015). Також доступний розшифрований геном більш ніж 130 видів ціанобактерій у зв'язку з порівняно невеликою кількістю генів, що вміщують такі геноми: *Synechococcus elongatus* (~2,7 Mb), *Anabaena* sp. (6,4 Mb), *Nostoc punctiforme* (~7,5 Mb), *Synechocystis* sp. (~3,6 Mb), *Thermosynechococcus elongatus* (~2,6 Mb), *Gloeobacter violaceus* (~4,6 Mb) і *Prochlorococcus marinus* (1,7—2,4 Mb). Крім секвенованої геномної ДНК наявна інформація стосовно окремих послідовностей кДНК, здатних експресуватись у мікроводоростях. Інформацію щодо послідовностей таких кДНК наведено на сайті Національного бюро біотехнологічної інформації (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/organelle/>) та Organelle Genome Database (GOBASE, <http://www.bch.umontreal.ca/gobase/gobase.html>).

У зв'язку з невеликим розміром мітохондріальних і хлоропластних геномів вже розшифровано їх послідовності для більшої кількості мікроводоростей, ніж у хромосомної ДНК. Згідно з тео-

рією ендосимбіозу, близько 1,5 млрд років тому відбулося захоплення одноклітинної ціанобактерії еукаріотичною клітиною-хазяїном, що дало початок хлоропластам. Однак деякі водорості дотепер зберегли здатність захоплювати клітини інших мікрободоростей і перетворювати їх на хлоропласти (криптомонадні хлорарахніофіти). При цьому в цитоплазмі клітини-хазяїна залишається рудимент ядра поглинутої клітини. Послідовності ДНК такого рудиментарного ядра вже були секвеновані для криптомонадної мікрободорості *Guillardia theta* і хлорарахніофітної *Biggelliella natans*. Також секвеновано геном деяких вірусів мікрободоростей (Hallmann, 2015).

За останні роки трансформовано близько 40 видів мікрободоростей. Так, з 16 видів зелених водоростей стабільну трансформацію вдалося досягти у 12 (Cui et al., 2014). Для 5 видів із групи вольвоксових водоростей здійснено стабільну трансформацію — *Chlamydomonas reinhardtii*, *Gonium pectorale*, *Eudorina elegans*, *Pandorina morum* і *Volvox carteri*. Серед них трапляються всі рівні організації живих організмів — від одноклітинного до колоніального та багатоклітинного з поділом на органи талому, вегетативні й генеративні клітини. Наявність генетично трансформованих представників цих видів може бути цінним інструментом для дослідження молекулярно-генетичних основ розвитку і диференціювання окремих клітин багатоклітинного організму.

Здійснено трансформацію 6 видів червоних водоростей, з яких 2 види — одноклітинні мікрободорості, 1 вид — крихітна мікрободорість *Cyanidioschyzon merolae*. 2 види макрободоростей належать до роду *Porphyra*. Інша успішно трансформована макрободорість *Karraphycus* продукує згущувач каппа-карагенан, який застосовують у кондитерській промисловості. *Gracilaria*, основний продуцент агару, використовують в їжу та як корм для молюсків. Відомо 2 генетично модифіковані види бурих водоростей з таксона *Laminariales*: *Laminaria japonica* і *Undaria pinnatifida*, 6 стабільно трансформованих штами діатомових мікрободоростей, 3 успішно трансформованих штамів роду *Nannochloropsis*, 2 штами динофлагелят, *Amphidinium* і *Symbiodinium*, і 1 — евгленід *Euglena gracilis*. Методом електропорації або кон'югації трансформовано низку ціанобактерій — *Arthrospira*, *Anabaena* і *Synechocystis* (Hallmann, 2015).

Усі основні методи трансформації водоростей ґрунтуються на створенні тимчасової проникності плазмалеми для молекул чужорідної ДНК, що дає змогу їй потрапляти до цитоплазми клі-

тини. Інтеграція ДНК у геном водоростей надалі проходить без сторонньої допомоги. Інтеграція векторної ДНК відбувається в результаті негомологічної рекомбінації і в ідеалі завершується стабільною трансформацією клітини-хазяїна. Негомологічна рекомбінація зазвичай здійснюється у випадковому положенні хромосомної ДНК. Трансформацію методом гомологічної рекомбінації у мікроводоростей спостерігають значно рідше порівняно з негомологічною. У процесі трансформації критичним моментом є не забезпечення проникнення клітинної мембрани для ДНК, а збереження здатності таких трансформованих клітин із чужорідною ДНК до життєдіяльності й можливості залишати потомство.

Існує декілька прийнятих методів доставки чужорідної ДНК всередину клітини та подальшого відбору трансформованих колоній. Один із найуживаніших способів — це бомбардування клітин мікрочасточками з чужорідною ДНК або трансформація із застосуванням генної гармати (біолістична трансформація). З цією метою використовують кульки важких металів, переважно золота, вкриті ДНК, що уможливорює трансформацію будь-якого типу клітин, не зважаючи на наявність або відсутність щільної клітинної оболонки. Цим методом трансформовано також окремі геноми органел клітини. Здійснено трансформацію *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Gonium pectorale*, *Pandorina morum*, *Eudorina elegans*, *Dunaliella salina*, *Gracilaria changii*, *Laminaria japonica*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Navicula saprophila*, *Cyclotella cryptica*, *Euglena gracilis*, *Porphyridium* sp., *Cylindrotheca fusiformis*, *Haematococcus pluvialis*, '*Chlorella*' *kessleri*, *C. sorokiniana* (Hallmann, 2015).

Інший менш комплексний і більш дешевий метод полягає у змішуванні суспензії водоростей в розчині, що містить мікро- та макрочасточки важких металів, поліетиленгліколь і ДНК. Переважно використовують щільні та важкі мікрочасточки керамічного матеріалу карбиду силіцію (SiC) для трансформації живих культур мікроводоростей *Chlamydomonas reinhardtii*, *Symbiodinium microadriaticum* і *Amphidinium* sp. (Hallmann, 2015). Мутанти *C. reinhardtii*, позбавлені клітинних оболонок, трансформують з використанням скляних кульок діаметром 0,4—0,5 мм, поліетиленгліколю і ДНК. Позбавлені клітинних оболонок протопласти *Chlorella ellipsoidea* можна трансформувати без участі щільних мікрочасточок, лише за наявності поліетиленгліколю і ДНК. Клітини, позбавлені оболонок, можна трансформувати методом електропорації з використанням електродів спеціальної форми. Напруга,

що створюється між електродами, тимчасово порушує ліпідний бішар клітинної мембрани, в результаті чого ДНК потрапляє в цитоплазму.

Метод електропорації успішно застосовують для трансформації *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris* і *Nannochloropsis* sp. (Hallmann, 2015). Деякі види мікрowodоростей успішно модифіковано з використанням Ті-плазмід *Agrobacterium tumefaciens*, які забезпечують рандомне вбудовування чужорідного генетичного матеріалу в геном водоростей. *Agrobacterium* зазвичай індукує утворення галових наростів у покритонасінних вищих рослин, інфікування водоростей не спричинює утворення наростів. Опосередкована Ті-плазмідами трансформація відома для багатоклітинної червоної водорості *Porphyra yezoensis*, а також для одноклітинної зеленої мікрowodорості *Chlamydomonas reinhardtii*.

Разом із неспецифічними методами трансформації клітин зростає кількість специфічних молекулярних інструментів, що забезпечують спрямоване редагування геному. Серед них найчастіше використовують вбудовування послідовностей маркерних генів, експресія яких уможлиблює швидкий скринінг трансформованих колоній. Наприклад, у *Chlorella vulgaris* можна вбудувати ген аміноглікозидфосфотрансферази *Streptomyces hygrosopicus*, експресія якого відбувається за участю промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (CaMV35S). Слід зазначити, що цей промотор здебільшого забезпечує стійку експресію чужорідних генів і визначає стійкість до гіроміцину. Нарівні з домінантними маркерними генами, що дають змогу відібрати трансформовані колонії за їх нечутливістю до антибіотиків або гербіцидів, також широко використовують рецесивні маркерні гени. Для цього беруть мутантні водорості, дефектні за геном, які вносять у процесі трансформації.

Найтипівішим прикладом маркерного гена рецесивного типу є ген нітратредуктази (*nit*), який застосовують для скринінгу модифікованих колоній мутантних штамів, дефектних за ним: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Dunaliella viridis*, *Chlorella sorokiniana* і *Ulva lactuca* (Hallmann, 2015). Так, модифіковані колонії набувають здатності рости на середовищі, в якому нітрат — єдине джерело азоту. Для *C. reinhardtii* часто використовують маркерний ген аргініносукцинатліази, наявність якого дає змогу трансформованим організмам рости на середовищі без аргініну. Промотори маркерних генів мають забезпечувати стабільну екс-

пресію чужорідного гена всередині геному клітини-хазяїна. Однак не всі промотори генів, які часто застосовують для трансформації мікроорганізмів, здатні забезпечувати експресію в геномі мікроводоростей. Для стабільної експресії використовують так звану оптимізацію кодонів цих промоторів. Наприклад, оптимізований ген *GFP* (green fluorescent protein) надає можливість дослідити *in vivo* експресію окремих генів у внутрішньоклітинних компартментах *C. reinhardtii*. Відомі інші флуоресцентні гени для дослідження внутрішньоклітинної експресії в *C. reinhardtii*: блакитні *mTagBFP* і *mCerulean*, жовтий *Venus*, оранжевий *tdTomato*, червоний *mCherry*. Генна конструкція *GFP* функціонує також у червоної водорості *Porphyra yezoensis* та в діатомових *Phaeodactylum tricornerutum*, *Thalassiosira weissflogii*, *Cylindrotheca fusiformis* (Hallmann, 2015).

Отже, генна інженерія водоростей може бути цінною для дослідження метаболічних шляхів. Її вже використовують для реконструкції метаболізму *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus tauri*, *Botryococcus braunii*, *Synechocystis* sp. Вже сьогодні наявність значної кількості різноманітних молекулярно-генетичних інструментів і конструкцій дає змогу змінювати фенотип мікроводоростей відповідно до поставленої мети впливом на геном і метаболізм. Такі маніпуляції забезпечують краще розуміння функціонування і регуляцію окремих генів, а також створення нових високопродуктивних штамів для промислового використання.

ОТРИМАННЯ БІОВОДНЮ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

2.1. Способи отримання та значення водню для промисловості

Збільшення використання енергоносіїв для потреб промисловості призводить до виснаження викопних джерел традиційних видів палива. Спалювання викопного палива зумовлює надходження в атмосферу близько 6 ГГт вуглецю на рік у вигляді вуглекислого газу (IPCC, 2006). Концентрація CO_2 в атмосфері на сьогодні становить приблизно 350 ppm, подальше збільшення його вмісту теоретично може стимулювати парниковий ефект. За останні кілька десятиліть діяльність людини спричинила виділення в атмосферу CO_2 , що накопичувався у земній корі продовж мільйонів років. Найбільша частка виділеного в атмосферу вуглецю пов'язана з двигунами, робота яких зумовлює 70 % глобального надходження оксиду вуглецю (CO) і 19 % викидів CO_2 в атмосферу (Goldemberg, 2008). Обмежена доступність глобальних запасів нафти та занепокоєння з приводу зміни клімату внаслідок зростання вмісту CO_2 в атмосфері спричинили зацікавленість розвитком чистих і поновлюваних джерел енергії для задоволення зростаючих потреб людства (Nouni, 2012).

Водень є важливим і перспективним енергоносієм, який може відігравати значну роль у зменшенні викидів парникових газів (Christopher, Dimitrios, 2012). У процесі спалювання водню утворюється вода, тому він є чистим і вуглець-нейтральним енергоносієм. Вихід енергії при цьому становить 122 кДж/г, що у 2,75 рази більше, ніж у вуглеводневих палив, тому H_2 розглядають як ідеальну альтернативу їх використанню. Водень є перспективним паливом для стаціонарних і транспортних двигунів, високий енергетичний потенціал зумовлює перспективу його застосування в паливних елементах за наявності необхідних каталізаторів. Фактично енергія Сонця також є результатом ядерного синтезу водню.

Ринок H_2 поділяється на спожитий і отриманий водень у процесі синтезу (Liptan, 2011). Водень застосовують у хімічній промисловості, в очищенні й ректифікації нафти, металургії та

обробці металів, аерокосмічній промисловості. Також його використовують як відновник і гідрувальний агент, захисний газ, харчову добавку, охолодник для роторів та ін. Нині значна частка добутого H_2 використовується для виробництва нафтопродуктів і амонію (Markets, Markets, 2011). Великий потенціал у майбутньому має застосування водню як палива для двигунів стаціонарних установок і транспортних засобів. Потужність ринку світового виробництва H_2 у 2010 р. оцінили у 53 млн т (Markets, Markets, 2011). Ринок виробництва водню у вартісному вираженні у 2010 р. становив \$82,6 млрд (Markets, Markets, 2011).

Прогнозують, що глобальний об'єм синтезу H_2 збільшиться в результаті щорічного темпу зростання його використання на 5,6 % протягом 2011—2016 рр. Попит на H_2 підвищиться внаслідок зменшення його застосування в нафтопереробній промисловості, а також в результаті збільшення попиту на паливні елементи, які використовують H_2 . Азія і Океанія виробляють разом 39 % світової частки H_2 , що становить 21 млн т водню станом на 2010 р. (Markets, Markets, 2011).

Хоча водень є найпоширенішим елементом на Землі, він не існує в елементарній формі. Промисловий синтез молекулярного водню здебільшого відбувається з вичерпаних джерел методом реформінгу природного газу або метану, а також у результаті енергоємного процесу електролізу H_2O і як побічний продукт деяких промислових процесів. Глобальний синтез H_2 перевищує 1 млрд m^3 /доба, з яких 48 % виробляють з природного газу, 30 % — з нафти, 18 % — з вугілля, а решту (4 %) — електролізом води (Jong, 2009).

Часткове окиснення вугілля, важких залишкових фракцій нафти та інших малоцінних продуктів нафтопереробної промисловості за виробничою потужністю посідає друге місце після синтезу H_2 методом реформінгу природного газу (Lipman, 2011; Markets, Markets, 2011). Наступною за об'ємом синтезу H_2 технологією з погляду виробничих потужностей є обробка деревного вугілля гарячою парою (Markets, Markets, 2011). Синтез H_2 з вичерпаного палива супроводжується викидом парникових газів в атмосферу — CO_2 , CH_4 та ін. (Jong, 2009). Нині синтез водню з органічної біомаси або відходів з використанням біологічних методів викликають значну зацікавленість.

Газоподібний водень був отриманий штучно на початку XVI ст. Робертом Бойлем у результаті реакції між залізом і кислотою. У XVII ст. Генріх Кавендіш виділив газ H_2 як дискретну речовину і назвав його «вогнебезпечне повітря». Антуан Лавуазьє у 1783 р.

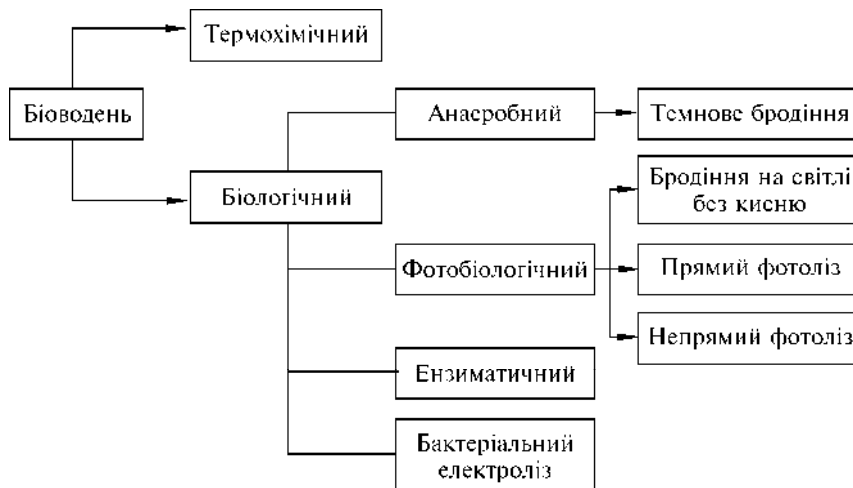


Рис. 2.1. Процеси, які забезпечують отримання біоводню (Hallenbeck, 2012)

дав назву цьому елементу «Гідроген» (грец. hydro — вода, gen — творець) (Stwertka, 1996). У 1939 р. Ганс Гафрон помітив, що *Chlamydomonas reinhardtii*, типовий представник зелених водоростей, здатна продукувати H_2 в разі освітлення мікроводоростей, які перебували деякий час у темряві. Водень, утворений з використанням живих організмів, називають біоводнем (рис. 2.1).

Способи отримання біоводню. З біомаси можна отримувати водень із застосуванням біохімічних або термохімічних процесів (див. рис. 2.1). Темнова ферментація (бродиння), або фотоферментація, — основні біологічні процеси для одержання біоводню з багатой на вуглеводи біомаси. Вихідну біомасу для отримання H_2 поділяють на: першу генерацію (сільськогосподарські рослини), другу генерацію (відходи виробництва, багаті на лігнін і целюлозу), третю генерацію (мікроводорості). Біомасам другої та третьої генерацій віддають перевагу, оскільки їй не використовують в харчовій промисловості. Біомаса другої генерації потребує попередньої обробки, яка поділяється на хімічну, фізичну та ензиматичну. Способи попередньої обробки та їх послідовність залежать від виду біомаси.

Відомо кілька різних способів отримання біоводню з використанням живих мікроорганізмів (рис. 2.2, див. вклейку; далі наведено підпис до нього). Біофотоліз: H_2 продукують мікроводорості (за участю гідрогенази) чи ціанобактерії (за участю гідро-

генази або нітрогенази) з використанням фотосинтетичного апарату. Фотоферментація: H_2 утворюють пурпурні несіркові бактерії (за участю нітрогенази) із застосуванням відновних еквівалентів, що утворюються внаслідок окиснення органічних кислот і енергії АТФ, отриманої у процесі фотосинтезу. Темнова ферментація: утворення H_2 мезофільними чи термофільними хемогетеротрофними бактеріями (за участю гідрогенази) з використанням відновних еквівалентів, отриманих як наслідок окиснення органічних речовин. Бактеріальний електроліз: H_2 утворюється на катоді у процесі відновлення протонів за участю бактерій в електрофоретичному елементі (Hallenbeck, 2012).

Кожен з них має свої переваги і особливості. Існують переважно два різні світлозалежні процеси, один з них — біофотоліз, за якого сонячна енергія поглинається під час фотосинтезу, а водень утворюється як побічний продукт фотолізу води. Другий — фотоферментація, коли у процесі фотосинтезу сонячна енергія запасується у вигляді відновних еквівалентів, потім вони використовуються для отримання водню з субстратів (органічних кислот). Інші два шляхи отримання біоводню відбуваються в темряві — це ферментація і бактеріальний електроліз. У процесі темної ферментації використовують природну здатність деяких мікроорганізмів утворювати водень, щоб позбутися від надлишку відновних еквівалентів, які виникають за анаеробного метаболізму. Нарешті, бактеріальний електроліз використовує природну здатність деяких мікроорганізмів дихати анаеробно із залученням зовнішнього електрода як термінального акцептора електронів. За незначного підвищення напруги генерованого струму на катоді виділяється H_2 . Так, створення додаткової напруги ($-0,135$ В) забезпечує конверсію ацетату ($-0,279$ В) в H_2 ($-0,414$ В) у протилежному термодинамічному градієнту напрямку. Однак для впровадження в практику бактеріальних електрофоретичних комірок потрібні деякі вдосконалення, зокрема, знайти недорогі й ефективні матеріали для електродів, зменшити внутрішні опори в таких комірках. Прогрес у дослідженні цієї технології дасть змогу в майбутньому здійснювати ремедіацію стічних вод і відходів промисловості з отриманням водню.

2.2. Темнова ферментація, що супроводжується утворенням водню

Встановлено здатність багатьох мікроорганізмів у процесі анаеробної ферментації вуглеводів до виділення H_2 . Інші органічні речовини не є ефективними субстратами для ферментаційного

продукування H_2 , лише кілька амінокислот метаболізуються з утворенням водню, а продукування з ліпідів можливе тільки за умови низького парціального тиску H_2 . Лише чисті субстрати, переважно глюкоза, або різноманітні відходи використовували в дослідженнях з утворенням H_2 у процесі темної ферментації (Kapdan, Kargi, 2006; Li, Fang, 2007; Abo-Hashesh, Hallenbeck, 2012).

На рис. 2.3 проілюстровано, що спочатку глюкоза окиснюється у процесі гліколізу до пірвіноградної кислоти, а також АТФ і НАДН. Із пірвату згодом утворюється ацетил-СоА, потім залежно від ферментних шляхів окремих організмів з нього синтезується або форміат (ПФЛ-шлях), або відновлений феридоксин (Фд) і CO_2 (ПФО-шлях). Форміат, у свою чергу, може окиснюватися з утворенням CO_2 і H_2 , за форміат гідроген-ліазного шляху за участю [NiFe]-гідрогенази (Ech-гідрогеназа). У деяких організмів функціонує інший шлях, який забезпечується [FeFe]-гідрогеназою. НАДН, що є результатом процесу гліколізу, окиснюється з утворенням різноманітних органічних сполук вуглецю, зокрема етанолу. [FeFe]-Гідрогенази, здатні окиснювати Фд з синтезом H_2 , називають Фд-залежними H_2 -азами (Фд-[FeFe]). В окремих випадках НАДН також бере участь в утворенні H_2 : відновленням Фд за участю НАДН-феридоксиноксидоредуктази (НФОР) або прямим відновленням гідрогенази (НАДН-[FeFe]-гідрогенази) чи як косубстрат з відновленим Фд (Фд-НАДН-[FeFe] гідрогенази). Надлишок НАДН використовується у процесі утворення органічних ферментаційних продуктів (Hallenbeck, 2012).

Метаболічні шляхи ферментаційного продукування H_2 достатньо добре вивчено. Існують окремі огляди на цю тему (Hallenbeck, 2011, 2012; Ghosh, Hallenbeck, 2012). Основа темної ферментації — процес гліколітичної ферментації цукрів з утворенням пірвату, АТФ і НАДН. Подальший метаболічний шлях пірвату залежить від особливостей організму. Так, різноманітні ензими і гідрогенази можуть брати участь у ньому, проте кінцевим результатом є утворення лише 1 моля H_2 на 1 моль пірвіноградної кислоти (див. рис. 2.3). Одним метаболічним шляхом пірват конвертується до форміату і ацетил-СоА. Форміат розкладається з утворенням CO_2 і H_2 за участю різноманітних мембраноасоційованих гідрогеназ (Hallenbeck, 2012). За іншого метаболічного шляху пірват окиснюється до ацетил-СоА з синтезом CO_2 і молекули відновленого Фд, що генерує утворення H_2 за участю різноманітних гідрогеназ. В обох випадках ацетил-СоА, утворений у процесі ферментації, далі метаболізується з утворенням різ-

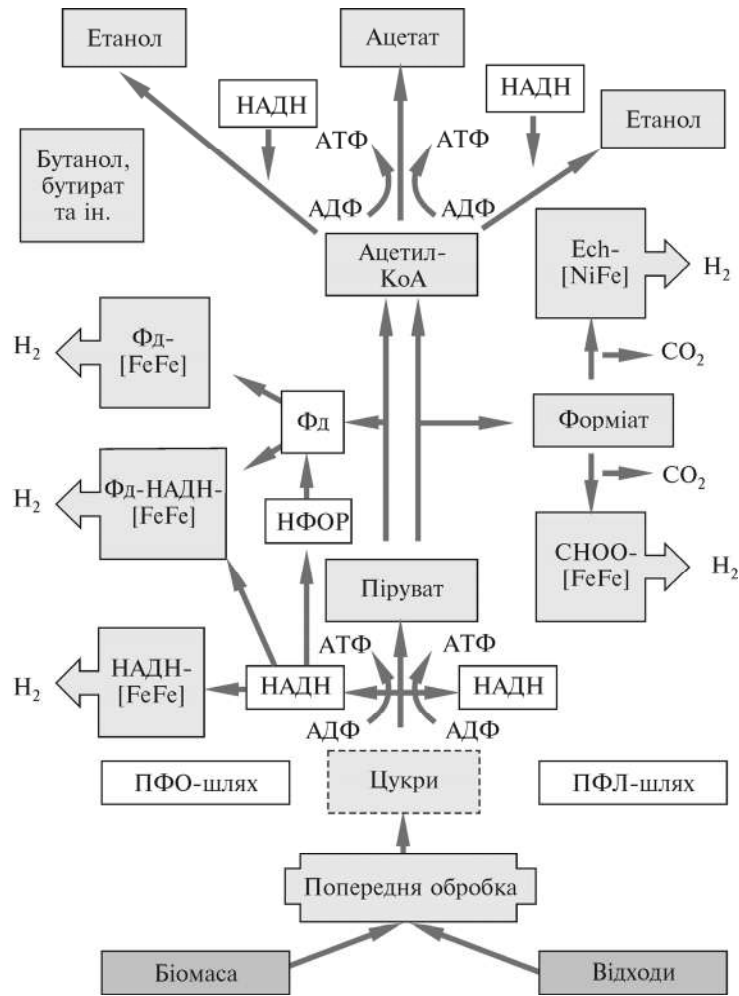


Рис. 2.3. Шляхи темної ферментації, що забезпечують утворення водню (Hallenbeck, 2012)

номанітних рідких ферментаційних продуктів (етанолу, ацетату, бутанолу, бутирату, ацетону та ін.). Природа кінцевого продукту залежить від виду мікроорганізму, ступеня відновленості субстрату, а також потреби до регенерації $НАД^+$ у процесі метаболізму.

Для синтезу більш ніж 2 молекул H_2 на 1 молекулу глюкози (за гліколізу з 1 моля глюкози утворюється 2 моля пірувату) пот-

рібно окиснити НАДН, отриманий під час окиснення гліцеральдегід-3-фосфату. Справа в тому, що синтез H_2 у процесі окиснення НАДН термодинамічно не вигідний у природних умовах, тому утворення H_2 за участю НАДН-гідрогеназ без додаткового використання енергії відбувається лише за низького парціального тиску H_2 .

Різноманітні гідрогенази описано для бактерій відділу Firmicutes, які здатні продукувати H_2 за окиснення НАДН (див. рис. 2.3). Якщо б весь надлишковий НАДН, утворений у процесі гліколізу, був конвертований в H_2 , то такі організми могли б продукувати 4 молекули H_2 на 1 молекулу глюкози. НАДН може безпосередньо відновлювати специфічну гідрогеназу, так і Фд за участю НАДН-феридоксиноксидоредуктази. Проте для утворення 1 молекули H_2 недостатньо енергії окиснення 1 молекули НАДН, додаткова енергія генерується внаслідок окиснення Фд, ензими з такою активністю характерні для деяких мікроорганізмів (Schut, Adams, 2009).

Досягнуто значних успіхів у дослідженні продукування H_2 в результаті анаеробної ферментації. Створено системи з іммобілізованими продуцентами, що дає змогу значно підвищити об'єми утвореного H_2 у процесі темної ферментації. Нові технології у цій сфері уможливають використання різноманітних сумішей субстратів, зокрема відходів, для отримання H_2 в нестерильних умовах. Перевагою є також великі можливості застосування методів генної та метаболічної інженерії, що забезпечує конвертування органічних субстратів з ефективністю, близькою до теоретично можливої (Abo-Hashesh et al., 2011).

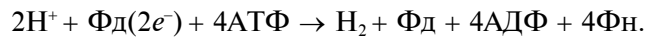
2.3. Фотосинтетичні організми-продуценти водню

Утворювати біоводень фотолізом H_2O здатні еукаріотичні зелені мікрободорості та прокаріотичні синьозелені водорості (ціанобактерії). Водень можуть синтезувати також анаеробні пурпурні несіркові бактерії у результаті «бактеріального фотосинтезу», за якого не відбувається фотоліз H_2O (табл. 2.1). Ціанобактерії містять ширший спектр ензимів і метаболічних процесів, пов'язаних із виділенням H_2 . Вони як поглинають, так і виділяють H_2 залежно від умов зовнішнього середовища, зокрема доступності O_2 . Обговорення біотехнологічних аспектів продукування H_2 прокаріотичними організмами, зокрема ціанобактеріями, розглянемо нижче. Процес біофотолітичного отримання H_2 за життєдіяльності зелених мікрободоростей буде схарактеризований у розд. 3 і 4.

Таблиця 2.1. Основні шляхи утворення біоводню фотосинтетичними організмами

Організм	Умови росту	Процес	Ензим	Шлях утворення H ₂	Шлях створення анаеробіозу
Зелені водорості	Нестача елементів (Mg, S, N)	Прямий і непрямий біофотоліз	[FeFe]-Гідрогенази	Вода → → Фд (70 %); Крохмаль → → НАДН → → Фд (30 %)	Пригнічення активності ФС II
Азотфіксуювальні нитчасті ціанобактерії	Нестача N ₂	Непрямий біофотоліз	Нітрогенази	Глікоген → → Фд + + НАДН + + АТФ	Утворення гетероцист
Одноклітинні ціанобактерії	Світловий цикл (світло/темрява)	Непрямий біофотоліз	Оборотні [NiFe]-гідрогенази	Глікоген → → НАДН + + Фд	Темнове дихання
Анаеробні пурпурні несіркові бактерії	Нестача N ₂	Фотоферментація	Нітрогенази	Екзогенні органічні кислоти → Фд + + НАДН + + АТФ	Фотосинтез без виділення кисню

Ціанобактерії, що продукують водень. Їх поділяють на азотфіксуювальні гетероцистні нитчасті форми, нитчасті ціанобактерії, які не утворюють гетероцист, і одноклітинні ціанобактерії. В клітинах гетероцист H₂ синтезується в результаті активності нітрогеназ, за дефіциту N₂ нітрогенази каталізують відновлення протонів водню (H⁺) у відносно повільній реакції (6,4 л/с) з використанням енергії АТФ і відновленого Фд (2АТР/e⁻; 4АТР/H₂):



У нитчастих ціанобактерій цієї групи гетероцисти диференціюються з вегетативних клітин за умови недостачі амонійних форм азоту (Kumar et al., 2010; Mariscal, Flores, 2010). У гетероцистах створюється мікроаеробне середовище, що уможлиблює азотфіксацію в результаті нітрогеназної активності:



У гетероцистах відсутня ФС II і ензими циклу Кальвіна, тому в них не виділяється O₂ і не фіксується CO₂ (рис. 2.4). Гетероцис-

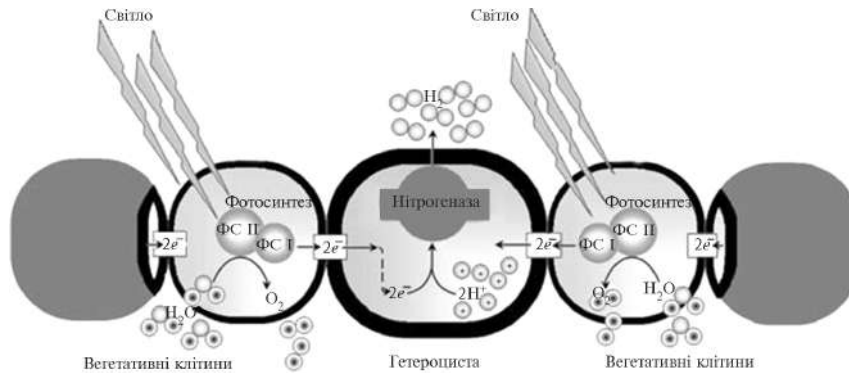


Рис. 2.4. Схема фотосинтетичного виділення водню гетероцистами синьозелених водоростей (Золотарева и др., 2010)

ти отримують цукрозу від вегетативних клітин і метаболізують глюкозу через пентозофосфатний шлях (Summers et al., 1995; Lopez-Igual et al., 2010).

Оскільки продукування біоводню гетероцистами залежить від надходження до них цукрози, що утворюється у вегетативних клітинах, цей спосіб відносять до непрямого біофотолізу, тому теоретично можливе перетворення сонячної енергії на H_2 у таких ціанобактерій нижче порівняно із зеленими мікробактеріями. Проте утворення H_2 гетероцистами інтенсивно вивчали останні 35 років у зв'язку з тим, що лише такі ціанобактерії здатні продукувати водень в атмосфері, збагаченій O_2 (Venemann, Weare, 1974). Однак не вдалося підвищити ефективність фотоконверсії, яка становила 0,4 % для лабораторних та 0,1 % для природних умов (Tsygankov et al., 2002; Yoon et al., 2006). Імовірно, є певні можливості для поліпшення цього процесу, оскільки теоретична ефективність системи на основі нітрогенази становить близько 4,6 % (Hallenbeck, 2011).

Біоводень можуть продукувати ціанобактерії, в яких немає гетероцист, вони також здатні фіксувати N_2 в результаті нітрогеназної активності. Проблема чутливості до O_2 частково вирішується з використанням циркадних ритмів експресії генів. Відповідальні за фотосинтез гени активні у світлу пору доби, а гени нітрогенази активуються в темну пору доби. Продемонстровано здатність нітрогенази до синтезу H_2 на світлі у *Cyanothece* за низької інтенсивності світла та наявності гліцеролу і продувки аргоном, що дає змогу швидко видаляти надлишок O_2 із середовища культивування

(Min, Sherman, 2010). Розділення оксигеночутливого процесу виділення H_2 і утворення O_2 у процесі фотосинтезу вдається досягти в лабораторних умовах у результаті двостадійного культивування. При цьому на першій стадії створюють умови для індукції накопичення глікогену чи інших запасних полісахаридів, тоді як на другій стадії — анаеробні умови для темної ферментації полісахаридів з утворенням H_2 . Так, за умов двостадійного культивування одноклітинна ціанобактерія *Synechococcus* здатна конвертувати біомасу в процесі анаеробної ферментації з ефективністю 12 % (1,44 моль H_2 /моль гексози) (McNeely et al., 2010).

Ефективність перетворення сонячної енергії на енергію водню є ключовим фактором, який визначає цінність організму для біотехнології. Теоретично можлива ефективність перетворення всього спектра сонячної радіації становить 45 % для організмів, які містять хлорофіл *a*, таких як ціанобактерії та зелені водорості, і досягає 70 % у пурпурних несіркових бактерій. Метаболічні шляхи за участю нітрогенази характеризуються нижчою теоретичною ефективністю, ніж за гідрогенази, у зв'язку з додатковою витратою АТФ. Біофотоліз, у якому задіяні зелені водорості, має найвищу теоретичну ефективність (12,2 %), тоді як біофотоліз за участю гетероцистних ціанобактерій — найнижчу ефективність (4,1 %). Фотоферментація органічних субстратів за участю пурпурних несіркових бактерій має теоретичну ефективність 8,5 % (Hallenbeck, 2011). Зазвичай практична ефективність набагато нижча у зв'язку з деякими чинниками, одним з яких є розмір антени світлозбирального комплексу (СЗК).

2.4. Характеристика ензимів, здатних продукувати водень у ціанобактерій

На сьогодні відомо, які ензими здатні продукувати водень — це гідрогенази і нітрогенази (рис. 2.5, див. вклейку) (Winkler et al., 2009). Відмінність полягає в тому, що виділення H_2 за участю нітрогеназ є побічною реакцією, тоді як гідрогенази безпосередньо беруть участь у метаболізмі H_2 . Гідрогенази переважно характерні для ціанобактерій і зелених водоростей, проте їх активність, дозрівання ензимів і структурна різноманітність видоспецифічні.

Нітрогенази. Цей тип ензимів властивий азотфіксувальним ціанобактеріям (див. рис. 2.5, вклейка). Основна функція ні-

трогеназ полягає у фіксації атмосферного N_2 , що дає змогу таким організмам виживати в умовах, непридатних для інших бактерій. Ціанобактерії з'явилися на Землі 2,5–2,7 млрд років тому (Latysheva et al., 2012). Думки вчених розходяться з приводу того, чи предок ціанобактерій був здатний до азотфіксації і відповідно до виділення водню (Sanchez-Barcaldo et al., 2005; Shi, Falkowski, 2008). Існує теорія, що древні форми нітрогеназ слугували для видалення ціанідів із ґрунту (Kelly et al., 1967), а здатність до азотфіксації з'явилась у процесі еволюції (Postgate, 1972). Оскільки нітрогеназа інактивується киснем атмосфери, вона, імовірно, виникла 2,4–2,2 млн років тому (Latysheva et al., 2012). Класична нітрогеназа каталізує реакцію



Вона містить молібден у каталітичному центрі простетичної групи і складається з двох протеїнів. Менший за розміром протеїновий компонент кодується геном *nifH*, також відомий як Fe-протеїн, редуктаза нітрогенази або компонент-2. Він є гомодимером з молекулярною масою 64 кДа. Простетична група кожної субодиниці представлена [4Fe-4S]-кластером, який приймає відновні еквіваленти від Φ_d чи флаворедоксину залежно від виду організму. Електрони від Fe-протеїну нітрогенази переносяться на більший протеїн, що супроводжується гідролізом АТФ. Нітрогеназа має значні потреби в АТФ; 2 молекули АТФ гідролізуються при перенесенні одного електрона. Більший протеїновий компонент нітрогенази має назву «МоFe-протеїн», власне нітрогеназа, або компонент-1. Він кодується геном *nifDK* і представлений тетрамером ($\alpha_2\beta_2$) з молекулярною масою 240 кДа. Кожна пара субодиниць $\alpha\beta$ містить дві простетичні групи (Φ -кластер і FeMo-кофактор). Останній містить гомоцитрат і такі атоми: 1 Мо, 7 Fe і 9 S, а також ідентифікований нещодавно аніон карбиду (C^{4-}) (Lancaster et al., 2011; Spatzal et al., 2011; Wiig et al., 2012). Відновлення N_2 може відбуватися за участю [4Fe-4S]-кластера або в Мо-гомоцитратній частині FeMo-кофактора. Такі класичні нітрогенази зазвичай поширені серед ціанобактерій, проте навіть близькоспоріднені ціанобактерії можуть відрізнятися за здатністю до азотфіксації.

У гетероцистної ціанобактерії *Anabaena variabilis* крім класичної нітрогенази виявили особливу ізоформу Мо-нітрогенази (Schrautemeier et al., 1995; Thiel et al., 1995). У *A. variabilis* класична форма нітрогенази експресується в гетероцистах і окрема ізоформа — у вегетативних клітинах за низького вмісту O_2 у се-

редовищі. Азотфіксація в гетероцистах і вегетативних клітинах — це світлозалежний процес у зв'язку із залежністю від АТФ і відновленого Фд. Оскільки у вегетативних клітинах фотосинтез відбувається паралельно з азотфіксацією, такі клітини мають містити механізми захисту нітрогеназ від інгібування O_2 . Можливо, синтез ензиму у вегетативних клітинах відбувається швидше, ніж його інактивація O_2 (Masukawa et al., 2009). Така нітрогеназа може бути подібна до нітрогенази негетероцистної ціанобактерії *Plectonema (Leptolyngbya) boryanum*, яка експресується за низького парціального тиску O_2 (Stewart, Lex, 1970).

Альтернативну V-нітрогеназу вперше було описано для нефотосинтезувальної бактерії *Azotobacter vinelandii* (Joerger, Bishop, 1988). У середовищі культивування без молібдену, але з достатнім вмістом ванадію ця бактерія синтезує нітрогеназу, що містить V-Fe-S-гомоцитрат у каталітичному центрі простетичної групи. Цей V-мультикомплексний ензим кодується геном *vnfHDGK*. За відсутності молібдену або ванадію ця аеробна бактерія здатна експресувати третю форму нітрогенази з кофактором Fe-Fe-S-гомоцитрат в активному сайті (Joerger, Bishop, 1988). Така нітрогеназа кодується також власним генним кластером *anfHDGK*. Усі три форми нітрогеназ (Mo-, V- і Fe-залежні) мають подібні, але не ідентичні амінокислотні послідовності субодиниць їх гексамерів ($\alpha_2\beta_2\delta_2$ -структура) або октамерів ($\alpha_2\beta_2\delta_4$ -структура). Обидві альтернативні нітрогенази необхідні для росту *A. vinelandii*, а також інших бактерій, в яких вони наявні, проте їх ріст нижчий порівняно з бактеріями, в яких є активні Mo-нітрогенази. Альтернативні V- і Fe-залежні нітрогенази каталізують відновлення N_2 або C_2H_2 з нижчою ефективністю, ніж Mo-нітрогенази, але продукують більше H_2 . Досліджено здатність V-нітрогеназ каталізувати відновлення CO до органічних вуглеводнів (Hu et al., 2012).

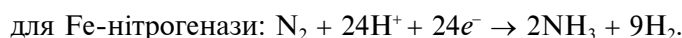
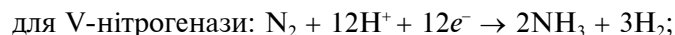
Крім *Anabaena vinelandii* всі три форми нітрогенази є в *Azotobacter paspali*, фототрофній *Rhodopseudomonas palustris* і *Methanosarcina acetivorans* (Bothe et al., 2010). Mo- і V-Нітрогенази знаходяться в *Azotobacter chroococcum*, *A. salinestrus* і *Methanosarcina barkeri* 227. Фототрофні *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* і *Hellobacterium gestii* і гетеротрофні *Clostridium pasteurianum*, *Azospirillum brasilense* і *Azomonas macrocytogeneses* мають Mo- і Fe-нітрогенази, але не V-нітрогенази. *Klebsiella pneumoniae*, симбіотичні бульбочкові бактерії, так само як і переважна більшість ціанобактерій, містять лише Mo-нітрогеназу.

Серед ціанобактерій лише кілька видів здатні синтезувати Mo- і V-нітрогеназу: *Anabaena variabilis* (Kentemich et al., 1988), *A. azoti-*

ca (Voison et al., 2006), а також штами *Nostoc* (Masukawa et al., 2009). Не ідентифіковано жодної Fe-нітрогенази серед 50 досліджених видів ціанобактерій (Hess, 2011).

Молібден не є дефіцитним елементом для більшості ґрунтів і водойм, тому наявність альтернативних нітрогеназ та їх роль у життєдіяльності ціанобактерій залишаються нез'ясованими.

За відсутності інших субстратів нітрогенази каталізують відновлення іонів водню до молекулярного стану (Postgate, 1972). Подібно до відновлення інших субстратів утворення H_2 , АТФ-залежне, але не чутливе до інгібування наявністю CO . Відновлення атмосферного азоту N_2 також супроводжується утворенням H_2 , проте стехіометрія виникнення NH_3 і H_2 може бути відмінною від 2:1 (як у рівнянні). Більше H_2 може утворюватися за участю альтернативних гідрогеназ (див. рівняння нижче), це означає, що вони мають нижчу ефективність для азотфіксації. Стехіометрію між утворенням NH_3 і H_2 за участю альтернативних гідрогеназ виражено в таких рівняннях:



Mo-Нітрогенази за використання неспецифічних субстратів, таких як C_2H_2 , продукують лише незначну кількість H_2 . Альтернативні нітрогенази також відновлюють C_2H_2 , проте вони продукують більше H_2 , ніж Mo-нітрогенази, а також утворюють C_2H_4 і C_2H_6 .

Виділення H_2 за участю нітрогеназ рідко відбувається у клітинах за нормальних умов, оскільки крім нітрогенази у клітинах більшості ціанобактерій наявні також поглинальні та оборотні гідрогенази. За участю перших гідрогеназ відбуваються поглинання і утилізація H_2 , утвореного в нітрогеназній реакції. Ціанобактерії утилізують H_2 двома способами:

- «Knallgas» реакція, за якої поглинання H_2 супроводжується синтезом АТФ і поглинанням O_2 ;

- світлозалежне поглинання H_2 за участю ФС I (Eisbrenner, Vothe, 1979).

В обох процесах бере участь цитохромний *bc*-комплекс III ціанобактерій (Eisbrenner, Vothe, 1979). Поглинальна гідрогеназа кодується геном *hupLS* і каталізує лише поглинання H_2 , електрони з H_2 надходять через дихальний електронтранспортний ланцюг на рівні комплексу III. Електронний акцептор у мембранах тилакоїдів досі невідомий.

Поглиналильні гідрогенази синтезуються в гетероцистах нитчатих ціанобактерій (Samsund et al., 2011), проте вони також характерні для одноклітинних азотфіксувальних видів бактерій (Tamagnini et al., 2005).

Інший тип гідрогеназ ціанобактерій каталізує як поглинання, так і виділення H_2 , кодуються кластером генів *hoxEFYUH* (Schmitz et al., 1995), є НАД(Ф)Н-залежними. Ці оборотні гідрогенази очищено та біохімічно схарактеризовано (Germer et al., 2009; McIntosh et al., 2011). Головною функцією оборотних гідрогеназ є поновлення пулу відновних еквівалентів, утворених у ході темної ферментації в анаеробних умовах (Bothe et al., 2010). Утворення H_2 за їх участю досить незначне і відбувається лише за низького парціального тиску H_2 (Skizim et al., 2012).

Результати дослідів з мутантами продемонстрували, що H_2 , утворений за участю нітрогенази, поглинається переважно поглинальними гідрогеназами і лише незначна частина — за участю оборотної гідрогенази (Masukawa et al., 2002).

Сплеск виділення H_2 відбувається за перенесення нитчатих ціанобактерій на інтенсивне освітлення або за стресу (Laczko, 1986; Abdel-Basset, Bader 1999). Такий сплеск утворення H_2 може здійснюватись за участю як нітрогеназ, так і оборотних гідрогеназ, проте інтенсивне виділення H_2 спостерігається лише кілька секунд або хвилин, тому застосування нитчатих ціанобактерій комерційно не вигідне для продукування H_2 .

Увагу дослідників привертають одноклітинні ціанобактерії *Cyanothece* sp., в яких процеси фотосинтезу і азотфіксації розділені в часі, при цьому нітрогеназа експресується в темряві (Min, Sherman, 2010). У них наявні нітрогеназа, поглинальна та оборотна гідрогенази (Skizim et al., 2012).

Найвищу швидкість утворення H_2 спостерігали у *Cyanothece* під час окиснення НАД(Ф)Н за участю НАД(Ф)Н-дегідрогенази і ФС I, коли функціонування ФС II було заблоковано (Skizim et al., 2012). Світовий рекорд виділення H_2 ціанобактеріями був установлений для *Cyanothece* sp. ATTC 51242—375-465 мкмоль/(год · мг хлорофілу) в разі додаткового забезпечення глікогеном (Bandyopadhyay et al., 2011). Такий високий рівень утворення спостерігали також в аеробних умовах (Bandyopadhyay et al., 2010) попри наявність у цього виду поглинальних гідрогеназ (Min, Sherman, 2010). Продукування H_2 залежало від роботи нітрогенази і ФС I, тоді як продукування за участю оборотної гідрогенази і активної ФС II було незначним (Min, Sherman, 2010).

Згідно зі спостереженнями, середня швидкість утворення H_2 за участю нітрогенази становить близько 40 мкмоль, або 1 мл H_2 /(год · мг хлорофілу). Для підтримання високої швидкості утворення H_2 упродовж тривалого періоду ціанобактерії треба забезпечити амонійним азотом та інгібувати активність поглинальної гідрогенази. Крім того, культивування потрібно проводити у середовищі аргону або іншого інертного газу.

Ферментаційне утворення H_2 ціанобактеріями в темряві має однакову швидкість за участю як нітрогенази, так і оборотної гідрогенази. Найкраща ефективність цього процесу за ферментації становила 7,1 моль H_2 /моль глюкози (Das, Veziroglu, 2008).

Детальне дослідження здатності ціанобактерій до утворення H_2 дає змогу припустити, що вже досягнута теоретично можлива ефективність фотоконверсії для таких організмів. Генетичні маніпуляції з акцепторною частиною ФС I (Ihara et al., 2006) не змінили ефективність фотосинтетичного виділення H_2 . Гетерологічна експресія Fe-гідрогенази *Clostridium acetobutylicum* у неазотфіксувальної бактерії *Synechococcus elongatus* sp. 7942, яка безпосередньо приймає електрони від Фд, збільшувала швидкість утворення H_2 у 500 разів порівняно з ендogenousною оборотною гідрогеназою цієї ціанобактерії (Ducat et al., 2011).

Основна втрата сонячної енергії відбувається в результаті дисипації на рівні антени СЗК і електронтранспортного ланцюга хлоропластів. Підвищення ефективності фотоконверсії можна досягти генетичною модифікацією ФС II або її виключенням. Збільшення швидкості транспорту електронів у хлоропластах можна досягнути зменшенням розмірів СЗК (фікобілісом). Проте зниження інтенсивності циклічного електронного транспорту в хлоропластах несуттєво впливає на лінійний електронний транспорт (Bernat et al., 2009). Ефективність фотоконверсії і відповідно швидкість транспортування електронів у хлоропластах може бути вищою у ціанобактерій, які використовують хлорофіл *b* у фотосинтезувальному апараті, наприклад морська ціанобактерія *Acarychloris* sp. (Pfreundt et al., 2012). Збільшення швидкості електронного транспорту в хлоропластах і відповідно утворення H_2 можна досягти іншими простішими способами, наприклад збагатити середовище культивування ціанобактерій нікелем (Burrows et al., 2008; Carrieri et al., 2008; Marques et al., 2011) або молібденом чи ванадієм (Attridge, Rowell, 1997). Додавання моносахаридів, таких як фруктоза (Reddy et al., 1996) або глюкоза (Yeager et al., 2011), до середовища культивування також збіль-

шує утворення H_2 в окремих видів ціанобактерій. В *Anabaena siamensis* транспорт електронів може бути направлений на продукування H_2 за участю нітрогенази чи оборотної гідрогенази у процесі блокування електронного транспорту в хлоропластах з використанням KCN, ротенону і DCMU за умови додавання гліцеральдегіду (Khetkorn et al., 2012).

Давно відомий вплив сульфідів на швидкість електронного транспорту ціанобактерій. *Oscillatoria limnetica* і *Aphanothece halophytica* можуть відновлювати CO_2 за участю ФС I і з використанням сульфідів чи H_2 як відновника (Belkin, Padan, 1978). *Synechococcus* sp., strain Miami BG 043511 (*Cyanothece*) здатні утилізувати сульфід для утворення H_2 , але лише за стресових умов: недостатності освітлення і мікроелементів (Luo, Mitsui, 1996).

Створено мутанти без поглинальних нітрогеназ (Mikheeva et al., 1995; Yoshino et al., 2007; Masukawa et al., 2012). Встановлено, що виключення поглинальних гідрогеназ супроводжується значним зростанням швидкості утворення H_2 , тоді як виключення оборотної гідрогенази не супроводжувалося значним підвищенням виділення H_2 .

Збільшення швидкості виділення H_2 вдавалось досягти іммобілізацією ціанобактерій на агарових кульках, зануренням у гель або іншим способом (Hall et al., 1995; Madamwar et al., 2000; Rashid et al., 2009).

РІЗНОМАНІТНІСТЬ ГІДРОГЕНАЗ

Гідрогенази — це металопротеїни, які беруть участь у метаболічному процесі мікроорганізмів, і є каталізаторами оборотного гетеролітичного розщеплення H_2 за елементарною реакцією



З 1931 р., коли гідрогенази описали Stephenson і Stickland, накопичено значну кількість даних щодо їх структури і функцій. Біохімічні, спектроскопічні, філогенетичні дослідження дали підставу виділити три групи гідрогеназ на основі вмісту металів в їх активному центрі: [Fe]-, [FeFe]- і [NiFe]-гідрогенази (Vignais et al., 2001).

Три класи гідрогеназ еволюційно не пов'язані, але мають подібні конструкції непротеїнових кофакторів у своєму активному центрі, що є унікальними для цього класу протеїнів. Усі вони містять складний кофактор в активному центрі, до якого входять принаймні один атом заліза, координованого різною кількістю залишків цистеїну, а також унікальні ліганди — монооксид вуглецю (CO) і здебільшого ціанідні (CN) ліганди. Така структура $Fe(CO)_2$ або $Fe(CO-CN)$, ймовірно, є мінімальним кофактором, що забезпечує гідрогеназну активність. Ці металеві кофактори синтезуються узгодженим посттрансляційним процесом, в якому задіяно до дев'яти допоміжних білків, специфічних для гідрогеназ (Böck et al., 2006; Lenz et al., 2010; Mulder et al., 2010).

У біметалевих гідрогеназах кофактор активного центру електрично спряжений з FeS-кластером, що забезпечує транспортування електронів від активного центру до поверхні або від зовнішнього донора електронів до активного центру. В результаті структурного аналізу всіх трьох класів гідрогеназ встановлено наявність гідрофільних каналів або нещільної структури, які зв'язують поверхню ензиму з активним центром (Mulder et al., 2010; Hong, Pachter, 2012; Nicolet, Fontecilla-Camps, 2012). З викорис-

танням симуляції молекулярної динаміки встановлено, що такі канали беруть участь у транспортуванні H_2 з оточуючого середовища до активного центру (Leroux et al., 2008; Liebgott et al., 2010; Torin et al., 2012). Також такі канали можуть забезпечувати надходження молекул газів, зокрема CO і O_2 , до активного центру, що в разі CO призводить до оборотного інгібування, а O_2 — до повного інгібування.

Редокс-стан активного центру гідрогеназ має кілька проміжних станів: крім каталізу, окиснення чи відновлення H_2 гідрогенази також реагують з молекулами газів (CO, O_2), що призводить до втрати ферментативної активності. Важливо розуміти, яким чином гідрогенази каталізують утворення або окиснення H_2 для того, щоб встановити механізм інгібування їх в окисному середовищі та шляхи їх реактивації. Комбінацією спектроскопічних та електрохімічних методів можна дослідити структуру окиснених і відновлених форм ензиму — електронний парамагнітний резонанс (ЕПР), інфрачервона спектроскопія Фур'є (FTIR) і вольтметрія протеїнових плівок (PFV).

Спектроскопічний аналіз методом ЕПР широко використовують для дослідження гідрогеназ. Він дає змогу реєструвати хімічні групи, які мають неспарений електрон із парамагнітними властивостями. У багатьох ензимів є такі парамагнітні атоми, наприклад атом нікелю в активному центрі чи атом заліза в FeS-кластері у [NiFe]-гідрогеназ. Упродовж відновлення і окиснення атом металу простетичної групи змінює ступінь окиснення, на деяких із цих ступенів проявляє парамагнітні властивості і його можна ідентифікувати за відповідним ЕПР-спектром. Магнітна взаємодія між цими атомами також надає цінну інформацію про механізм каталізу.

Інша потужна методика для дослідження окисно-відновних змін в активному центрі гідрогеназ — FTIR. Її зазвичай не використовують для дослідження ензимів, проте за наявності у гідрогеназ груп CN^- та (частково) CO можна реєструвати вібраційні осциляції в інфрачервоній ділянці спектра.

Крім спектроскопічних досліджень, які надають інформацію про термодинаміку перехідних станів, кінетичні параметри гідрогеназ досліджують з використанням PFV, коли гідрогеназа адсорбована на електроді, її активність можна вимірювати безпосередньо за потоком електронів через електрод в окисному або відновному середовищі газів — інгібіторів CO, O_2 чи субстрату H_2 (Vincent et al., 2007; Armstrong et al., 2009).

3.1. [Fe]-Гідрогенази

Тип [Fe]-гідрогеназ (ЕС 1.12.98.2) характерний для невеликої групи метаногенних архей, вперше описаний для *Methanothermobacter thermoautotrophicum* (Zirngibl et al., 1992). Така гідрогеназа каталізує відновлення CO_2 до метану з використанням H_2 (Vignais, Billoud, 2007). Раніше ці ензими відносили до неметаловмісних гідрогеназ, пізніше їх позначили як гідрогенази без залізо-сіркового кластера, або [Fe]-гідрогенази (Armstrong, Albracht, 2005). Цей ензим також називають H_2 -утворювальною метилентетрагідрометаноптериндегідрогеназою (Hmd) (Cogg, Murphy, 2011). Структуру активного сайту і модель функціонування запропоновано у 2008 р. (Shima, 2008; Hiramoto et al., 2009). Ця гідрогеназа відрізняється від інших не лише за вторинною і третинною структурами, а й тим, що атом заліза, наявність якого потрібна для каталітичної активності, не бере участі в окисно-відновних реакціях. Гідрогеназа швидко втрачає активність за наявності кисню і освітлення (Lyon et al., 2004), що робить її вивчення непростим завданням.

3.2. [FeFe]-Гідрогенази

[FeFe]-Гідрогенази (ЕС 1.12.7.2) наявні у грампозитивних бактерій і еукаріот, а також деяких грамнегативних бактерій (Atta, Meyer, 2000; Horner et al., 2002). Цікаво, що лише цей тип гідрогеназ є у еукаріотичних організмів (зелених водоростей), але відсутній у *Archaea*. Зазвичай [FeFe]-гідрогенази здатні продукувати H_2 , проте є повідомлення, що вони можуть функціонувати також як поглинаючі гідрогенази. За їх локалізацією у клітині бактерій можна передбачити їхню функцію (Nicolet et al., 2000). Так, периплазматична [FeFe]-гідрогеназа (DdH) *Desulfovibrio desulfuricans* поглинає і окиснює H_2 . Протони, які утворюються в результаті реакції, створюють трансмембранний градієнт, що забезпечує синтез АТФ. [FeFe]-Гідрогеназа I (CpI) *Clostridium pasteurianum*, локалізована у цитоплазмі, окиснює Фд і транспортує електрони на протони з утворенням молекулярного H_2 .

[FeFe]-Гідрогеназа анаеробної ґрунтової бактерії *Clostridium pasteurianum* (CpI) (Peters et al., 1998) і сіркобактерії *Desulfovibrio desulfuricans* (DdH) (Nicolet et al., 1999) в активному сайті містить металовмісний кластер, названий H-кластером, де відбувається каталіз. H-Кластер приєднаний до апопротеїну чотирма залиш-

ками цистеїну. Він складається з [2Fe]-центру, приєднаного до [4Fe-4S]-субкластера за допомогою цистеїну. Центр [2Fe] координований 5 лігандами (CN⁻ і CO), а також дитіометиламіновим залишком (рис. 3.1, див. вклейку). Молекулярна маса [FeFe]-гідрогеназ може варіювати від 45 до 130 кДа відповідно до кількості субодиниць. Ці гідрогенази здебільшого представлені мономерними формами з однією каталітично активною субодиницею, але до неї також можуть бути приєднані допоміжні субодиниці, що містять FeS-кластери. До прикладу, [FeFe]-гідрогеназа I *C. pasteurianum* (CpI) складається з трьох [4Fe-4S]-кластерів, одного [2Fe-2S]-кластера і H-кластера у центрі білкової молекули (Nicolet, Fontecilla-Camps, 2012). Найпростіші за структурою [FeFe]-гідрогенази характерні для зелених мікрободоростей, таких як *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca* і *Scenedesmus obliquus*, вони містять лише H-кластер без додаткових доменів з FeS-кластерами (Florin et al., 2001; Horner et al., 2002; Forestier et al., 2003). Такі прості гідрогенази схарактеризовано біохімічно і спектроскопічно, оскільки за відсутності додаткових субодиниць стало можливим безпосередньо дослідити H-кластер (Kamp et al., 2008; Silakov et al., 2009; Stripp et al., 2009; Mulder et al., 2010).

Взаємодія з O₂. Кисень інгібує більшість [FeFe]-гідрогеназ, очевидно, приєднанням до вільного координаційного положення дистального атома заліза у [2Fe]-ділянці активного центру, далі у процесі відновлення кисню утворюються його реакційні сполуки, що руйнують [4Fe-4S]-субкластер в реакційному центрі. Дистальний атом заліза в активному центрі може реагувати з воднем, а також оборотно приєднувати та інгібуватись CO (Stripp et al., 2009). Яка саме вільнорадикальна сполука утворюється в H-кластері за наявності O₂ поки невідомо, проте термодинамічне моделювання інактивованого H-кластера припускає наявність окисненого стану [2Fe]-центру з OH-групою, що приєднана до дистального атома заліза (Liu, Hu, 2002).

Дослідження інгібування киснем гідрогеназ методом вольтметрії адсорбованих ензимів дало змогу встановити, що кінетика інгібування [FeFe]-гідрогеназ визначається двома складовими: швидкістю дифузії кисню від поверхні протеїну до активного центру і швидкістю реакції [2Fe]-центру з O₂ (Armstrong et al., 2009).

Швидкість інгібування O₂ [FeFe]-гідрогеназ не однакова, показник I₅₀ варіює від кількох секунд у разі гідрогенази *Chlamydomonas reinhardtii* до кількох хвилин у гідрогенази клостридій (Böck

et al., 2006; Baffert et al., 2011). Гідрогенази водоростей чутливіші до інгібувальної дії O_2 у зв'язку з відсутністю додаткових субодиноць, характерних для гідрогеназ бактерій.

3.3. [NiFe]-Гідрогенази

[NiFe]-Гідрогенази (EC1.12.2.1) — найчисленніший та найкраще досліджений тип гідрогеназ. Вони характерні для бактерій і архей. Каталітично активний ензим складається з двох субодиноць: великої з масою 60 кДа, яка містить активний центр, і маленької — приблизно 35 кДа, до неї входить три залізо-сіркові кластери: дистальний [4Fe-4S]-кластер біля поверхні протеїну і найвіддаленіший від активного центру, проміжний [3Fe-4S]-кластер і проксимальний кластер, найближчий до активного сайту. Для обох субодиноць характерні гомологічні ділянки до NADH: убіхіноноксидоредуктази (Комплекс I) електронтранспортного ланцюга мітохондрій (Volbeda et al., 2012). Додаткові субодиноць дають змогу специфічним гідрогеназам взаємодіяти з різноманітними фізіологічними транспортерами електронів, такими як убіхінони, пуринові нуклеотиди (NAD(P)H), Фд і цитохроми. З використанням рентгеноструктурного аналізу гетеродимеру [NiFe]-гідрогенази *Desulfovibrio* (Matias et al., 2001) та фотосинтезувальної бактерії *Allochromatium vinosum* (Ogata et al., 2010) вдалось виявити, що Ni-Fe-кофактор знаходиться глибоко в товщі ензиму. Атом нікелю координований в активному центрі протеїну сульфгідрильними групами чотирьох залишків цистеїну, два з яких є містком і координують залізо і нікель (див. рис. 2.5, вклейка) (Matias et al., 2001). Інфрачервона спектроскопія Фур'є дала змогу виявити, що атом заліза в активному центрі координований двома лігандами CN і одним CO (Pierik et al., 1999). У структурі гідрогеназ виявлено гідрофільні канали і порожнини, які забезпечують транспортування молекул газів від поверхні до активного центру ензиму (Volbeda et al., 2002; Teixeira et al., 2006), а також канали для транспортування протонів (Léger et al., 2004).

Класифікація. Відповідно до первинної структури, всі [NiFe]-гідрогенази поділяють на чотири окремі групи:

- група I — поглинальні H_2 гідрогенази, локалізовані в мембранах бактерій чи архей, забезпечують окиснення H_2 ;
- група II — (а) поглинальні [NiFe]-гідрогенази ціанобактерій, локалізовані в цитоплазмі, беруть участь в азотфіксації; (б) регу-

ляторні гідрогенази, або гідрогенази-сенсори, чутливі до наявності H_2 в навколишньому середовищі, ініціюють каскад реакцій індукції синтезу поглинальних гідрогеназ;

- група III — поглинаючі гідрогенази знаходяться у цитоплазмі переважно метаногенних архей, використовують різноманітні кофактори: F_{420} (підгрупа а), НАД(Ф)⁺/ФАД⁻ (підгрупа б), Фд (підгрупа в), комплекс I дихального електронтранспортного ланцюга (підгрупа г);

- група IV — гідрогенази перетворюють енергію відновленого Фд на трансмембранний електрохімічний потенціал, локалізовані в мембрані та забезпечують утворення H_2 у відновному середовищі (Vignais, Billoud, 2007).

Взаємодія з O_2 і CO. Кисень інгібує роботу всіх гідрогеназ, проте характер такого інгібування може значно відрізнитися між окремими [NiFe]-гідрогеназами. Порівняно з [FeFe]-гідрогеназами вони здатні повністю відновлювати каталітичну активність після взаємодії з киснем, що безпосередньо взаємодіє з біметалевим центром в активному сайті, проте відмінність між [FeFe]- і [NiFe]-гідрогеназами полягає в тому, що активний центр останніх не ушкоджується киснем і може бути реактивований дією відновників. Методом рентгенівської дифракції встановлено, що у процесі окиснення активного центру кисень утворює оксигенний місток між атомами металів (Cagero et al., 2002). Відновлення окисненого стану ензиму призводить до видалення такого містка, що дає змогу повернути втрачену каталітичну активність. Методом ЕПР встановлено, що гідрогеназа може знаходитись у двох станах, які позначають як Ni-A та Ni-B, відмінність між останніми полягає в кінетиці реактивації цих станів (Samtack et al., 1986). При -208 мВ і рН 6 процес реактивації відбувається у дві фази: швидка (миттєва) фаза пов'язана з реактивацією стану Ni-B і повільна фаза (декілька хвилин) пов'язана з реактивацією Ni-A. В результаті FTIR-спектроскопічних досліджень різноманітних гідрогеназ встановлено, що у процесі відновлення електроном Ni-A переходить у стан Ni-SU, а Ni-B — у Ni-SI (De Lacey et al., 2007). У стані Ni-SI ензим каталітично активний, тоді як у Ni-SU — неактивний (De Lacey et al., 2007). Лімітує процес реактивації поступове і спонтанне перетворення стану Ni-SU на активний стан Ni-SI (Lamle et al., 2005).

Згідно з даними рентгенівської дифракції (Volbeda, 2002), ЕПР електронного ядерного подвійного резонансу (ENDOR) (Ca-

геро et al., 2002) в обох станах атом кисню з'єднаний з атомами заліза і нікелю (De Lacey et al., 2007; Pandelia et al., 2010). Більшість дослідників припускає наявність гідроксиду в стані Ni-B, тоді як природа інгібітора в стані Ni-A невідома. Вчені повідомляють про утворення оксо- (Cagero et al., 2002), гідроксо- (Pandelia et al., 2010) чи пероксо- (Lamle et al., 2005) реакційних сполук кисню у такому стані. Методом ENDOR вдалось установити, що [NiFe]-гідрогенази аеробно окиснені в H_2^{17}O , містять у стані Ni-A атом кисню від міченої води (Cagero et al., 2002), тому структура активного центру в стані Ni-A залишається предметом дискусій.

Більшість [NiFe]-гідрогеназ інгібуються CO за типом конкурентного витіснення (Léger et al., 2004), оскільки CO проникає до активного центру однаковими каналами з H_2 і O_2 (Liebgott et al., 2010). Чадний газ приєднується до атома нікелю в активному сайті (De Lacey et al., 2007; Lubitz et al., 2007). Інгібування CO блокує транспортування протонів і електронів до активного центру, водночас відновлюється проксимальний [4Fe-4S]-кластер. Встановлено, що кінетика інгібування CO є швидкою, приблизно 10^8 1/с, і лімітується швидкістю дифузії CO. У зв'язку з цим CO використовують у дослідженнях швидкості дифузії газів у гідрогеназах (Leroux et al., 2008; Liebgott et al., 2010).

3.4. [FeFe]-Гідрогенази *Chlamydomonas reinhardtii*

Для *Chlamydomonas reinhardtii* характерні два гени [FeFe]-гідрогеназ: *HYDA1* (Happe, Kaminski, 2002) і *HYDA2* (Forestier et al., 2003). *HYDA1* — основний ензим, який забезпечує утворення приблизно 75 % H_2 (Meuser et al., 2012).

Обидва гени локалізовані в ядрі клітини, проте *HYDA1* містить сигнальну послідовність, що забезпечує транспортування в хлоропласти (Happe, Kaminski, 2002). *HYDA2* також має цю послідовність і локалізується у хлоропласті (Forestier et al., 2003). Експресія *HYDA1* і *HYDA2*, як і експресія генів протеїнів, які відповідають за дозрівання гідрогеназ *HYDEF* і *HYDG*, індукується анаеробіозом (Happe, Naber, 1993; Happe, Kaminski, 2002; Posewitz et al., 2004; Mus et al., 2007). *HYDA1* індукується також за нестачі міді у середовищі культивування (Castruita et al., 2011), промотор *HYDA1* гена містить дві послідовності GTAC, що розпізнаються транскрипційним фактором (CRR1) (Pape et al., 2012), який активує відповідні гени за нестачі міді та при ана-

еробіозі (Kropat et al., 2005). Цікаво, що анаеробіоз і нестача міді пов'язані між собою, оскільки однакові гени активуються в таких станах (Castruita et al., 2011).

[FeFe]-Гідрогеназа *Chlamydomonas reinhardtii* — мономер із молекулярною масою 48 кДа — локалізована у хлоропласті (Harper, Naber, 1993). Цей протеїн складається з двох пів куль, кожна з яких містить бета-складчасту структуру, оточену кількома альфа-спіралями, активний центр знаходиться між двома пів кулями (Mulder et al., 2010). Таку структуру HYDA1, так само як й інших [FeFe]-гідрогеназ зелених водоростей, представлено лише цією конформацією, відомою як H-кластер (Peters et al., 2015).

Протони надходять до активного центру гідрогенази від верхні протеїну через протонні канали в товщі гідрогенази, утворені залишками аргініну, двома глутаміновими залишками, серину, молекулою води і цистеїном (рис. 3.1, див. вклейку) (Peters et al., 1998). Заміна цих амінокислот знижує каталітичну активність та змінює рН оптимум бактеріальної [FeFe]-гідрогенази (Cornish et al., 2011; Morra et al., 2012).

Дозрівання гідрогеназ. Утворення H-кластера [FeFe]-гідрогеназ відбувається у дві стадії. Спочатку утворюється [4Fe-4S]-субкластер, потім до нього приєднується [2Fe]-субкластер за участю специфічних ензимів дозрівання HYDEF і HYDG (Posewitz et al., 2004). Відомо, що CO і CN⁻ утворюються з тирозину за участю HYDG (Peters et al., 2015). HYDEF (у більшості організмів HYDE і HYDF — це різні протеїни) використовує S-аденозилметіонін для приєднання азодитіолятного містка, оскільки доведено, що вона використовує дрібні сполуки сірки (Betz et al., 2015). Продукт HYDE разом із двома моноатомними Fe-кластерами — продуктами HYDG, приєднується до HYDF, яка слугує основою для завершеного [2Fe]-субкластера. Взаємодія між цими трьома ензимами дозрівання залишається нез'ясованою, проте відомо, що одночасно відбувається гідроліз гуанозинтрифосфату (ГТФ), оскільки HYDF проявляє ГТФазну активність (Peters et al., 2015). Після того як [2Fe]-субкластер, утворений на HYDF, приєднується до [4Fe-4S]-субкластера, повне утворення H-кластера надалі відбувається без витрат енергії (Shepard et al., 2010).

Каталітично активні гідрогенази можуть утворюватись без участі специфічних матураз (HYDEF і HYDG), синтезований [2Fe]-субкластер може вбудовуватись спонтанно в [FeFe]-гідрогенази *in vitro* за умови, що [4Fe-4S]-субкластер вже сформований природним шляхом або реконструкцією *in vitro* (Berggren et al., 2013; Esselborn et al., 2013).

Поки що невідомий ні точний механізм синтезу гідрогеназ, ні клітинні компартменти, де утворюються субкластери (Peters et al., 2015). В еукаріотичних мікроводоростей протеїни, які беруть участь в утворенні стандартних [4Fe-4S]-кластерів, локалізовані в усіх клітинних компартментах, таких як цитозоль, строма хлоропласта і мітохондріальний матрикс (Balk, Schaedler, 2014). У кожному з цих клітинних компартментів синтезуються [4Fe-4S]-кластери, проте між ними є відмінності (Balk, Schaedler, 2014). Локалізована у хлоропластах HYDA1 утворюється з компонентів всередині них, оскільки відомо, що лише несформовані гідрогенази можуть транспортуватись крізь оболонку хлоропласта (Paila et al., 2015). Також гени *HYDEF* і *HYDG* містять сигнальну послідовність для транспорту їх продуктів у хлоропласт. У процесі дослідження протеому в хлоропластах виявили ген *HYDG* (Terashima et al., 2010), тому можна припустити, що синтез і приєднання [2Fe]-субкластера відбуваються у хлоропласті.

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ВОДНЮ
З ВИКОРИСТАННЯМ *CHLAMYDOMONAS*
REINHARDTII

4.1. Дефіцит сірки

Відсутність сірки у середовищі культивування спричинює метаболічні зміни у клітинах *Chlamydomonas reinhardtii*, одним з їх проявів є зменшення утворення O_2 у ФС II і перехід культури на анаеробний метаболізм (Antal et al., 2015).

Створення анаеробних умов необхідне для індукції синтезу і активності гідрогенази (Melis et al., 2000). На рис. 4.1, а (див. вклейку) зображено криву типової кінетики накопичення H_2 *Chlamydomonas reinhardtii* CC124. Фази продукування H_2 *C. reinhardtii* на безсірковому середовищі без доступу повітря (а), наведено вихід H_2 , ефективний квантовий вихід ФС II в адаптованому до світла стані ($\Delta F / F'_M$), вміст O_2 , редокс-потенціал (E) протягом культивування (год), метаболічні процеси в хлоропластах залежно від фаз та вмісту O_2 в середовищі культивування: аеробно, анаеробно, мікроаеробно (б). Потік протонів (H^+) позначено штриховими лініями; електронний потік — суцільними лініями; СЗК II — світлозбиральні антенні білки ФС II; Пх — пул пластохінонів; цит b_6f — комплекс цитохрому b_6f ; ПЦ — пластоціанін; PGRL1 — білок регулювання протонного градієнта 1; СЗК I — світлозбиральні антенні білки ФС I; Фд — феридоксин; ФдР — феридоксин-редуктаза; Nda2 — НАДФ(Н)-дегідрогеназа 2-го типу (Oey et al., 2016).

Умовно виділено кілька стадій або фаз (див. рис. 4.1, вклейка): I — фаза утворення O_2 , упродовж якої підвищується концентрація O_2 в культурі; II — фаза поглинання O_2 , в результаті створюється анаеробіоз в середовищі культивування; III — лаг-фаза, протягом її в анаеробному середовищі не синтезується H_2 ; IV — фаза утворення H_2 , в культурі поступово накопичується H_2 ; V — термінальна фаза поглинання утвореного H_2 (Kosourov et al., 2002). На початку лаг-фази (після індукції анаеробного метаболізму) окисно-відновний потенціал повільно знижується до -110 мВ, що засвідчує створення відновного середовища в культурі. Редокс-потенціал надалі знижується і досягає мінімального значення (~ 450 мВ)

в продуктивній фазі утворення H_2 , що зазвичай настає після 1 доби культивування на безсірковому середовищі без доступу повітря.

Продуктивна фаза супроводжується поступовим зменшенням максимального квантового виходу ФС II в адаптивному до світла стані ($\Delta F / F'_M$). Останній показник починає спадати через 15 хв після досягнення анаеробіозу. Відновлення пулу Pх приводить до зростання показника F_s (флуоресценція в адаптованому до світла стані) і зниження F'_M (максимальна флуоресценція у світлоадаптованому стані) (Antal et al., 2003). $\Delta F / F'_M$ продовжує зменшуватись до мінімального значення в кінці продуктивної фази (0,05). Пул Pх відновлюється за активації світлозахисних реакцій в *Chlamydomonas reinhardtii*, таких як індукція ксантофілового циклу і міграція мобільного компоненту СЗК ФС II до ФС I (Faraloni, Torzillo, 2013). Упродовж стадії виділення H_2 електрони надходять до гідрогенази внаслідок активності ФС II-залежного і ФС II-незалежного шляхів. Добавляння 3-(3,4-дихлорфеніл)-1,1-диметилсечовини, що блокує транспортування електронів між Q_A і Q_B , дає змогу оцінити внесок кожного з цих шляхів. Встановлено, що за умови нестачі сірки без доступу повітря 80 % утвореного H_2 пов'язано з ФС II-залежним шляхом, тобто відбувається в результаті фотолізу води (Kruse et al., 2005; Scoma et al., 2012; Volgusheva et al., 2013). Виділення решти 20 % забезпечується мобілізацією внутрішньоклітинних резервів, зокрема крохмалю, проте інші внутрішньоклітинні органічні речовини, такі як ацетат, амінокислоти і ліпіди, також беруть участь в анаеробній ферментації та продукуванні H_2 .

Фізіологічна відповідь зелених мікроводоростей на нестачу основних макроелементів (азоту, сірки, фосфору) проявляється у припиненні росту й поділу клітин, знижується активність фотосинтезу і фіксації CO_2 , накопичуються крохмаль або запасні ліпіди (Kolber et al., 1988; Wykoff et al., 1998; Zhang et al., 2004). А. Melis та співавт. (2000) вперше дослідили вплив сіркового дефіциту на здатність продукування H_2 одноклітинною зеленою мікроводорістю *Chlamydomonas reinhardtii* на середовищі культивування TAPS без доступу повітря. Дослідники показали, що після 1–2 діб культивування мікроводорості накопичують помітний об'єм H_2 . Нестача сірки створює умови для переходу від аеробного метаболізму на анаеробний. Протягом аеробної стадії накопичується крохмаль, тоді як на наступних стадіях він окиснюється в результаті анаеробного гліколізу. Дефіцит сірки зумовлює ушкодження ФС II, що проявляється в поступовому зни-

женні швидкості виділення O_2 , рівень дихання за таких умов не змінюється або навіть зростає (Antal et al., 2006), що створює анаеробне середовище в культурі.

У разі перенесення культури *Chlamydomonas reinhardtii* на середовище без сірки ФС II деградує швидше, ніж інші компоненти електронтранспортного ланцюга хлоропластів (Zhang et al., 2002). Деградація ФС II і зниження швидкості виділення O_2 відбуваються внаслідок зменшення синтезу протеїну D1, що входить до складу реакційного центру ФС II. Протеїн D1 характеризується швидким відновленням в оптимальних умовах, однак за нестачі сірки його синтез зменшується і швидкість деградації в результаті фотоокиснення починає перевищувати швидкість його синтезу (Wykoff et al., 1998). Також протеїн D1 захищає реакційний центр ФС II від пошкодження інтенсивним світлом (Aro, Andersson, 2001). Саме внаслідок інактивації ФС II створюються анаеробні умови в культурі мікрководорості без доступу повітря, що супроводжується перебудовою метаболізму та індукцією синтезу гідрогенази.

Крім відносно повільної інактивації ФС II відбувається також швидка інактивація (кілька хвилин) у момент створення анаеробного середовища в культурі *Chlamydomonas reinhardtii* (Antal et al., 2004). Фотосинтетичну ефективність ФС II можна оцінити за зміною параметрів кривої індукції флуоресценції хлорофілу, а саме за ефективним квантовим виходом ФС II в адаптованому до світла стані $\Delta F / F'_M = [F_M - F_s] / F'_M$. Ефективність фотосинтезу швидко знижується в результаті зменшення максимального значення флуоресценції в адаптованому до світла стані (F'_M) і збільшення рівноважного значення флуоресценції (F_s). Підвищення показника F_s — це результат збільшення кількості реакційних центрів ФС II, в яких первинний акцептор електронів (Q_A) знаходиться у відновленому стані. Відновлення Q_A є наслідком швидкого відновлення пулу Pх та інших компонентів електронтранспортного ланцюга хлоропластів. Повільна інактивація ФС II пов'язана з перерозподілом сірки для забезпечення основних метаболічних процесів і підтримання життєздатності клітин. Швидка інактивація ФС II пов'язана з доступністю кисню, тому можна припустити наявність редокс-контролю активності ФС II (Antal et al., 2004). На анаеробній стадії за нестачі сірки регенерація пулу НАДН відбувається за активності гліколізу і мітохондріального дихання, тоді як цикл Кальвіна та інші пов'язані анаболічні процеси інактивуються. Значення F'_M знижується також у результаті переходу тилакоїдних мембран зі ста-

ну I у стан II. Водночас ефективність збудження ФС II спадає. Зміна станів фотосинтетичного апарату регулюється редокс-потенціалом пулу Pх (Allen et al., 1981), який після досягнення анаеробіозу переходить у повністю відновлений стан.

Після швидкого пригнічення ФС II в результаті анаеробіозу її активність поступово відновлюється (Kosourov et al., 2007). Цей процес іде паралельно з переходом до стадії продукування H_2 , що дає підставу припустити важливу роль гідрогенази в окисненні пулу Pх і відновленні активності ФС II, а також активації фотолізу води. Максимальна реактивація ФС II упродовж стадії продукування H_2 відбувається за умови автотрофного росту *Chlamydomonas reinhardtii* (Kosourov et al., 2007). Очевидно, за відсутності екзогенного ацетату в середовищі культивування відновлення протонів гідрогеназою здійснюється за участю електронів, що утворюються з H_2O у процесі її фотолізу.

Індукція гідрогенази *Chlamydomonas reinhardtii* на середовищі без сірки уможливує регулювання залишкової активності ФС II і утворення O_2 в реакції фотолізу H_2O . Таку регуляцію за участю гідрогенази можна розглядати як прояв загального механізму адаптації мікрободоростей до дефіциту макро- і мікроелементів у середовищі культивування (Melis et al., 2007).

Додаткове надходження кисню в результаті відновлення активності ФС II дає змогу мікрободоростям краще адаптуватись до несприятливих умов росту, можливо, за ефективнішого окиснення органічних речовин в електронтранспортному ланцюзі мітохондрій з використанням O_2 як кінцевого акцептора електронів. За умов анаеробіозу гідрогеназна реакція є єдиним механізмом, що забезпечує компенсацію надлишку відновних еквівалентів під час освітлення мікрободоростей. Коли гідрогеназна реакція не активна, інактивується також лінійний і циклічний транспорт електронів у хлоропластах, оскільки компоненти їх електронтранспортного ланцюга знаходяться в повністю відновленому стані. Також знижується активність фосфорилування на субстратному рівні, а окисне фосфорилування в мітохондріях також інгібується внаслідок нестачі O_2 . Гідрогеназна реакція забезпечує окиснення компонентів електронтранспортного ланцюга хлоропластів, що активує процеси фотофосфорилування і фотолізу H_2O ; O_2 , що утворюється, стає доступним для метаболічних процесів у клітинах, зокрема, для забезпечення відтоку електронів у процесі окисного фосфорилування в мітохондріях. Крім того, транспортування електронів у хлоропластах пов'язано з розщеп-

ленням крохмалю через активність НАД(Ф)Н-дегідрогенази (Nda2), що дає змогу гідрогеназній реакції також брати участь у регуляції гліколізу. Отже, індукція гідрогенази за недостатності поживних речовин в анаеробних умовах на світлі може бути одним із механізмів, який забезпечує виживання клітин у несприятливих умовах.

Роль крохмалю. Нестача сірки спричинює у *Chlamydomonas reinhardtii* збільшення вмісту крохмалю майже у 10 разів, при цьому знижується активність поділу клітин (Zhang et al., 2002). Активність фотосинтезу за нестачі сірки спадає повільніше, ніж у анаболічних процесах, відповідальних за поділ клітин, як наслідок, накопичується крохмаль. У гетеротрофних культурах ацетат є прямим субстратом дихання для мікроводоростей на аеробній стадії культивування на середовищі без сірки з метою отримання H_2 (Melis et al., 2000). Водночас утворення крохмалю забезпечує акумулювання енергії та відновних еквівалентів, які виникли у процесі фотосинтезу.

Значення катаболізму крохмалю у процесі утворення H_2 продемонстровано в ранніх працях М. Gibbs та співавт. (1986). Дослідники показали, що *Chlamydomonas reinhardtii*, адаптована до гетеротрофного росту, не поглинає ацетат протягом анаеробної (гідрогенпродукувальної) стадії культивування на середовищі без сірки (Melis et al., 2007). Це засвідчує, що для забезпечення продукування H_2 необхідний як анаеробний, так і аеробний катаболізм крохмалю для ефективного поглинання кисню, який утворюється у процесі фотолізу води внаслідок реактивації ФС II. Також відновні еквіваленти, утворені в результаті катаболізму крохмалю, беруть участь у нефотохімічному відновленні пулу Пх (Hemschemeier et al., 2008). Безкрохмальні мутанти *C. reinhardtii* *stab* і *sta7* продукують менше H_2 на середовищі без сірки порівняно з диким типом (Posewitz et al., 2004), що доводить важливу роль крохмалю у створенні та підтриманні анаеробіозу, а також у забезпеченні відновними еквівалентами електронтранспортного ланцюга хлоропластів.

Разом з іншими компонентами системи фотосинтезу синтез RUBISCO пригнічується насамперед за культивування на середовищі без сірки. Зниження активності реакцій циклу Кальвіна сприяє накопиченню відновних еквівалентів і відповідно відновленню компонентів електронтранспортного ланцюга хлоропластів. Перевідновлення пулу Пх, як відомо, призводить до переходу фотосинтетичної мембрани зі стану I у стан II, в якій збільшується

активність ФС I (Allen et al., 1981). Продемонстровано, що нестача сірки індукує збільшення розміру антени ФС I у *Chlamydomonas reinhardtii* (Wykoff et al., 1998). Перехід зі стану I до стану II в *C. reinhardtii* в анаеробних умовах індукує циклічний транспорт електронів на середовищі без сірки (Finazzi et al., 2002).

Протягом анаеробної (гідрогенпродукувальної) фази циклічне і лінійне (через гідрогеназу) транспортування електронів можуть конкурувати між собою за відновлений Фд, уперше таку гіпотезу запропонували O. Kruse та співавт. (2005). Згодом вони встановили, що мутантний штаб *stm6 Chlamydomonas reinhardtii* не здатний до переходу зі стану I у стан II і відповідно характеризується низьким циклічним транспортом електронів, продукує більше H_2 порівняно зі штамом дикого типу. Водночас такі мутанти мають підвищений рівень мітохондріального дихання і відповідно накопичення H_2 . Досі незрозуміло, який процес є причиною продукування H_2 у штаму *stm6*: зменшення циклічного транспорту електронів або збільшення накопичення крохмалю.

4.2. Анаеробний метаболізм

У процесі темної ферментації *Chlamydomonas reinhardtii* продукує відносно незначну, але помітну кількість H_2 (Gfeller, Gibbs, 1984; Philipps et al., 2011), очевидно, в результаті активності піруватферидоксинредуктази (ПФР). Така реакція відбувається *in vitro*, реакційна суміш, яка містить ПФР, Фд, HydA1, піруват, коензим А, продукує H_2 в лабораторних умовах (Noth et al., 2013). Варто зазначити, що оксалоацетат крім пірувату може бути субстратом для ПФР-мікроводоростей. Чи активний такий ПФР-Фд-HydA1 шлях *in vivo* досі невідомо, тому що мутант ПФР1 поки не отриманий. Оскільки ПФР і піруватформіатліаза (ПФЛ) конкурують за утилізацію пірувату, було висунуто припущення, що пригнічення активності ПФЛ збільшить частку пірувату, утилізованого ПФР, а відповідно, і вміст відновленого Фд та утворення H_2 , проте дослідження у різних лабораторіях показали неоднозначні результати. Так, в одному з досліджень мутанти ПФЛ1 дійсно продукували більше H_2 у темряві (Philipps et al., 2011), але менше за інших умов (Catalanotti et al., 2012). С. Catalanotti та співавт. (2012) висловили припущення, що підвищений рівень утворення CO_2 і етанолу в мутанта ПФЛ1 спостерігається у зв'язку з посиленням активності піруватдекарбоксилази (ПДК). Вона кодується геном *PDC3* (Cre03.g165700) і локалізована в цитозолі (Burgess et al.,

2016). У мутанта ПФЛ1, який описаний С. Catalanotti та співавт. (2012), підвищена експресія гена ПДК порівняно з диким типом, тоді як експресія гена ПФР менш виражена. Оскільки єдиний ензим, який каталізує утворення етанолу в *C. reinhardtii*, — це алкогольдегідрогеназа (АДГ1) (Magneschi et al., 2012), то, очевидно, що вона каталізує також відновлення ацетальдегіду, що утворюється внаслідок декарбокسينування піривату за участю ПДК. У зв'язку з цим мутант ПФЛ1 має підвищений рівень експресії гена АДГ1 (Catalanotti et al., 2012).

Протеїни, характерні для аноксії, такі як HYDA1, HYDA2, HYDEF і HYDG, накопичуються клітинами у темряві за наявності O_2 , проте їх вміст поступово зменшується в темряві в аеробних умовах (Hemschemeier et al., 2013).

Встановлено, що вміст HYDA1 і HYDA2 та інших характерних для аноксії протеїнів більший в адаптованих до темряви клітин порівняно з такими, що росли на світлі (Duanmu et al., 2013). Також існує добовий ритм активації генів цих протеїнів у синхронізованій культурі (Whitney et al., 2011; Zones et al., 2015). Однак, чи бере участь циркадний годинник у регуляції їхньої активності, досі невідомо, оскільки активніша експресія у темряві спостерігається також у несинхронізованих культур (Duanmu et al., 2013; Hemschemeier et al., 2013). Цілком можливо, що активність фотосинтетичного апарату та відповідно вміст O_2 у клітинах (Whitney et al., 2011) регулюють експресію анаеробних генів. Дослідження з використанням інгібітора ФС II 3-(3,4-дихлорфеніл)-1,1-диметилсечовини (DCMU) дали змогу встановити вплив різкого зменшення виділення O_2 на експресію генів анаеробного метаболізму *Chlamydomonas reinhardtii*. Додавання DCMU не змінювало експресію генів HYDA1, HYDEF і ПФР в анаеробних умовах за освітлення, проте експресія інших генів анаеробного метаболізму, що беруть участь у катаболізмі амінокислот, активується в разі додавання DCMU на світлі (Hemschemeier et al., 2013). У зв'язку з цим у процесі регуляції експресії генів анаеробного метаболізму беруть участь різноманітні внутрішньоклітинні сигнали, такі як вміст O_2 , окисно-відновний потенціал, співвідношення НАД(Ф)Н/НАД(Ф) і НАД(Ф)Н/АТФ. Ген протеїну HYDA1 у клітинах *C. reinhardtii* може активуватись в аеробних умовах додаванням β -меркаптоетанолу в середовище культивування (Hemschemeier et al., 2013). Експресія гена протеїну HYDA1 була нижча в безкрохмального мутанта, дефектного за ізоамілазою (*sta7*) або АДФ-глюкозопірофосфорилазою (*sta6*), за умов анаеробного культивування у темряві (Posewitz et al., 2004).

4.3. Хлоропластне дихання

Хлоропластним диханням (далі — хлородихання) називають процес поглинання кисню у хлоропласті. Водночас НАД(Ф)Н окиснюється внаслідок зміни окисно-відновного стану пулу Пх (рис. 4.2, див. вклейку). Уперше процес хлородихання описав Р. Bennoun (1982). Згодом було ідентифіковано термінальну хлоропластну оксидазу (РТОХ) (Carol et al., 1999), локалізовану з частини строми на тилакоїдній мембрані (Lennon et al., 2003). Аналіз послідовності нуклеотидів у генах РТОХ та альтернативної оксидази мітохондрій (АОХ) виявив їх спорідненість. Геноми вищих рослин і ціанобактерій містять лише один ген РТОХ. Червоні, бурі та зелені водорості, а також *Chlamydomonas reinhardtii* мають дві копії гена. РТОХ використовує відновлений пластохінон (ПхН₂) як відновник і донор електронів, одночасно відновлюється О₂ з утворенням Н₂О (Josse et al., 2003; Yu et al., 2014). Пул Пх відновлюється у процесі фотосинтезу за освітлення або за участю Nda2 (НАД(Ф)Н-дегідрогеназа тип 2) у темряві. За культивування у темряві *C. reinhardtii* редокс-стан пулу Пх залежить від доступності повітря. В аерованій культурі окиснення пулу Пх становить 70 % (Houille-Vernes et al., 2011), без доступу О₂ він відновлюється (Bennoun, 1982). Такий вплив можна пояснити індукуванням гліколізу та розщепленням крохмалю у відповідь на вичерпання запасів АТФ. У *C. reinhardtii* гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа локалізована у хлоропластах, тому за активації гліколізу в процесі анаеробного метаболізму у строми хлоропласта збільшується вміст НАДФН (Terashima et al., 2011; Johnson, Alric, 2012). НАДФН, у свою чергу, відновлює пул Пх за участю Nda2, в умовах анаеробіозу він не може бути окиснений за участю РТОХ.

У дослідженнях культур *Chlamydomonas reinhardtii*, дефіцитних за джерелом азоту, з'ясовано, що хлородихання пов'язано з клітинним метаболізмом (Wei et al., 2014; Saroussi et al., 2016). За міксотрофного росту на середовищі без азоту (за наявності ацетату як органічного джерела вуглецю) швидко втрачається здатність до фіксації СО₂ в результаті руйнування RUBISCO, а також цитохромного комплексу *b₆f*.

За таких умов автори (Wei et al., 2014) спостерігали підвищення активності Nda2 та РТОХ2 і відповідно хлородихання. Ці зміни можна проінтерпретувати як зміну функції тилакоїдних мембран із фотосинтетичного типу метаболізму на дихальний з

метою підтримання балансу вуглецевого і азотного живлення. За фотоавтотрофного росту (без додавання ацетату) на живильному середовищі без джерела азоту активність фіксації CO_2 у циклі Кальвіна не пригнічувалась. Проте за таких умов експресія генів *PTOX* і *Nda2* також підвищилась (Saroussi et al., 2015).

Дані, які підтверджують участь ензимів хлородихання в забезпеченні функціонування електронного транспорту в хлоропластах у темряві, були отримані в експериментах із реєстрації індукції флуоресценції хлорофілу і зміни його спектрів за низьких температур із використанням мутантів *PTOX* (Houille-Vernes et al., 2011; Takahashi et al., 2013). Останнім властивий більш відновлений стан пулу *Px* у темряві, це зумовлює перерозподіл мобільних компонентів СЗК II між фотосистемами, що опосередковано активністю кінази *Stt7* (Dere'ge et al., 2003). На відміну від штамів дикого типу, в яких у темряві мобільні компоненти антени асоційовані з ФС II (стан I), у мутантів *PTOX* вони асоційовані з ФС I (стан II). Також через перенесення з темряви на світло у таких мутантів суттєво знижений квантовий вихід ФС II порівняно зі штамом дикого типу, очевидно, у зв'язку з відновленим станом пулу *Px*, який є акцептором електронів для ФС II. У підсумку зазначимо, що основні функції хлоропластного дихання в темряві полягають в регуляції окисно-відновного стану пулу *Px* і забезпеченні готовності фотосинтетичного апарату до перенесення мікрободоростей на світло.

PTOX пов'язана з лінійним електронним транспортом у хлоропластах і відповідно з активністю ФС II. У процесі окиснення PxH_2 вона бере участь у так званому короткому циклі води. Першою реакцією цього циклу є окиснення води у водоокисному комплексі ФС II, що супроводжується виділенням протонів у люмен, електрони одночасно відновлюють пул *Px* на стромальній частині ФС II. *PTOX* окиснює PxH_2 , при цьому O_2 відновлюється з утворенням молекули води у стромі хлоропласту.

У відповідь на стрес *PTOX* бере участь у специфічних реакціях і виконує роль запобіжного клапана, який захищає електрон-транспортний ланцюг хлоропластів від перевідновлення і відповідно від ушкодження реакційними сполуками кисню. Участь хлородихання у відведенні надлишку електронів залишається дискусійним. Ця функція *PTOX* не співвідноситься з кінетичними параметрами лінійного електронного транспорту в хлоропластах. У кінетичних дослідженнях *in vivo* швидкість транспортування електронів за участю хлородихання варіює в межах від

0,3 e/c на 1 ФС II для томату (Trouillard et al., 2012) до 5 e/c на 1 ФС II у *Chlamydomonas reinhardtii* (Houille-Vernes et al., 2011), тоді як загальне транспортування електронів по електронтранспортному ланцюгу хлоропластів за умови насичувального світла становило близько 150 e/c на 1 ФС II (Alric et al., 2010). Невідповідність таких кінетичних параметрів уможливує припущення, що РТОХ не спроможна ефективно протидіяти швидкому зростанню відновного потенціалу компонентів електронтранспортного ланцюга хлоропластів (Trouillard et al., 2012; Nawrocki et al., 2014). На відміну від низьких кінетичних показників РТОХ, отриманих *in vivo* з використанням спектроскопічних досліджень, значно вищі показники спостерігали *in vitro* — 320 e/c на 1 РТОХ (Yu et al., 2014). Також ген РТОХ1 від *C. reinhardtii* індукується в рослинах тютюну за експозиції на інтенсивному світлі, проте не в листках рослин, які зростали за низької інтенсивності освітлення (Feilke et al., 2015). Запропоновано нову гіпотезу, що узгодила такі різнобіжності (Krieger-Liszka, Feilke, 2016). Згідно з нею, РТОХ рН-залежно асоціюється зі стромальною частиною тилакоїдної мембрани, інтенсивне світло зумовлює створення трансмембранного градієнта рН, в результаті у стромі створюється лужне середовище, що є умовою для приєднання та активації РТОХ. За низької інтенсивності світла рН стромі зміщується у кислий бік, що спричинює дисоціацію ензиму з тилакоїдної мембрани і втрату його активності, оскільки втрачається його зв'язок із субстратом (PхН₂).

4.4. Циклічне транспортування електронів

Лінійне транспортування електронів у хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* забезпечує синтез 1,38 молекули АТФ на 1 молекулу НАДФН (Meier et al., 2004; Alric, 2010). Проте для функціонування циклу Кальвіна необхідне співвідношення становить 3 молекули АТФ на 2 молекули НАДФН. Потреба в АТФ може бути збільшена до 4 АТФ на 2 НАДФН у зв'язку із забезпеченням роботи карбонконцентрувального механізму (ККМ), активного за атмосферної концентрації CO₂ у *C. reinhardtii* (Lucker, Kramer, 2013). Такий дефіцит АТФ відносно НАДФН за умови активного фотосинтезу компенсується активністю циклічного транспорту електронів (ЦТЕ) через ФС I (див. рис. 4.2, вклейка).

У *Chlamydomonas reinhardtii* НАДН-дегідрогеназа другого типу (Nda2) забезпечує НАД(Ф)Н-залежний компонент ЦТЕ, тобто не-

фотохімічне відновлення пулу Пх (Mus et al., 2005; Jans et al., 2008). Nda2 локалізована зі стромальної частини тилакоїдної мембрани. Вона складається з двох Rossmann-подібних доменів (β -складчастий шар — α -спіраль — β -складчастий шар), один з яких містить флавін мононуклеотид (ФМН), а інший приєднує НАД(Ф)Н. In vitro рекомбінантна Nda2 каталізує відновлення пулу Пх з переважним використанням НАДН як субстрату (Desplats et al., 2009; Peltier et al., 2016). In vivo трансгідрогеназа може конвертувати НАДФН до НАДН, який згодом може бути окиснений Nda2 (Terashima et al., 2011). Активність Nda2 можна регулювати із застосуванням Ca^{2+} (Hochmal et al., 2015), також Nda2 зазнає посттрансляційного фосфорилування (Wagner et al., 2007).

Феридоксинзалежний ЦТЕ функціонує через Фд-залежне відновлення пулу Пх. Точний механізм функціонування Фд-залежного ЦТЕ, принаймні у *Chlamydomonas reinhardtii*, до кінця не зрозумілий, оскільки немає прямих доказів того, який саме компонент проявляє Фд-залежну активність. Установлено, що протеїни PGR5 і PGRL1 забезпечують функціонування Фд-залежного ЦТЕ. PGR5 здатний приєднуватись до стромальної частини тилакоїдної мембрани і, очевидно, за фізіологічних умов позитивно заряджений (Munekage et al., 2002). PGRL1 складається з двох трансмембранних доменів, а також містить негативно заряджену N-кінцеву петлю, яка, вочевидь, взаємодіє з позитивно зарядженими ділянками PGR5, що утворює гетеродимер. PGRL1 за наявності тіоредоксину здатен також утворювати гомодимери. Для індукції синтезу PGR5 потрібна PGRL1, тоді як PGR5 забезпечує стабільність PGRL1 (DalCorso et al., 2008), який окиснює відновлений Фд у комплексі з PGR5. При редоксзалежній взаємодії PGRL1 з PGR5 індуються конформаційні зміни, які сприяють транспортуванню електронів від Фд до PGRL1 (Hertle et al., 2013), проте для *C. reinhardtii* відсутні прямі докази того, що PGRL1 in vivo функціонує як ФдР. Хоча на молекулярному рівні функції PGRL1 і PGR5 недостатньо досліджені, фенотипи мутантів PGRL1/PGR5 вивчено детальніше.

4.5. Пул феридоксину

Феридоксин — дрібний водорозчинний протеїн, що містить залізо-сірковий кластер типу [2Fe-2S], локалізований у стромі хлоропласту. За лінійного транспортування електронів у хлоропластах він приймає електрони від ФС I і переносить їх на ФдР

для забезпечення синтезу НАДФН. Однак Фд бере участь в інших метаболічних процесах, залежних від електронів електрон-транспортних ланцюгів, водночас він виконує роль депо вільних електронів (рис. 4.3). Фд1 отримує електрони (e^-) від ФС I та від ПФР і передає їх на різні акцептори електронів, такі як сульфїт-редуктаза, Фд1-тіоредоксинредуктаза, Фд1-НАДФ-редуктаза, глутамат синтетаза, десатураза жирних кислот і гідрогеназа. Дослідження засвідчують, що нітритредуктаза отримує електрони від Фд2 (Terauchi et al., 2009), але участь Фд1 також можлива (штрихова лінія на рис. 4.3). ЦТЕ навколо ФС I відбувається за умови взаємодії Фд1 з PGR5/PGRL1. Специфічний розподіл електронів від електронтранспортного ланцюга хлоропластів між окремими метаболічними шляхами відбувається за участю специфічних для кожного шляху ізоформ Фд. У геномі *Chlamydomonas reinhardtii* локалізовано гени 13 потенційних ізоформ Фд (Yang et al., 2015), продукти 11 з яких знаходяться у хлоропластах. Нині детальніше вивчено лише 6 з них (Фд1—Фд6). Згідно з даними філогенетичного аналізу, Фд1 і Фд5 відносять до хлоропластних, або так званих феридоксинів листкового типу, тоді як Фд2 близький до Фд, локалізованих у кореневій системі судинних рослин (Terauchi et al., 2009). Найдивергентніші в еволюційному аспекті є Фд3, Фд4 і Фд6, вони складають окрему групу Фд бактеріального типу. За стандартних умов росту Фд1 значно переважає інші ізоформи: частка мРНК Фд1 становить 98 % транскрипційного пулу Фд.

Співвідношення ізоформ Фд може змінюватись залежно від умов навколишнього середовища, наприклад за нестачі міді, проте навіть за таких умов уміст Фд1 становить близько 50 % загального пулу (Terauchi et al., 2009). Також для ізоформи Фд1 характерна участь у найрізноманітніших метаболічних шляхах. Основна її функція полягає у підтриманні лінійного транспорту електронів у мембранах хлоропластів, що реалізується в результаті ефективної взаємодії з ФдР, а також із гідрогеназою, внаслідок чого підтримується лінійний транспорт електронів в анаеробних умовах (Godaux et al., 2015).

Феридоксин 1 бере участь у сигнальній системі тіоредоксину і відповідно в усіх процесах, пов'язаних із тіоредоксином, серед яких: сигнальна система ROS, ROS-детоксикація, альтернативний потік електронів, пов'язаний з реакцією Мелера, а також регуляція вуглецевого обміну та обмін відновними еквівалентами між хлоропластом та іншими органелами. Також імовірна участь

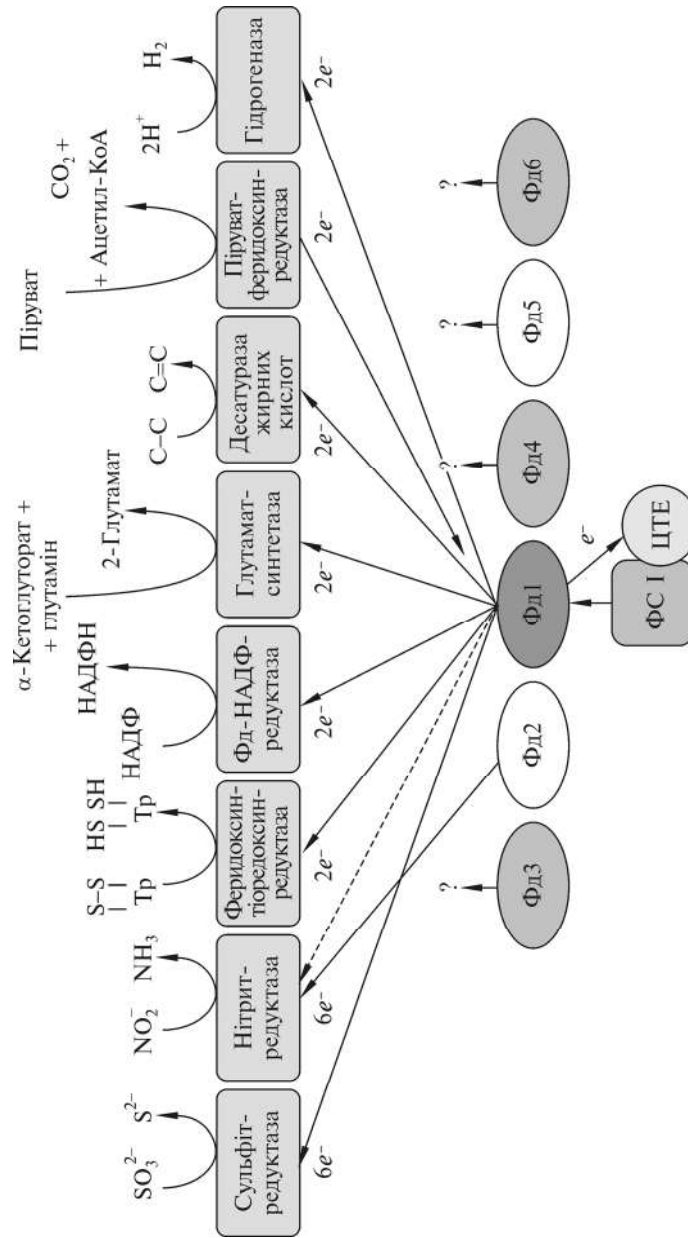


Рис. 4.3. Різноманітні метаболічні шляхи, пов'язані з феридоксином (Фд) (Nemshcheteiger et al., 2011)

Фд1 у процесах біосинтезу жирних кислот, асиміляції азоту і темної ферментації. Фд2 подібний за структурою до Фд1 (Boehm et al., 2015). Редокс-потенціал Фд2 більший на 70 мВ порівняно з Фд1, хоча обидві ізоформи беруть участь у подібних метаболічних шляхах. У разі взаємодії з гідрогеназою *in vitro* ізоформа Фд2 переносить електрони повільніше, ніж Фд1 (Peden et al., 2013; Boehm et al., 2015). Подібна ситуація характерна для взаємодії з ФдР, ізоформа Фд1 також ефективніша (Peden et al., 2013). Однак в іншому дослідженні обидві ізоформи Фд *Chlamydomonas reinhardtii* з однаковою швидкістю транспортували електрони на ФдР, а Фд2 мала значно вищий афінитет і відповідно була ефективнішим донором електронів (Boehm et al., 2015). Інші відмінності між цими двома ізоформами полягають у тому, що Фд2 відповідає за асиміляцію азоту, оскільки є ефективнішим донором для нітритредуктази, ніж Фд1. Протеїн ANR1 бере участь у ЦТЕ і його експресія активується в анаеробних умовах (Terashima et al., 2011), також він здатен взаємодіяти з Фд2.

4.6. Використання генної інженерії в технології отримання водню

Методи прямої та обернено направленої генетичної трансформації дають змогу ідентифікувати нові ефективні продуценти водню. Для багатьох гідрогенпродукувальних мікроводоростей доступний широкий набір підходів і методів для проведення інсерційного мутагенезу. Для здійснення генних модифікацій необхідними умовами є наявність мікроводоростей з розшифрованим геномом і відповідних векторних систем для забезпечення перенесення генів, методів трансформації генетичного матеріалу та способів індукції гетерологічної експресії генів у результаті активації специфічних промоторів. Нині відома лише одна зелена мікроводорість — *Chlamydomonas reinhardtii*, що відповідає всім цим вимогам. Проте підходи направлено мутагенезу для *C. reinhardtii* не завжди ефективні, оскільки в ядрі відбувається репарація модифікованих хромосом. Редагування геному з використанням методу Crispr/Cas9 позбавлене таких недоліків і може застосовуватись для *C. reinhardtii*, але поки не достатньо апробовано.

Отримання мутантів способом рандомного мутагенезу. Найрезультативніший підхід за останні кілька років, що дав змогу виявити нові ефективні штами продуцентів водню, — метод ран-

домного інсерційного мутагенезу з подальшим скринінгом отриманих мутантів. Уперше він описаний для *Chlamydomonas reinhardtii* (Posewitz, 2004). Мутанти, отримані із застосуванням цього методу, перевіряли на здатність до утворення H_2 з використанням хемохромних сенсорів. У результаті виділили штам *stm6*, який характеризується наявністю зменшеного розміру СЗК ФС II і пригніченим циклічним транспортом електронів через ФС I. Такі зміни метаболізму забезпечують ефективніше поглинання енергії світла, а інгібування циклічного електронного транспорту в хлоропластах уможливує направлення потоку електронів на гідрогеназу. Такі зміни забезпечують штаму *stm6* здатність продукувати водень у 9 разів ефективніше, ніж контрольний штам дикого типу.

У 2008 р. Т. Rühle та співавт. (2008) розробили протокол для відбору мутантів зі зниженим відношенням інтенсивності фотосинтезу до дихання з метою отримання штамів *Chlamydomonas reinhardtii*, здатних продукувати H_2 за оптимальних умов росту (аеробно і без дефіциту сірки). У результаті скринінгу 9 тис. мутантів з використанням реакції Вінклера відібрано штами з відношенням фотосинтезу до дихання близько одиниці, тобто у середовищі культивування таких штамів створюються анаеробні умови, що забезпечує індукцію синтезу гідрогенази. Таким способом був отриманий мутант *arg1*, який продукував гідрогеназу за нормальних умов, проте її активність не забезпечувала виділення водню (Rühle et al., 2008).

У 2011 р. D. Tolleter і колеги виділили мутант *pgr11* методом скринінгу групи колоній *Chlamydomonas reinhardtii* після інсерційного мутагенезу на основі особливостей кривої індукції флуоресценції хлорофілу. У мутанта *pgr11* інактивований ген пластохінонферидоксинредуктази. У результаті в нього наявний неактивний PGR11/PGR5-залежний циклічний транспорт електронів через ФС I, що зумовлює переважне надходження електронів до гідрогенази за участю Фд. Внаслідок таких змін мутант *pgr11* здатний продукувати у 3–4 рази більше H_2 , ніж мікроводорості дикого типу (табл. 4.1). Встановлено, що збільшене виділення H_2 зумовлене не зміною активності гідрогенази, а зростанням надходження електронів від Фд (Tolleter et al., 2011).

Інший мутант *pgr5* отримано у 2005 р. (Dent et al., 2005), ген *pgr5* кодує регулятор протонного градієнта 5, тоді як ген *pgr11* кодує протеїн, подібний до протонного регулятора градієнта. Продукти генів *pgr11* і *pgr5* є трансмембранними білками у тилакоїдних мембранах хлоропласту, які входять до складу суперкомплек-

4.6. Використання генної інженерії в технології отримання водню

Таблиця 4.1. Продуктивність і умови культивування мутантів, отриманих методами генної інженерії

Вид	Штам	Умови росту	Приріст продуктивності порівняно з вихідним штамом	Літературне джерело
<i>C. r</i>	Отриманий: pgr1/pgr5 Вихідний: CC124	60 мк Е/(м ² · с) 15 мкг Хл/мл 216 год	8,5 (100 мл/л)	Steinbeck et al., 2015
<i>C. r</i>	Отриманий: Fnr Вихідний: CC400	200 мк Е/(м ² · с) 25 мкг Хл/мл 120 год	1,5 (383 мл/л)	Sun et al., 2013
<i>C. r</i>	Отриманий: LNCBM1, 2 і 3 Вихідний: slm6glc4	450 мк Е/(м ² · с) 14,3 мкг Хл/мл 188 год	1,8 (–200 мл/л)	Oey et al., 2013
<i>C. DT</i>	Отриманий: psbO Вихідний: C. DT	30 мк Е/(м ² · с) 1 · 10 ⁷ кл/мл 120 год	~12 (–30 мл/л)	Lin et al., 2013
<i>C. r</i>	Отриманий: D1 заміна амінокислоти Вихідний: WT(11/32b)	70 мк Е/(м ² · с) 12 мкг Хл/мл 350 год	~17 (–30 мл/л)	Torzillo et al., 2009
<i>C. r</i>	Отриманий: pgr1 Вихідний: CC124	200 мк Е/(м ² · с) 4 · 10 ⁶ кл/мл 200 год	~4 (168 мл/л)	Tollete et al., 2011
<i>C. r</i>	Отриманий: з симпортером гексоз Вихідний: Stm6	100 мк Е/(м ² · с) 25 мкг Хл/мл 300 год	1,5 (540 мл/л)	Doebbe et al., 2007
<i>C. r</i>	Отриманий: MOC1 Вихідний: CC1618	100 мк Е/(м ² · с) 26 мкг Хл/мл 300 год	8,9 (60 мл/л)	Kruse et al., 2005
<i>C. r</i>	Без модифікації Вихідний: CC125	200 мк Е/(м ² · с) 6 · 10 ⁶ кл/мл 150 год	140 мл/л	Melis et al., 2000
<i>C. r</i>	Без модифікації Вихідний: CC124	300 мк Е/(м ² · с) 9–12 мкг Хл/мл 140 год	До 200 мл/л	Kosourov et al., 2002
<i>C. r</i>	Без модифікації Вихідний: CC125	70 мк Е/(м ² · с) 25– 28 мкг Хл/мл 190 год	565 мл/л	Kosourov et al., 2012

Примітка. *C. r* — *Chlamydomonas reinhardtii*; *C. DT* — *Chlorella* sp.; Хл — загальний хлорофіл; Е — ейнштейн.

су разом із СЗК і ФС I, феридоксинпластохінонредуктазою і цитохромним комплексом b_6f . За участю такого суперкомплексу циклічно транспортуються електрони через ФС I, що забезпечує регуляцію співвідношення НАДФН:АТФ у клітині (Johnson et al., 2014). Фенотипи у мутантів *pgrl1* і *pgr5* загалом подібні. У результаті інгібування циклічного електронного транспорту в таких мутантів знижується NPQ, а саме складова qE . Фотосинтетичний апарат втрачає здатність до швидкої адаптації під час зміни освітлення. Відмінність між *pgrl1* та *pgr5* полягає в тому, що за високої густини потоку квантів (200 мкмоль фотонів/ $(\text{м}^2 \cdot \text{с})$) у мутанта *pgrl1* відбувається фотоінгібування ФС I в результаті перевідновлення її акцепторної частини. Щодо здатності продукувати H_2 , то мутант *pgr5* є кращим продуцентом, ніж *pgrl1* і подвійний мутант *pgr5/pgrl1* (Steinbeck et al., 2015). Це засвідчує, що надмірне інгібування циклічного електронного транспорту, як у разі *pgr5/pgrl1*, негативно впливає на продукування H_2 за умов анаеробіозу та нестачі сірки. Також мутант *pgr5* характеризується інтенсивним мітохондріальним диханням (Johnson et al., 2014). У зв'язку з цим в умовах утворення H_2 мутант *pgr5* швидше створює анаеробні умови, необхідні для індукування синтезу гідрогенази. Автори пояснюють високу ефективність продукування H_2 мутантом *pgr5* вищою активністю ФС II, оскільки чим швидше культура досягає анаеробіозу, тим більше в неї залишається функціонально активних комплексів ФС II.

Крім отримання нових мутантів із покращеною здатністю продукувати H_2 розроблено методи скринінгу колоній мутантів *Chlamydomonas reinhardtii*, які дають змогу швидко і кількісно визначати утворення H_2 мікродоростями (Katsuda et al., 2006). Так, результати дослідження показали, що НАД(Ф)Н-флуоресценція корелює з потенціальною активністю гідрогенази і зростає за умов анаеробіозу на безсірковому середовищі. Кількісно здатність до утворення H_2 можна оцінити реєстрацією НАД(Ф)Н-флуоресценції *in vivo* (White et al., 2013). Також H_2 -продукувальні колонії мутантів можна ідентифікувати з використанням *Rhodobacter capsulatus*. Ці бактерії містять протеїн, який за взаємодії з H_2 флуоресціює зеленим кольором, тому за сумісного культивування на агарі такі колонії мікродоростей можна легко ідентифікувати візуально.

Сайт-специфічний мутагенез у *Chlamydomonas reinhardtii* обмежений лише кількома методами і молекулярними інструментами, нині його використовують переважно для геному хлоро-

пласта (Oh et al., 2011; Noone et al., 2017). Так, G. Torzillo та спів-авт. (2009) отримали мутант з інактивованим білком D1 (Faraloni et al., 2010). Порівняно з вихідним штамом цей мутантний штам продукував у 17 разів більше H_2 і накопичував наприкінці продуктивної фази близько 500 мл/л культури (Scoma et al., 2012b). Детальний біохімічний аналіз дав змогу встановити, що такий мутантний штам має покращену здатність до транспортування електронів на гідрогеназу, що виражається у збільшенні ефективності конверсії сонячної енергії до 3 % (Torzillo et al., 2009).

Інший колектив авторів отримав мутант Y67A методом точкової мутації хлоропластного гена, який кодує малу субодиницю RUBISCO. Такий мутант характеризується низькою активністю фотосинтезу і відповідно низьким виділенням O_2 на світлі, пригніченим ростом і ранньою активацією гідрогенази як на середовищі без сірки, так і на збагаченому сульфатами середовищі. Мутант Y67A продукував у 10–15 разів більше H_2 на середовищі без сірки у 9 разів більше на повному середовищі культивування (Pinto et al., 2013).

Пришвидження виділення H_2 у *Chlamydomonas reinhardtii* вдалося досягти також способом надекспресії хлоропластної НАД(Ф)Н-дегідрогенази (Nda2) (Desplats, 2009), яка бере участь у відновленні пулу Пх у темряві й забезпечує таким чином непрямий шлях утворення H_2 . Встановлено зв'язок між рівнем експресії гена Nda2 і здатністю до утворення H_2 : за підвищення експресії Nda2 відбувається окиснення відновних еквівалентів, утворених у результаті розщеплення крохмалю і відповідно збільшення швидкості утворення H_2 (Mignolet et al., 2012).

Методом негомологічної рекомбінації і рандомної вставки відповідних генів отримано подвійні та потрійні мутанти *Chlamydomonas reinhardtii* на основі вихідного штаму stm6: stm6glc4, stm6glc4T7 і stm6glc4LO1, які характеризуються прискореним накопиченням біомаси і швидким утворенням H_2 порівняно з вихідним штамом stm6 (Grewe et al., 2014). Спочатку отримали штам stm6glc4 з вбудованим симпортереом гексоз від *Chlorella kessleri*, що дало змогу культивувати *C. reinhardtii* гетеротрофно на середовищі з глюкозою (Doebbe et al., 2007). За міксотрофного культивування на середовищі без сірки з 1 мМ глюкози штам stm6glc4 продукував на 150 % більше H_2 , ніж штам stm6, при цьому 33 % енергії для утворення H_2 надходило в результаті окиснення глюкози (Doebbe et al., 2007). Штам stm6glc4T7 характери-

зується зменшеним розміром СЗК ФС II на 17 %. Він краще росте за інтенсивного освітлення — 800 мкмоль фотонів/(м² · с), а також накопичує на 50 % більше Н₂ порівняно зі штамом *stm6glc4* (Beckmann et al., 2009). Мутант *stm6glc4LO1* характеризується зниженою експресією генів відразу трьох протеїнів СЗК ФС II. У результаті культура цього мутанту має характерний блідо-зелений колір, що забезпечує краще проникнення світла в її товщу. Така зміна фотосинтетичного апарату забезпечує інтенсивніший ріст культури і продукування Н₂ (до 400 мл/л) порівняно із *stm6glc4* (Oey et al., 2013).

Крім *Chlamydomonas reinhardtii* інші зелені мікроводорості рідко використовують для генетичної трансформації з метою підвищення ефективності утворення Н₂ (Lin et al., 2013).

**НАКОПИЧЕННЯ НЕЙТРАЛЬНИХ ЛІПІДІВ
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

Терміном «ліпід» традиційно позначають різноманітні групи гідрофобних або амфіфільних сполук, які можуть бути структурно і функціонально не пов'язані між собою, але мають спільну властивість добре розчинятись в органічних розчинниках і зазвичай погано — у воді. Ці сполуки виконують низку важливих біологічних функцій у клітинах, у тому числі як структурні компоненти біологічних мембран (фосфогліцероліпиди, галактогліцероліпиди, стероли, сфінголіпиди), запасні речовини (триглицериди) і сигнальні молекули (фосфоінозитолі, оксиліпиди) (Соловченко, 2012). Ліпиди класифікують на основі їх хімічного складу і структури (Harwood, Jones, 1989; Harwood, Scrimgeour, 2007), властивостей самоорганізації у водних системах (Small, 1968) або за біосинтетичним походженням (Fahy et al., 2005). З погляду метаболізму розрізняють ліпиди, до їх складу входять жирні кислоти, які називають також ацилоліпідами, — це переважна більшість ліпідів, виявлених у клітинах (здебільшого гліцероліпиди і сфінголіпиди), а також ліпиди, що мають інше біосинтетичне походження: стерини, преноли, полікетиди (Li-Beisson et al., 2015). Більшість ацилоліпідів у клітинах представлена гліцероліпідами, в яких гліцерин етерифікований з трьома залишками жирних кислот у разі триацилгліцеролів (ТАГ) — нейтральних гліцероліпідів, або з двома залишками жирних кислот і полярною групою — полярних гліцероліпідів, останні є важливими структурними компонентами мембран клітини. Полярні ліпиди мікробдоростей є предметом численних детальних досліджень, оскільки зміни якісного і кількісного складу цих сполук тісно пов'язані зі станом мембран хлоропластів. Навпаки нейтральним ліпідам, у тому числі ТАГ мікробдоростей, приділено значно меншу увагу. Раніше вважали, що цей клас ліпідів переважно виконує функцію запасання речовин та енергії і, як наслідок, характеризується відносно низькою метаболічною активністю. Останнім часом напрям досліджень змінюється. Так, значно збільшилась кількість

праць, присвячених ТАГ та їх ролі у фізіології клітин мікроводоростей. Отримано цілу низку свідчень щодо різноманітності функцій ТАГ у процесах адаптації фотосинтезувальних організмів до різних чинників середовища: температури, інтенсивності освітлення, солоності.

5.1. Значення запасних ліпідів мікроводоростей для біотехнології

Зацікавленість ліпідами мікроводоростей зумовлена їх високим потенціалом як сировини для фармацевтичної, хімічної та харчової промисловості (Hu et al., 2008). Ліпіди низки видів мікроводоростей багаті на цінні ПНЖК, у тому числі незамінні для людини: лінолеву (C18:2), α -ліноленову (C18:3), арахідонову (C20:4), ейкозапентаєнову (C20:5), докозагексаєнову (C22:6) і деякі інші (Cardozo et al., 2007). Ліпіди мікроводоростей є важливим компонентом раціону як водних організмів (Brett, Muller, 1997), так і людини, слугують джерелом не лише будівельного матеріалу для клітинних мембран, а й попередників сигнальних і регуляторних молекул, також речовин із протизапальною і терапевтичною активністю (Hansen et al., 1997; Fan, Chapkin, 1998).

Мікроводорості — дуже велика й різноманітна група фотосинтезувальних організмів, які можна застосовувати як сировину для поновлюваних джерел енергії. Можливості їх використання в біоенергетиці почали досліджувати наприкінці 1950-х років після висловлення припущення про те, що вуглеводні фракції клітин водоростей придатні для видобутку газу метану методом анаеробного бродіння (Oswald, Golueke, 1960). За результатами досліджень, проведених у 1950-х і 1960-х роках, встановлено, що дефіцит ключових поживних речовин, таких як азот або сірка, у середовищі культивування є причиною накопичення ліпідних включень, з яких можна виробляти біопаливо. Ця концепція була підтримана під час нафтового ембарго у 1970-ті роки, що реалізувалось у прийнятті департаментом енергетики США програми дослідження водних видів мікроводоростей (ASP). Під егідою ASP дослідники зібрали більш як 3000 штамів мікроводоростей із різних середовищ існування. Після скринінгу на продукування ліпідів їх діапазон звузили до 300 найперспективніших, переважно представників Chlorophyceae (зелені водорості) і Bacillariophyceae (діатомові) (Wasw et al., 2014).

Одноклітинна зелена водорість *Chlamydomonas reinhardtii*, яку іноді називають «фотосинтезувальні дріжджі», за 100 років вивчення стала модельним об'єктом для генетичних, біохімічних і біотехнологічних досліджень. Вона швидко росте на простих мінеральних середовищах унаслідок фотосинтезу, має простий життєвий цикл, гаплоїдний геном у вегетативних клітинах, тому ефекти мутацій виявляються без потреби у наступних схрещуваннях.

У низці досліджень підтверджено, що азотне голодування індукує значне накопичення нейтральних ліпідів у клітинах *Chlamydomonas reinhardtii* та інших мікрободоростей (Chisti, 2007; Deng et al., 2009; Deng et al., 2011; Liu, Benning, 2013). Хоча *C. reinhardtii* не входить до видів з великим вмістом ліпідів, аналіз її метаболізму на молекулярному рівні може дати важливу інформацію про механізми накопичення ліпідів і крохмалю у відповідь на стрес для інших видів водоростей, перспективніших у застосуванні як сировини, але для яких молекулярні та генетичні інструменти більш обмежені (Grossman, 2000; Guschina, Harwood, 2006; Guschina, Harwood, 2009). *C. reinhardtii* — поширений модельний об'єкт для дослідження широкого діапазону біологічних функцій, у тому числі метаболізму крохмалю і ліпідів (Ball et al., 1991), утворення джгутиків (Marshall, 2008), фотосинтезу (Rochaix, 2002), синтезу сполук із біоенергетичним потенціалом (Kruse et al., 2005; Zolotareva et al., 2010) або стресу за мінеральним живленням (Moellering, Benning, 2010). Наявність секвенованого геному з коректним розшифруванням та інформацією про метаболічні шляхи збільшує пропускну здатність аналізу транскрипційного, протеомного і метаболічного профілів для з'ясування змін вуглецевого, азотного та ліпідного метаболізму (Merchant et al., 2007). На сьогодні дослідження транскрипційного профілю у відповідь на зміни умов навколишнього середовища застосовують найчастіше, тоді як аналіз протеому й метаболізму для мікрободоростей не такий поширений. Крім того, транскриптоміка, що базується на аналізі мікрочіпів, зворотній транскрипції і ланцюговій полімеразній реакції, не завжди супроводжується змінами на рівні трансляції та активності ензимів. Щоб отримати повніше уявлення про зміни метаболізму мікрободоростей у відповідь на стрес, потрібно паралельно досліджувати зміни транскриптому, метаболізму і активності ензимів у таких клітинах.

Вибухове зростання зацікавленості до ТАГ мікрободоростей в останнє десятиліття зумовлено визнанням їх перспективною сировиною для виробництва біопалива третього і четвертого поко-

лінь (Золотарьова та ін., 2008; Золотарьова, Шнюкова, 2010; Mutanda et al., 2011; Sharma et al., 2012). Найважливішою перевагою нових видів палива, що виробляються з ТАГ мікроводоростей, є «CO₂-нейтральність»: спалювання такого палива не підвищує загальну концентрацію цього парникового газу в атмосфері. Загалом у разі спалювання біопалива з мікроводоростей в атмосферу виділяється на 78 % менше CO₂, на 98 % менше сірковмісних сполук і на 50 % менше твердих часточок, ніж за спалювання палива на основі нафти і газу (Brown, Zeiler, 1993). Більш того, у разі промислового культивування мікроводоростей відкриваються широкі можливості для утилізації CO₂ і стічних вод, що містять органічні та мінеральні забруднювальні речовини (Park et al., 2011; Pittman et al., 2011). Важливо, що отримання біопалива з ТАГ мікроводоростей не загрожує продовольчій безпеці, оскільки установки для їх культивування не займають орних земель для вирощування сільськогосподарських культур (Poxleitner et al., 2006).

Накопичення запасних ліпідів у мікроводоростях регулюється цілою низкою чинників навколишнього середовища. Зазвичай ліпіди найінтенсивніше синтезуються за інтенсивного світла, особливо в умовах дефіциту елементів мінерального живлення, запасуються в цитоплазматичних олеосомах і реутилізуються у процесі синтезу полярних ліпідів мембран і (або) катаболізму в темряві (Thompson, 1996). Варто зазначити, що умови, сприятливі для накопичення ліпідів, є стресовими для мікроводоростей: вони заважають поділу клітин і уповільнюють ріст культури (накопичення біомаси), що суперечить завданням біотехнології — отриманню максимальної кількості біомаси мікроводоростей, збагаченої цінними для людини сполуками (Singh et al., 2011). Вирішення цієї нетривіальної проблеми вкрай важливе для фотобіотехнології, заснованої на культивуванні мікроводоростей, що зумовлює актуальність дослідження фізіології індукції синтезу і динаміки вмісту запасних ліпідів у цих мікроорганізмів за стресів різної природи. Різнобічне дослідження метаболічних змін на молекулярному і фізіологічному рівнях проводилось для модельного рослинного організму *Chlamydomonas reinhardtii*. Сайт-специфічний мутагенез геному уможливорює отримання штамів *Chlamydomonas* зі зміненими біохімічними шляхами, що дає змогу краще зрозуміти перебудови метаболізму, які приводять до накопичення ліпідів у відповідь на стресові впливи. Ведеться пошук ключових регуляторів, відповідальних за запуск клітинної програми накопичення ліпідів, відокремлення її від програм, відповідальних за припинення росту і апоптоз.

5.2. Структурна характеристика ліпідних включень

Триацилгліцероли є основою ліпідних включень, або олеосом (в англійській літературі — lipid bodies). За оптимальних умов росту клітини мікрроводоростей містять незначну кількість ТАГ, так само, як і олеосом (Merchant et al., 2007; Siatu et al., 2011).

Їх можна візуалізувати з використанням конфокальної мікроскопії методом фарбування нільським червоним (Wang et al., 2009; Work et al., 2010). За даними електронно-мікроскопічного дослідження, розрізняють три морфологічні типи конститутивних вмістків ліпідів *Chlamydomonas reinhardtii*: гранули світлочутливого вічка (стигми); пластоглобули, локалізовані у хлоропластах, і в цитоплазмі — α -цитоолеосоми (Goodson et al., 2011).

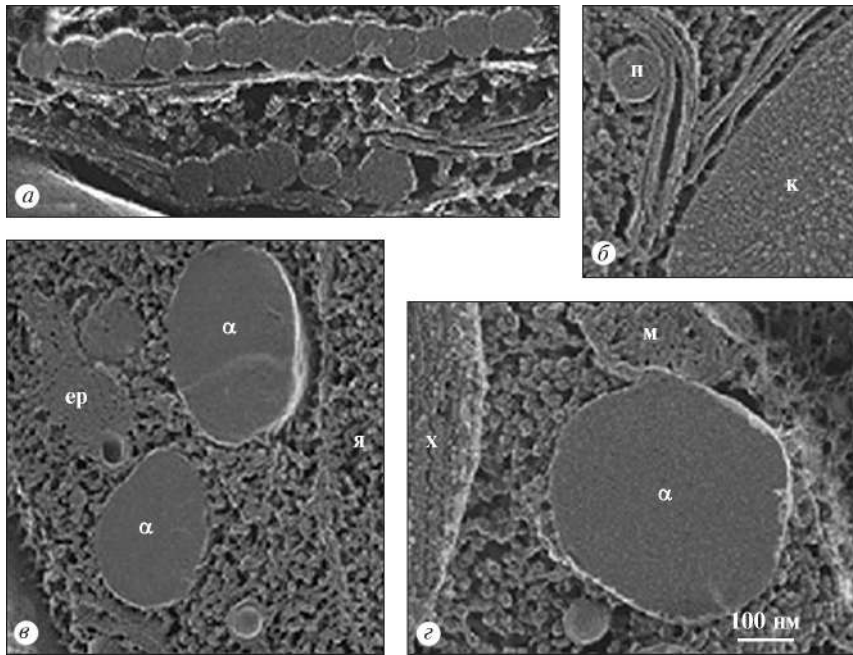


Рис. 5.1. Конститутивні триацилгліцероловмісні внутрішньоклітинні включення *Chlamydomonas reinhardtii* штаму stab:

a — два шари гранул світлочутливого вічка, що контактують із тилакоїдною мембраною; *b* — пластоглобула (п), яка контактує з тилакоїдною мембраною; к — крохмальна гранула; *v* — α -цитоолеосоми, що контактують з ендоплазматичним ретикуломом (ер) і ядерною оболонкою (я); *г* — α -цитоолеосома (α), яка контактує з мітохондрією (м); х — хлоропласт (Goodson et al., 2011)

Гранули світлочутливого вічка діаметром 75–100 нм утворюють світлонепроникний екран позаду округлого світлочутливого потовщення плазматичної мембрани (рис. 5.1, а) (Kreimer, 2009). Такі гранули містять каротиноїди і певний склад ТАГ з їх очищеної фракції (Moellering, Benning, 2010). На мікрофотографіях гранули мають гексагональну форму, тому логічно припустити наявність фібринових волокон у структурі їх оболонки (Schmidt et al., 2006).

Пластоглобули — округлі, обмежені ліпопротеїною мембраною включення діаметром 50–150 нм, характерні для стромы хлоропластів наземних рослин (Brehelin et al., 2007; Kessler, Vidi, 2007). Подібні включення виявлено також у результаті електронно-мікроскопічного дослідження *Chlamydomonas reinhardtii* (Sager, Palade, 1957; Ohad et al., 1967). Для них типові точкові контакти з мембраною тилакоїдів (див. рис. 5.1, б).

α -Цитоолеосоми — включення, локалізовані в цитоплазмі, розміром 250–1000 нм. Фарбуються флуорохромами (нільським червоним, Водіру та ін.) у клітинах мікроростків, культивованих за оптимальних умов росту (Walther, Farese, 2009). Більшість із них контактує з ендоплазматичним ретикуломом і (або) ядерною оболонкою (див. рис. 5.1, в), мітохондріями (див. рис. 5.1, г), ацидокальціосомами (в англійській літературі — acidocalciosomes). α -Цитоолеосоми *Chlamydomonas reinhardtii* часто локалізовані між хлоропластом і плазматичною мембраною (Goodson et al., 2011).

За несприятливих (стресових) умов росту конститутивні ТАГ-вмісні внутрішньоклітинні включення змінюються на стресові форми вмістилищ ТАГ — β -цитоолеосоми і хлоропластні олеосоми у клітинах *Chlamydomonas reinhardtii* (Goodson et al., 2011).

β -Цитоолеосоми починають виявлятися після 15 год культивування на середовищі без азоту, кількість і розмір таких включень збільшується з часом в усіх досліджуваних штаммах *Chlamydomonas reinhardtii*, тоді як α -цитоолеосоми спостерігають дедалі рідше і зникають після 24 год культивування за стресових умов. Це дає підставу припустити, що α -цитоолеосоми є попередниками β -цитоолеосом (Goodson et al., 2011), що також виявляють в молодих і зрілих зиготах. Вчені дослідили біохімічний склад і профіль ТАГ очищених фракцій таких включень (Moellering, Benning, 2010). β -Цитоолеосоми *C. reinhardtii* завжди локалізуються між внутрішньою поверхнею чашоподібного хлоропласта і ядром та асоційовані з двома мембранними системами —

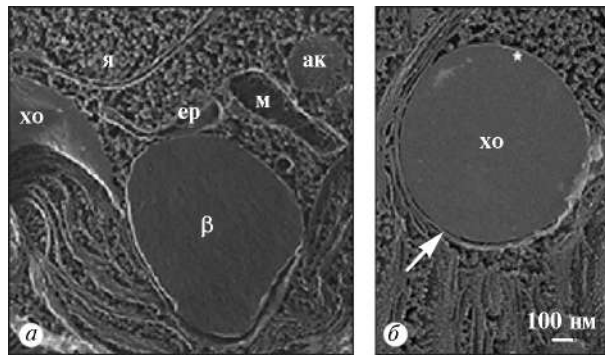


Рис. 5.2. Стресові форми ліпідних включень *Chlamydomonas reinhardtii* штаму *stab* після 15 год росту на середовищі без азоту:

a — β -цитоолеосома (β), що контактує з ендоплазматичним ретикуломом (ep) і хлоропластом (x); ак — ацидокальціосома; м — мітохондрія; я — ядро; *б* — хлоропластна олеосома (хо); зірочкою позначено поверхню моношару, стрілкою — тилакоїдну обгортку (Dосамро, 2010)

ендоплазматичним ретикуломом і зовнішньою мембраною оболонки хлоропласта. Особливості таких асоціацій ілюструє рис. 5.2, *a*.

Хлоропластні олеосоми характерні лише для мутантного штаму *Chlamydomonas reinhardtii stab*, особливість якого полягає в нездатності синтезувати крохмаль. Такі включення з'являються у хлоропластах *stab* після 12 год росту на середовищі без азоту і згодом заповнюють усю строму хлоропласта (Goodson et al., 2011). Вони вкриті ліпідною оболонкою, характерною ознакою таких включень також є обгортка з тилакоїдів (див. рис. 5.2, *б*). Припускають, що хлоропластні олеосоми можуть розвиватися із пластоглобул, одночасно в місцях точкових контактів пластоглобул і тилакоїдів формується тилакоїдна обгортка хлоропластних олеосом.

5.3. Біохімічний склад ліпідних включень *Chlamydomonas reinhardtii*

Дослідженню біохімічних характеристик стресових ліпідних тілець присвячено низку оглядів (Murphy, 2001; Fujimoto, Ohsaki, 2006; Thiele, Spandi, 2008 та ін.), в яких описано значну різноманітність складу їх ТАГ, галактоліпідів і протеїнів залежно від виду організмів, типів клітин і фізіологічного стану. Діаметри включень *Chlamydomonas reinhardtii*, виявлені у результаті флуоресценції нільського червоного, варіювали від найменших 0,2 мкм до

найбільших 3 мкм (Wang et al., 2009). Вони збільшуються унаслідок як постійного накопичення ТАГ, так і злиття між собою окремих ліпідних включень (Wang et al., 2009). Хоча за дії цитоплазматичних чинників включення всередині інтактної клітини здатні зливатись між собою, натомість *in vitro* на скляній поверхні тісний контакт не призводить до злиття.

Така стабільність зумовлена моношаром галактоліпідів на поверхні олеосом, який виявили на електронних мікрофотографіях *Chlamydomonas reinhardtii* (Tauchi-Sato et al., 2002). Вищі рослини містять асоційовані з олеосомами трансмембранні протеїни (олеозини, калеозини), що беруть участь в утворенні олеосом (Froissard et al., 2009), визначенні їх розміру (Siloto et al., 1961) і деградації наявних у них ліпідів (Poxleitner et al., 2006). Водоростеві геноми, у тому числі *C. reinhardtii*, не містять генів, які кодують гомологи олеозину, але містять гомологи генів калеозину (Wang et al., 2009).

Високоочищені олеосоми містять 90 % ТАГ і 10 % вільних жирних кислот (ВЖК). Залишки етерифікованих жирних кислот у ТАГ представлено на 50 % насиченими жирними кислотами (C16, C18) і на 50 % — ненасиченими жирними кислотами, половина з яких у формі олеїнової кислоти (C18:1). ВЖК — на 50 % C16 і на 50 % C18 (Wang et al., 2009). У процесі росту в стресових умовах профіль жирних кислот у складі ТАГ змінюється.

Так, ріст на середовищі без азоту супроводжується збільшенням частки насиченої жирної кислоти пальмітату (C16:0) і мононенасиченої жирної кислоти олеату (C18:1 Δ 9) порівняно з ПНЖК C16:4, C18:3 (Δ 5, 9, 12) і C18:3 (Δ 9, 12, 15), частка яких зменшується (Siaut et al., 2011; Msanne et al., 2012). Така зміна жирнокислотного складу ТАГ сприятлива для виробництва біопалива, оскільки кількість подвійних зв'язків у молекулі зменшується, що створює більш відновлений профіль вуглеводневої сировини.

5.4. Способи індукції акумуляції ліпідів клітинами *Chlamydomonas reinhardtii*

За оптимальних умов росту накопичується біомаса мікродоростей з відносно низьким вмістом ліпідів, який становить близько 5—20 % маси їх сухої речовини. Процеси акумуляції ТАГ і росту мікродоростей конкурують за фотосинтетичні

асиміляти, тому для стимулювання біосинтезу ліпідів необхідне перепрограмування фізіологічних шляхів обміну вуглецю і азоту. За несприятливих екологічних або стресових умов багато мікродоростей змінює шляхи біосинтезу в напрямі утворення і накопичення нейтральних ліпідів (20–50 % маси їх сухої речовини) переважно у вигляді ТАГ, що дає їм змогу витримати несприятливі умови. Щоб отримати біомасу мікродоростей з великим вмістом ліпідів, потрібно застосовувати стресові впливи або спеціальні методи індукції біосинтезу ліпідів. Нижче наведено основні методи індукції накопичення ліпідів клітинами *Chlamydomonas reinhardtii* та порівняно їх ефективність.

Дефіцит мінерального живлення створюють виключенням макроелементів (азот, фосфор, сірка) чи мікроелементів із середовища культивування *Chlamydomonas reinhardtii*. За оптимальних умов росту АТФ і НАДФН₂, отримані у процесі фотосинтезу, споживаються в анаболічних реакціях генерування біомаси і відбувається рециклізація АДФ і НАДФ⁺. Коли ріст і поділ клітин погіршуються через відсутність мінеральних елементів, зменшується пул основного акцептора електронів з електронтранспортного ланцюга НАДФ⁺. Оскільки фотосинтез контролюється переважно інтенсивністю світла, відбувається перевідновлення компонентів цього ланцюга, що може призвести до потенційно небезпечної для клітин ситуації внаслідок генерування вільних радикалів. НАДФН₂ споживається у процесі біосинтезу жирних кислот, тому інтенсифікація їх синтезу (які, у свою чергу, запасуються у формі ТАГ) поповнює пул НАДФ⁺ в умовах лімітованого росту.

Збільшення вмісту ТАГ у результаті мінерального дефіциту залежить як від дефіцитного елемента, так і від низки інших чинників: стан культури, наявність додаткових джерел органічного вуглецю, особливості штамів *C. reinhardtii*.

Вміст нейтральних ліпідів під час росту на середовищі ТАР після 4 діб культивування за N- і S-дефіциту для штаму *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 збільшувався на 136 і 123 % відповідно порівняно з контролем, для штаму *C. reinhardtii* cc125 — на 190 і 172 % відповідно (Sakmak et al., 2012). Інші дослідники відбирали клітини у стаціонарну фазу росту (Wang et al., 2009). Після 18 год культивування на живильному середовищі з ацетатом без азоту штам cw15 продукував 10 нг ТАГ/10³ кл., а мутантний штам (із порушеним синтезом крохмалю) cw15sta6 — 17 нг ТАГ/10³ кл. (Wang et al., 2009). Порівнянням вмісту ліпідів у п'яти лабораторних штамів *C. reinhardtii* (cc124, cc125, cw15, cc1690,

11-32A) також виявлено високу варіабельність ТАГ — від 2 мкг ТАГ/10⁶ для штаму cc124 до 11 мкг ТАГ/10⁶ кл. для 11-32A. Визначення вмісту ТАГ у трьох мутантних штаммах із порушеним біосинтезом крохмалю (cw15sta1-2, cw15sta6, cw15sta7-1) показало, що блокування синтезу крохмалю не приводить до суперкумуляції ТАГ порівняно з їх прямим предком — аргініновим аукоотрофним штамом 330. Автори (Siaut et al., 2011) дійшли висновку, що вміст ліпідів більш правильно перераховувати на клітину, а не на суху речовину. Також встановлено прямий зв'язок між здатністю до накопичення ТАГ за стресових умов і наявністю клітинної оболонки для різних штамів *C. reinhardtii*. J. Msanne і співавт. (2012) вивчали *C. reinhardtii* cc125, що зростав у фотоавтотрофних умовах (без ацетату). Для дослідження клітини відбирали в середині експоненційної фази росту. Загальний вміст жирних кислот за росту на середовищі без азоту залишався відносно сталим протягом перших 4 діб, але потім істотно підвищувався до 80 % на 6-ту добу культивування порівняно з контролем і становив 20 нг/10³ кл.

Х. Deng та співавт. (2011) досліджували вплив дефіциту азоту, фосфору, сірки, калію, магнію, кальцію, заліза на внутрішньоклітинний вміст ліпідів у *Chlamydomonas reinhardtii* штаму cc124 на середовищах культивування з органічним вуглецем (TAP, HSM) і без нього (SE, BG-11). Вони встановили, що вміст ліпідів збільшувався в рази за дефіциту азоту і сірки, проте лише за росту на середовищах, збагачених органічним вуглецем. Нестача фосфору, калію і кальцію незначно стимулювала накопичення ліпідів на таких середовищах. Дефіцит магнію і заліза не впливав на вміст ліпідів протягом дослідження. Зазначимо, що на середовищах без органічного вуглецю дефіцит досліджуваних елементів мало позначався як на швидкості росту, так і на внутрішньоклітинному вмісті ліпідів у таких культурах (Deng et al., 2011).

Варто підкреслити, що відмінність даних, отриманих різними дослідниками для однакових штамів *Chlamydomonas reinhardtii*, може бути пов'язана з неоднаковим фізіологічним станом культури у стаціонарній та експоненційній фазах росту. На нашу думку, доцільніше досліджувати накопичення ТАГ для культур у стаціонарній фазі росту. Виявлено також помітний прямий зв'язок між швидкістю накопичення запасних ліпідів і рівнем метаболічної активності клітин *C. reinhardtii*.

Інші методи індукції акумуляції ліпідів клітинами *Chlamydomonas reinhardtii*. S. Kim та співавт. (2013) дослідили вплив бре-

фельдину А на накопичення олеосом у клітинах *Chlamydomonas reinhardtii* штамів cc503 і cc125. Він індукував стрес ендоплазматичного ретикулума в різних організмів пригніченням транспорту везикул від ендоплазматичного ретикулума до комплексу Гольджі. Раніше було встановлено, що такий стрес активує багато ферментів метаболізму ліпідів у клітинах кукурудзи і сої, одночасно також збільшується накопичення ТАГ у клітинах ендосперму кукурудзи (Shank et al., 2001). Добавляння 75 мкг/мл брефельдину А супроводжувалось швидким (через 2 год) накопиченням олеосом — флуоресценція нільського червоного була у 2 рази вища в оброблених клітинах порівняно з контролем. Проте через 24 год флуоресценція зменшувалась і перевищувала контрольну лише на 30 %, очевидно, у результаті розвитку токсичної дії брефельдину А і загибелі клітин. Аналізом зміни ліпідного складу екстрактів клітин виявлено зменшення відсоткового вмісту діацилгліцеролтриметилгломосерину і дигалактозилдіацилгліцеролу, тоді як вміст фосфатидилетаноламіну і ТАГ збільшувався в оброблених клітинах порівняно з контролем. Подібна зміна ліпідного складу клітин характерна і для інших методів стрес-індукції, що дає підставу припускати дію загального механізму їх відповіді на стрес різної природи. Добавляння ацетату і культивування на середовищі без азоту додатково стимулювали накопичення ТАГ в оброблених клітинах. Обробка брефельдином А пригнічувала ріст і поділ клітин у зв'язку з дисбалансом ліпідів і ліпопротеїнів у клітинних мембранах. Індукція олеосом захищає клітини від ушкодження денатурованими гідрофобними ділянками протеїнів ендоплазматичного ретикулума (Kim et al., 2013).

Досліджено сольову (NaCl) стрес-індукцію накопичення ТАГ клітинами *Chlamydomonas reinhardtii* штаму cc124 (Siaut et al., 2011). За концентрації NaCl 100 мМ у середовищі ТАР вміст ТАГ підвищувався до 5 мкг/10⁶ кл., що відповідає його збільшенню за росту на середовищі без азоту (Siaut et al., 2011).

Добавляння трикарбонних кислот, зокрема цитрату, також стимулювало утворення олеосом клітинами *Chlamydomonas reinhardtii* штаму cc125 (Wasw et al., 2014). Так, добавляння 6 мМ цитрату до середовища культивування ТАР супроводжувалось збільшенням флуоресценції нільського червоного в культурі до відповідного рівня за росту на середовищі без азоту. Проте такий вплив також виявився стресовим для клітин, оскільки культура втрачала зелений колір (Wasw et al., 2014).

Уперше повідомлено (Min et al., 2014) про індукцію синтезу олеосом для штаму *Chlamydomonas reinhardtii* штаму cc125 внаслідок

док прямої деформації плазматичної мембрани. Ефект розвивався після 4 год від моменту деформації і зберігався протягом 3 діб, водночас флуоресценція нільського червоного у 3 рази перевищувала контрольне значення.

Отже, крім дефіциту мінерального живлення інші стресові впливи виявились не менш ефективними індукторами накопичення ліпідів клітинами *Chlamydomonas reinhardtii*. Однак крім методу індукції існують додаткові чинники, які підвищують накопичення ліпідів.

5.5. Шляхи підвищення ефективності накопичення ліпідів *Chlamydomonas reinhardtii*

Крім зазначених методів індукції олеосом у клітинах *Chlamydomonas reinhardtii* проводяться роботи щодо вдосконалення методів впливу з метою отримання максимального виходу ліпідів із біомаси водоростей. Виділяють два основні напрями досліджень:

- створення мутантних штамів;
- підвищення вмісту органічного вуглецю в середовищі культивування.

Використання мутантних штамів *Chlamydomonas reinhardtii*.

Напрявлений мутагенез є потужним інструментом молекулярно-біологічних досліджень функціонування шляхів метаболізму не лише *C. reinhardtii*, а й усіх живих організмів. Після розшифрування геному розширились можливості для інсерційного мутагенезу з метою виключення чи активування експресії необхідних генів. Для стимулювання ліпогенезу мікрowodоростей створено мутанти з порушеним біосинтезом крохмалю (Li et al., 2010), використання яких ґрунтується на гіпотезі щодо конкурентного розподілу асимілятів між шляхами біосинтезу крохмалю і запасних форм ліпідів, зокрема ТАГ. Стресовий вплив на мікрowodорості спочатку спричинює накопичення крохмалю як високоенергетичного резерву і лише потім — ліпідів. У результаті цих спостережень запропоновано гіпотезу, згідно з якою, збільшення внутрішньоклітинного вмісту ліпідів у відповідь на стрес можна досягти блокуванням біосинтезу крохмалю.

Найдослідженіші мутантні штами *Chlamydomonas reinhardtii* — sta1-1 (Fahy et al., 2005), sta1-2 (BafJ3), sta6 (BafJ5) і sta7-1 (BafJ6) (рис. 5.3). Усі вони або не накопичують крохмаль взагалі, або накопичують його не більш як 5 % відносно штамів дикого типу (Zabawinska et al., 2001). За винятком штаму sta1-1, що похо-

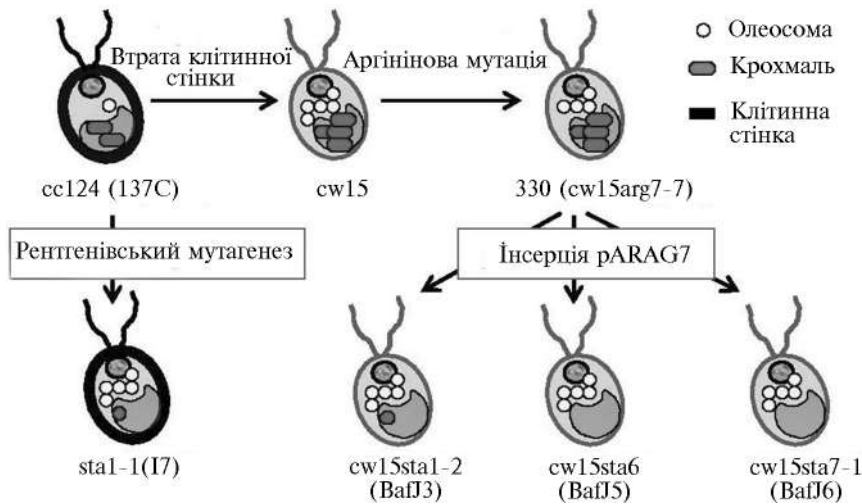


Рис. 5.3. Взаємозв'язок штаму дикого типу *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 і мутантних штамів із порушенням синтезу крохмалю sta1-2 (BafJ3), sta6 (BafJ5) і sta7-1 (BafJ6) (Siaut et al., 2011)

дить від штаму дикого типу cc124 (137C) внаслідок дії рентгенівського мутагенезу і має клітинну стінку, інші мутанти (sta1-2, sta6, sta7-1) отримано від аргінінового ауксотрофного штаму 330 (cw15arg7-7) в результаті інсерційного мутагенезу і характеризуються відсутністю клітинної стінки (Siaut et al., 2011).

Штам sta6 дефектний за малою субодиницею АДФ-глюкозопірофосфорилази, штам sta7-10 дефектний за ізоамілазою (Work et al., 2010). Результати досліджень щодо стимулювання накопичення ліпідів за стресових умов із використанням мутантних штамів *Chlamydomonas reinhardtii*, в яких порушений синтез крохмалю, досить суперечливі. В умовах росту на середовищі TAP без азоту штам sta6 через 3 доби накопичував у 2 рази більше ТАГ, ніж комплементарний штам sta6-S6 і споріднений штам cw15 (Fan, Charpin, 1998). Штам sta6 має низку особливостей, зокрема здатний до накопичення ліпідних включень у хлоропластах, характеризується підвищеною активністю ензимів глюконеогенезу і гліоксилатного циклу (Miller et al., 2010). Проте у дослідженні М. Siaut та співавт. (2011) накопичення ТАГ було однаковим після 2 діб культивування на середовищі TAP без азоту для штаму sta6 і його прямого предка штаму 330.

У дослідженні V. Work та співавт. (2010) зазначено, що ревертанти (з відновленою здатністю до синтезу крохмалю) мутантного штаму *sta7-10* накопичують більше ліпідів після 4 діб росту на середовищі без азоту. У зв'язку з цим втрата здатності синтезувати крохмаль про запас за стресових умов не завжди супроводжується посиленням здатності накопичувати ліпіди у відповідь на стрес.

Збільшення вмісту органічного вуглецю в середовищі культивування *Chlamydomonas reinhardtii*. Мікроводорості, у тому числі *C. reinhardtii*, здатні ефективно засвоювати екзогенні органічні речовини, які залежно від їх природи є не лише джерелами вуглецю, а й беруть участь у регуляції метаболізму (Сиваш та ін., 2001; Stepanov, Zolotareva, 2015). Зокрема, екзогенні органічні сполуки впливають на якісний і кількісний склад жирних кислот у ліпідах мікроводоростей (Mukhaylenko et al., 2004).

Вважають, що для міксотрофного росту *Chlamydomonas reinhardtii* як джерело вуглецю та енергії може використовуватись лише ацетат (Ramanan et al., 2013). За його наявності в середовищі культивування поліпшуються показники росту і збільшується вміст ліпідів порівняно з фотоавтотрофним ростом. Ми встановили, що ріст *C. reinhardtii* стимулюється також метанолом (Степанов, Золотарьова, 2011; Stepanov, Zolotareva, 2011, 2015). Міксотрофний ріст *C. reinhardtii* штаму *stab* супроводжується збільшенням вмісту ліпідів у 6 разів, а швидкість росту підвищується в 3 рази порівняно з фотоавтотрофним ростом за нормальних умов. Дефіцит азоту додатково стимулював накопичення ліпідів у міксотрофній культурі на 40 % після 3 діб, в автотрофній культурі їх вміст збільшувався у 5 разів, але не досягав відповідного рівня в міксотрофній культурі (Ramanan et al., 2013). Інший колектив авторів також досліджував вплив ацетату на накопичення ліпідних включень *C. reinhardtii* штаму *stab*. За добавляння 20 мМ ацетату після 2 діб дефіциту азоту посилювалось утворення ліпідів порівняно з контролем без ацетату, що супроводжувалось підняттям клітин на поверхню середовища культивування з виникненням їх плівки (Goodson et al., 2011).

Таким чином, наявність органічного вуглецю в середовищі культивування у формі ацетату стимулює не лише метаболічну активність і ріст культури *Chlamydomonas reinhardtii*, а й накопичення запасних ліпідів у формі ТАГ за росту культури у стресових умовах.

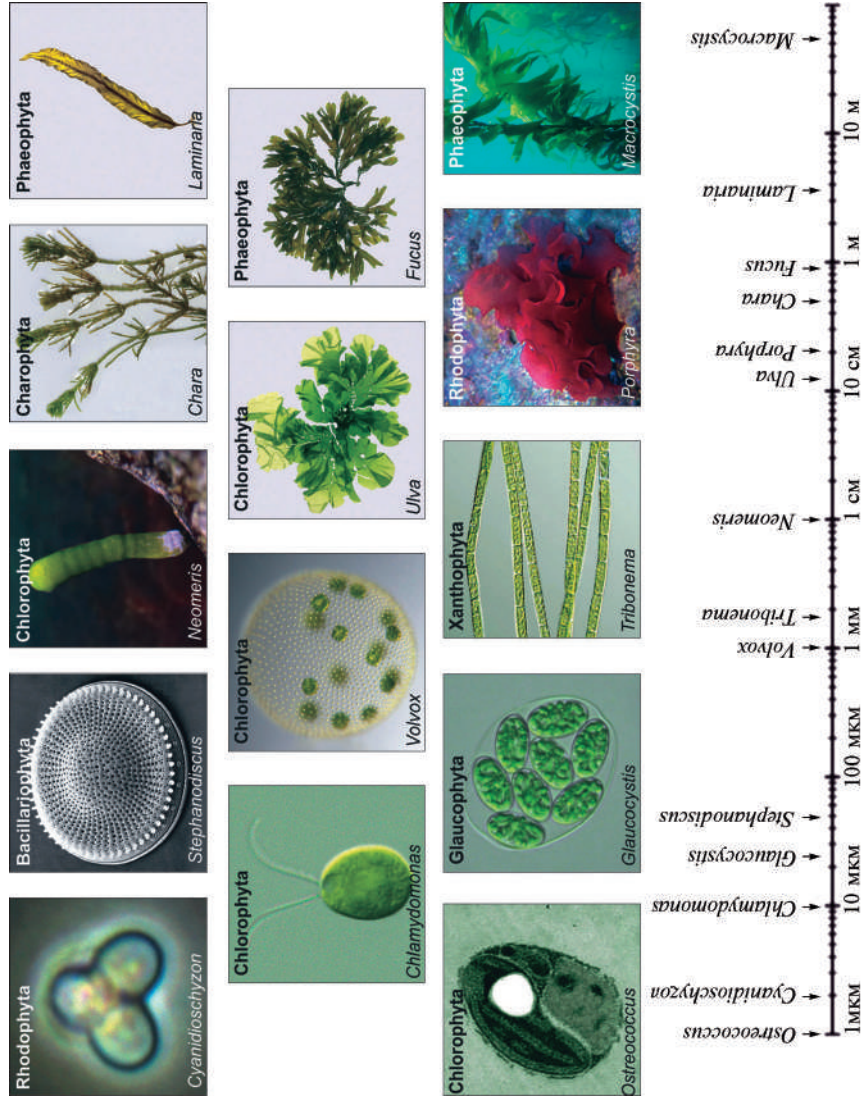


Рис. 1.1. Різноманітність фенотипів та лінійних розмірів водоростей. Розміри окремих представників водоростей наведено на логарифмічній шкалі (Hallmann, 2015)

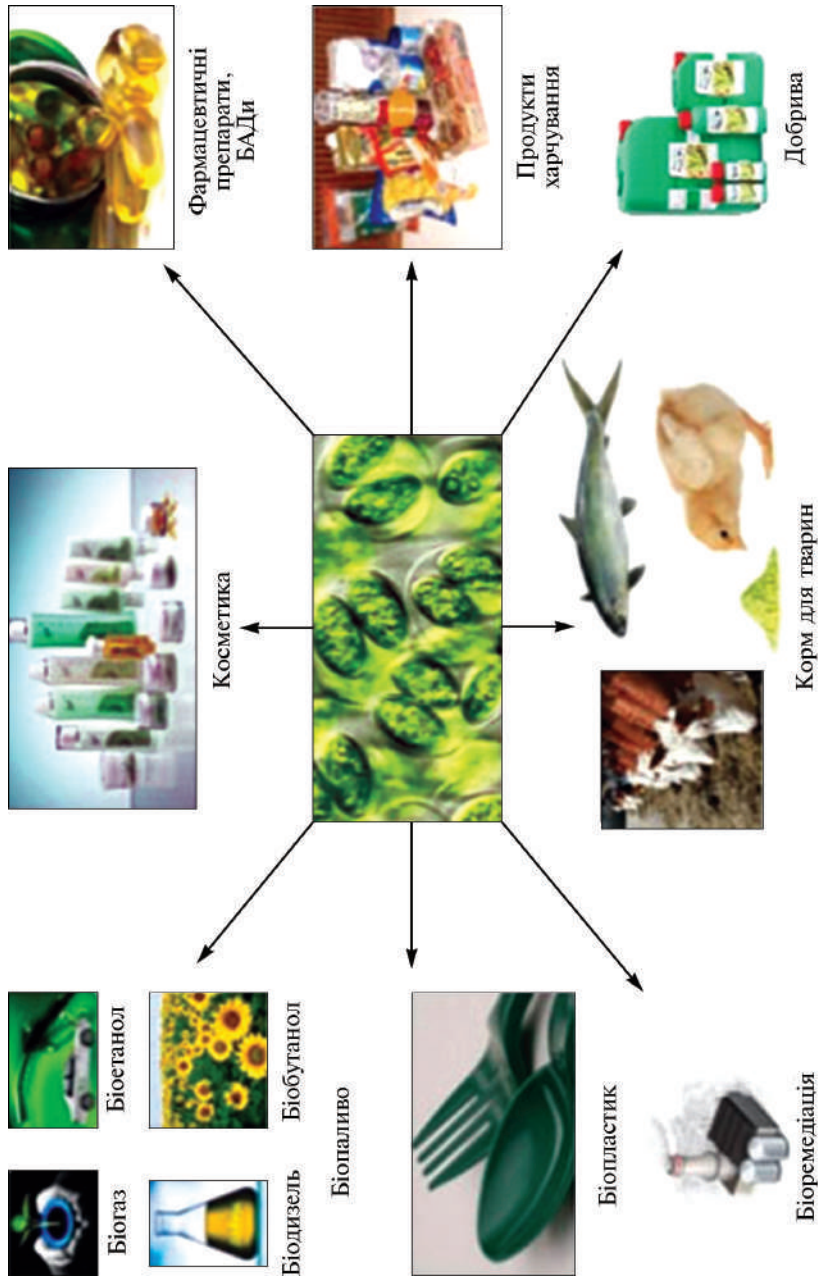


Рис. 1.2. Використання водоростей у промисловості

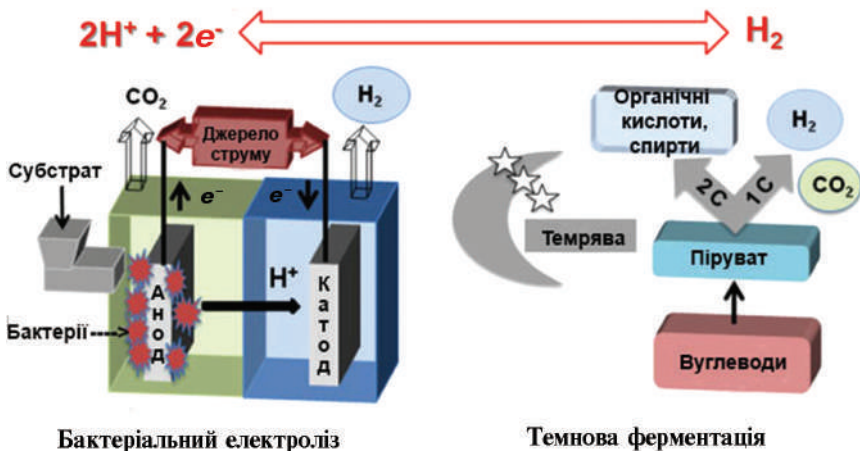
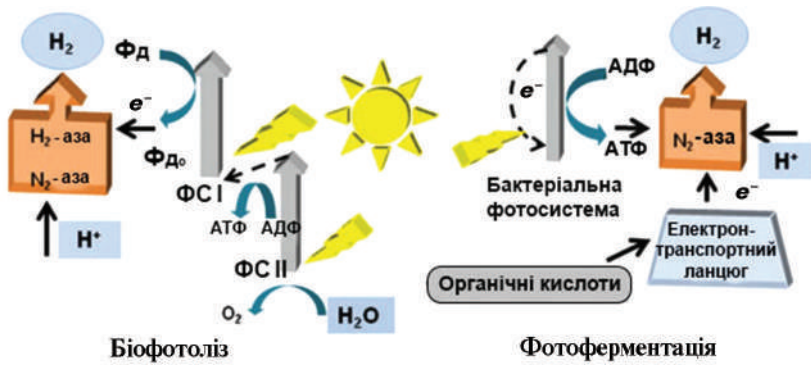


Рис. 2.2. Основні способи отримання біоводню (Hallenbeck, 2012)

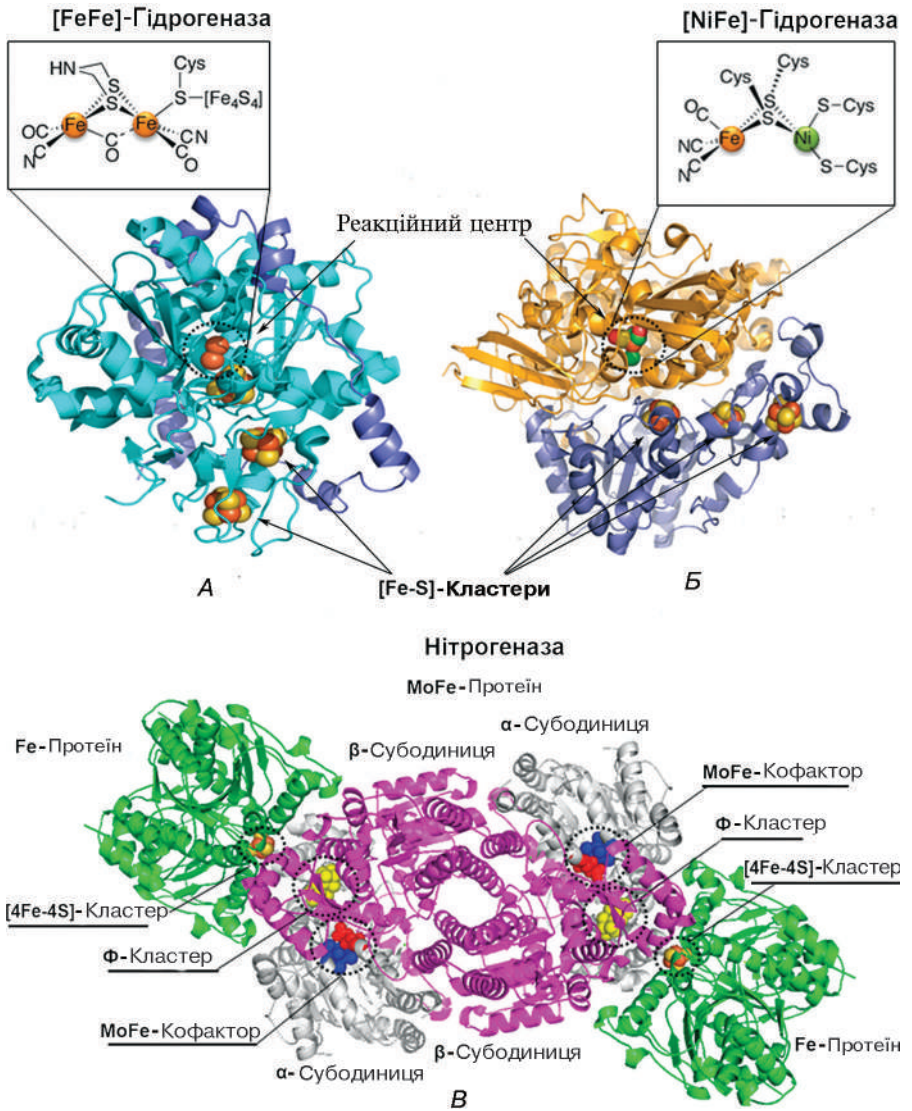


Рис. 2.5. Моделі ензимів (A, Б, B), які продукують водень (Khetkornetal., 2017)

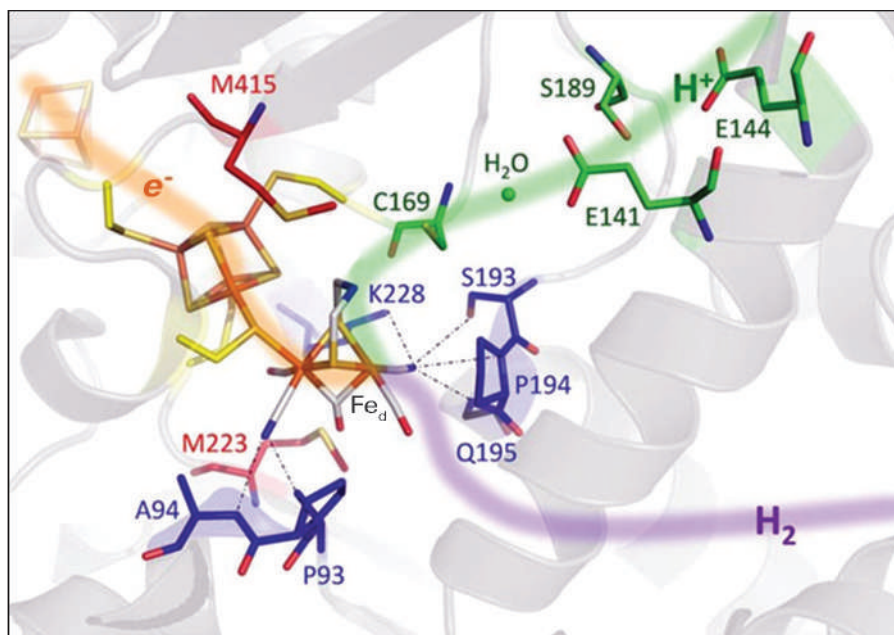
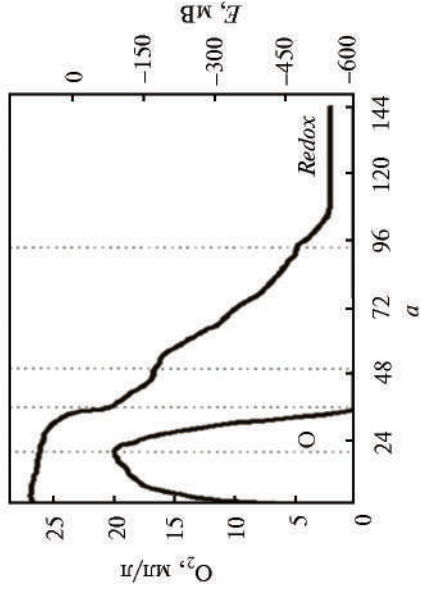
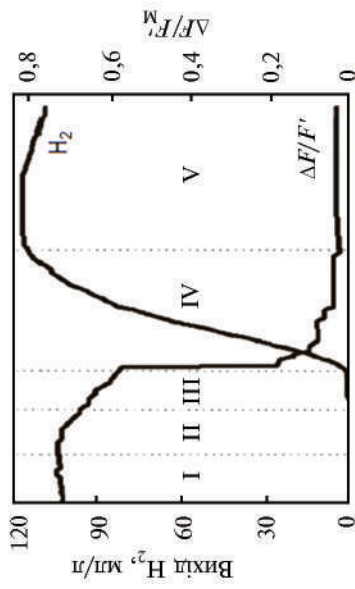
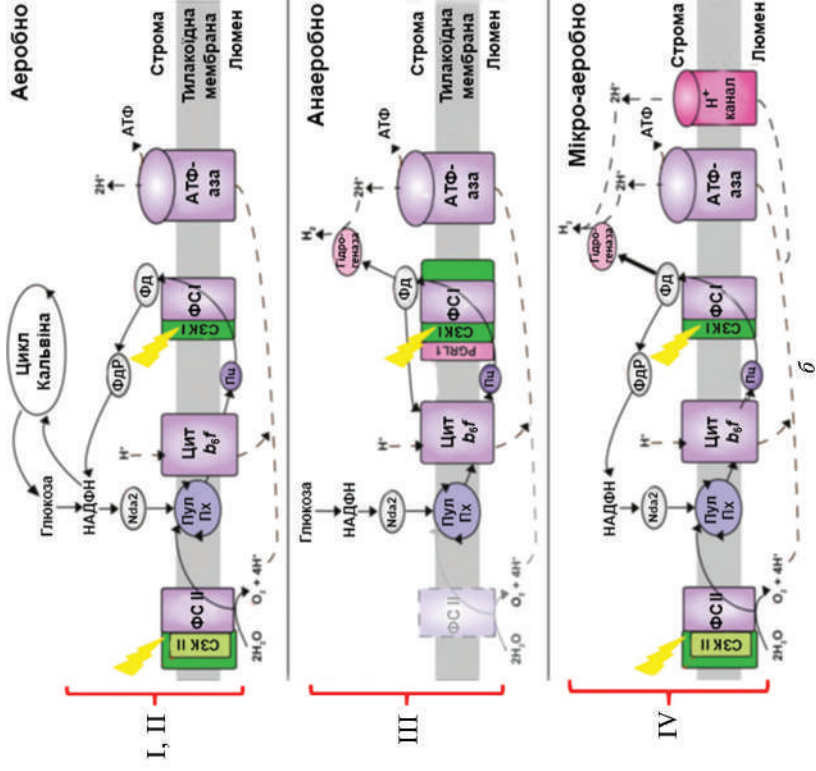


Рис. 3.1. Модель лігандного оточення Н-кластера в активному центрі HYDA1 *Chlamydomonas reinhardtii*. Шляхи електронів, протонів і водню (H_2), що надходять до або виходять з каталітично активного Fe_d , позначено помаранчевим, зеленим або фіолетовим кольорами відповідно. Амінокислотні залишки, які стабілізують ліганди CN^- , позначено синім, ті, що беруть участь у транспортуванні протонів, — зеленим кольором (Chlamydomonas, Hippler, 2017)



←

Рис. 4.1. Стадії продукування водню (I–V) *Chlorophyceae reinhardtii* (a) на безсірковому середовищі без доступу повітря і метаболічні процеси у хлоропластах (b) залежно від фаз і вмісту кисню у середовищі культивування (аеробно, анаеробно, мікроаеробно) (Oey et al., 2016)

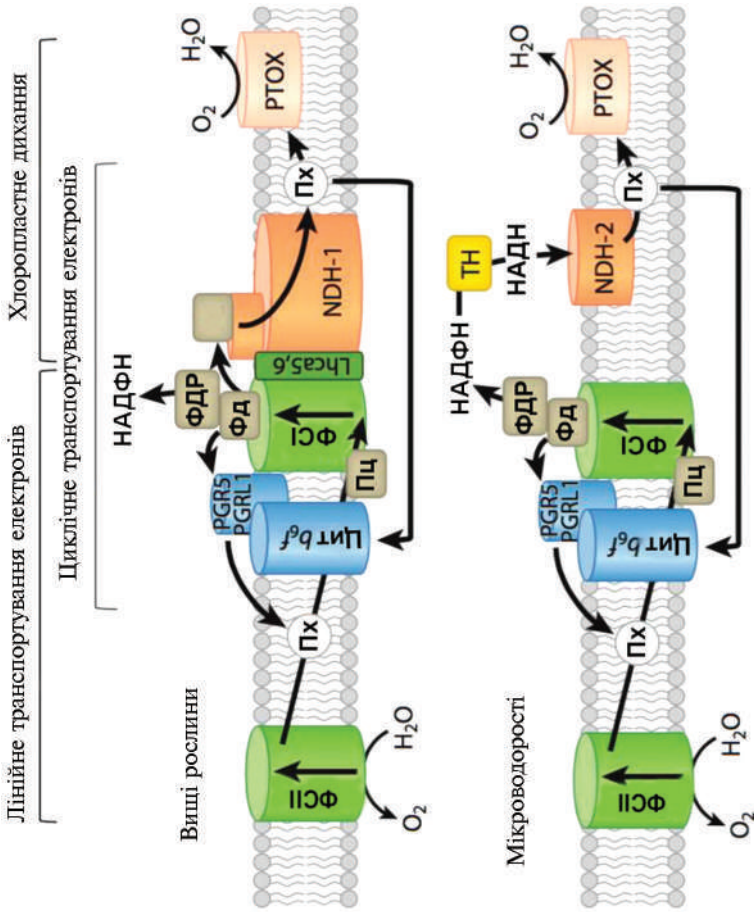


Рис. 4.2. Шляхи транспортування електронів у хлоропластах вищих рослин і мікродоростей

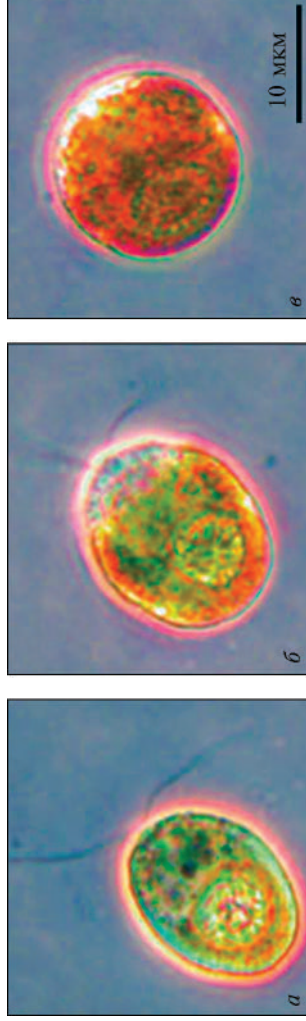


Рис. 9.1. Клітини мікроводорісті *Dityliella salina* за різних умов культивування:

a — зелені клітини не стресованої культури; *б* — клітини, на які діють стресові умови, змінюють колір на помаранчевий; *в* — помаранчевий колір клітин культури мікроводорісті, в якій стимульовано синтез β -каротину (Ramos et al., 2011)

Отже, використання *Chlamydomonas reinhardtii* як модельного об'єкта для дослідження здатності мікроводоростей до накопичення запасних ліпідів у стресових умовах росту дає змогу порівняти ефективності різноманітних стресових впливів на індукцію ліпогенезу. Найефективнішим природним оборотним і найменш затратним стресовим впливом вважають створення дефіциту азоту в середовищі культивування. За умов нітрогенового стресу наявність ацетату додатково збільшує накопичення ліпідів. Використання мутантних штамів *C. reinhardtii* також дає змогу збільшити внутрішньоклітинний вміст ліпідів за стресових умов. Незважаючи на сучасні досягнення в галузі молекулярної біології та генної інженерії, відокремити фактор індукції накопичення ліпідів від стресового фактора не вдається, тобто індукція ліпогенезу завжди супроводжується пригніченням росту. З погляду отримання з мікроводоростей сировини, збагаченої ліпідами, важливо не лише максимально збільшити внутрішньоклітинний вміст ліпідів, а й забезпечити виживаність і швидке відновлення росту культури.

**РІЗНОМАНІТНІСТЬ
ПОЛІСАХАРИДІВ ВОДОРОСТЕЙ:
СТРУКТУРА, СИНТЕЗ І ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Водорості — надзвичайно різноманітна група організмів, які забезпечують приблизно 50 % щорічного глобального виробництва органічних речовин і майже 98 % продуктивності океанів в результаті фотосинтетичної фіксації атмосферної і розчиненої у воді вуглекислоти (Pal, Choudhury, 2014). Хоча водорості синтезують сполуки з різноманітною біологічною активністю, такі як вітаміни, антикоагулянти, антиоксиданти, антибіотики, імуностимулятори і адаптогени, здатні накопичуватися у клітинах макро- (Ueno, et al., 2012; Qi, Sun, 2015) і мікроводоростей (Da Silva Vaz et al., 2016; Mokrosnop et al., 2016), їх фармакологічний потенціал практично не використовується. Щорічне світове виробництво полісахаридів із морської біомаси становить приблизно 25—30 млн т на рік (De Jesús Paniagua-Michel et al., 2014).

Водорості продукують широкий спектр полісахаридів, багато з яких специфічні для цих рослин і відсутні в наземній флорі та фауні. Їх зазвичай відносять до однієї із трьох груп: 1) цитозольні полісахариди, що запасують фіксовані в процесі фотосинтезу вуглець і енергію; 2) полісахариди клітинних стінок з урахуванням пептидогліканів і ліпополісахаридів; 3) полісахариди, що виділяються в позаклітинне середовище у вигляді капсул або біоплівок — екзополісахариди (ЕПС).

У цьому розділі розглянуто сучасні дані щодо структури, фізіологічної ролі, властивостей і біотехнологічного значення основних класів полісахаридів водоростей.

6.1. Запасні полісахариди водоростей

Вміст запасних полісахаридів у клітинах водоростей варіює у широких межах. Вони накопичуються на певних фізіологічних стадіях розвитку, зазвичай в періоди інтенсивної фотосинтетич-

ної активності, а потім гідролізуються з вивільненням вуглеводних мономерів для підтримки клітинного метаболізму.

Фотосинтетична фіксація діоксиду вуглецю супроводжується утворенням запасних продуктів, таких як розчинні цукри (наприклад, сахароза) або нерозчинні полісахариди. Хоча сахароза є основною транспортною формою вуглеводів на світлі, запасні полісахариди забезпечують тимчасове депо вуглецю і енергії для потреб нічного метаболізму водоростей. Усі запасні полісахариди водоростей є гомополімерами глюкози, їх розрізняють за глікозидним зв'язком між її залишками. У полісахаридах крохмально-го типу (крохмаль, флоридний крохмаль і глікоген) мономерні зв'язані між собою α -(1→4)- і α -(1→6)-глікозидними зв'язками. Полісахариди ламінарину (ламінарин, хризоламінарин і парамілон) складаються із залишків глюкози, з'єднаних між собою β -(1→3)- і β -(1→6)-глікозидними зв'язками.

Крохмаль є запасним полісахаридом зелених водоростей. Він накопичується всередині хлоропласта під час світлової фази і витрачається в темряві. Крохмальні зерна зелених водоростей містять як амілопектин, так і амілозу, але їх співвідношення варіює залежно від умов зростання. Накопичення крохмалю у хлоропластах залежить від часу доби як при безперервному освітленні, так і в цілодобовій темряві, що вказує на циркадний контроль його біосинтезу (Ral et al., 2006). В освітлених клітинах *Chlamydomonas* крохмальні гранули накопичуються навколо піреноїдів, а в темряві часточки крохмалю розсіяні по всьому матриксу хлоропластів (Harris, 1989). Біосинтез крохмалю починається з перетворення глюкоза-1-фосфату на АДФ-глюкозу, яка є донором вуглецю для подовження ланцюга крохмалю через α -1,4-глікозидний зв'язок (Zabawinski et al., 2001). Полімеризація каталізується двома ізоформами крохмальсинтази: розчинної крохмальсинтази і зв'язаної з гранулою крохмальсинтази (Smith et al., 1997).

Червоні водорості (Rhodophyceae) накопичують позапластидні гранули флоридного крохмалю, структурно подібного до гранул крохмалю у вищих рослин, але на відміну від останніх вони не містять амілози. Екстрапластидний синтез крохмалю у червоних водоростях каталізується УДФ-глюкозаселективною α -глюкансинтазою, аналогічно синтезу глікогену в цитоплазмі в інших еукаріот (Viola et al., 2001).

Таким чином, метаболізм крохмалю у червоних і зелених водоростей повністю відрізняється. У червоних водоростей синте-

зується флоридний крохмаль, який акумулюється поза пластидами, в цитоплазмі, а субстратом крохмальсинтази є не АДФ-, а УДФ-глюкоза (Zabawinski et al., 2001).

Основна запасна речовина у криптофітових водоростей — крохмаль, що відкладається між другою і третьою мембранами хлоропласта. З усіх водоростей тільки у криптофітових крохмаль депонується в цьому місці. На відміну від зелених водоростей синтез крохмалю у криптофітових не залежить від циркадних ритмів і строго регулюється світлом. Експресія гена, який кодує крохмальсинтазу, — ферменту, пов'язаного з гранулою та каталізуючого синтез амілози, була максимальною в середині світлової фази і знижувалася до мінімального рівня в нічний час. Як і у червоних водоростей, він містить більше амілопектину, ніж амілози, тому з йодом дає червоне забарвлення (Haferkamp et al., 2006).

Основний запасний полісахарид Phaeophyta — ламінарин, що є лінійним ланцюгом залишків глюкози, пов'язаних переважно β -(1→3)-глікозидними зв'язками з невеликою кількістю β -(1→6)-зв'язків (Adams et al., 2009). Таким же типом глікозидного зв'язку з'єднані залишки глюкози у хризоламінірині — запасному продукті Chrysophyceae, Xanthophyceae і Bacillariophyta. Це відрізняє зазначені таксони від більшості живих організмів, які запасують α -1,4-глюкан (глікоген або крохмаль). Співвідношення зв'язків β -(1→3) до β -(1→6) становить 15:1 у ламінарині і 11:1 — у хризоламінірині (Michel et al., 2010).

Для бурих водоростей характерний унікальний метаболізм вуглецю. Продукт фотоасиміляції *D*-фруктоза-6-фосфат не використовується для отримання сахарози, а конвертується в *D*-маніт. На прикладі бурі водорості *Ectocarpus siliculosus* встановлено, що вона має повний набір ферментів для синтезу маніту, ламінарині і трегалози, а ферменти, які каталізують синтез сахарози, крохмалю і глікогену, повністю відсутні (Michel et al., 2010).

Мікрводорості класу Euglenophyta накопичують парамілон — фібрилярний нерозгалужений β -(1→3)-глюкан (Barsanti et al., 2011; Mokrosnop, 2018). У клітинах *Euglena gracilis* полісахарид запасується у формі висококристалізованих гранул і комплексу фібрилярних структур, локалізованих у цитоплазмі й оточених мономембраною (Kiss et al., 1988; Vaumer et al., 2001). Рівень кристалізації гранул парамілону досягає 90 %, що відрізняє цей полісахарид від інших запасних продуктів рослин і водоростей.

Мікрофібри гранул завтовшки 4—10 нм об'єднуються по три і формують нерозгалужені спіралі. Молекулярна маса парамілону перевищує 500 кДа (Baumer et al., 2001). Гранули парамілону можуть хаотично розподілятися в цитоплазмі або накопичуватися в ділянці піреноїда клітин *E. gracilis*. Зазвичай, чим більше розмір гранул, тим менше їх кількість у клітині (Barsanti et al., 2001). Накопичення парамілону в *E. gracilis* сильно стимулюється за деяких типів міксотрофного і гетеротрофного живлення, при цьому його вміст може досягати 95 % маси клітин *E. gracilis* (Kiss et al., 1988; Mokrosnop, 2018).

Оскільки запасні полісахариди водоростей є поліглюканами, вивчається можливість їх використання для виробництва біоетанолу третього покоління (Al Abdallah et al., 2016). Також показано можливість конвертації крохмалю для забезпечення продукування молекулярного водню при освітленні зелених водоростей (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella*) в анаеробних умовах (Zolotareva et al., 2010; Eroglu, Melis, 2011).

6.2. Будо́ва клітинних стінок морських водоростей

Клітинні стінки морських водоростей можна розглядати як двофазну систему, що складається з кристалічної фази (скелет) і аморфної фази (матриця) з переважанням матричних компонентів над скелетними. Для морських водоростей характерна велика різноманітність позаклітинного матриксу, властивості якого вивчені детально лише для відносно невеликої кількості таксонів. Основними компонентами клітинних стінок морських водоростей є вуглеводи. Мікрофібрили целюлози часто слугують каркасом клітинних стінок, тоді як сульфатовані полісахариди матричних компонентів, ймовірно, відіграють ключову роль в адаптації до осмотичного стресу (Deniaud-Bouet et al., 2014).

Зелені водорості (Ulvophyceae) крім целюлози можуть містити такі фібрилярні компоненти, як (1→4)- β -манани або (1→3)- β -ксилани (Domozuch et al., 2012). У деяких видів роду *Ulva* до клітинних стінок включені два основних полісахариди — целюлоза та ульван, а також два мінорних — ксилоглюкан і глюкуронан. Ксилоглюкани і целюлоза розміщені по краям клітинної стінки, ульвани утворюють іонні зв'язки з глюкуронаном і переважно локалізуються всередині клітинної стінки. Білки зв'язуються з глюкуроновими залишками (Lahaye, Robic, 2007). Деякі види *Co-*

dium (*Bryopsidales*, *Chlorophyta*) містять (1→4)- β -манан як фібрилярний компонент і кілька матричних сульфатованих полісахаридів: β -(1→3)-*D*-галактани, β -(1→3)-*L*-арабінани, β -(1→4)-*D*-манани. Глікопротеїни з великим вмістом гідроксипроліну також наявні в обох шарах клітинної стінки (Domozuch et al., 2012).

Фукозовмісні сульфатовані полісахариди в клітинних стінках бурих водоростей є основними гліканами, міцно зв'язаними із целюлозою. Передбачається, що коротколанцюгові молекули геміцелюлози зв'язують ці поліаніонні та нейтральні полісахариди. Фукозовмісні сульфатовані полісахариди завжди асоційовані з білками, вміст яких у клітинній стінці становить до 9 % загальної маси сухої речовини водоростей *Fucales* (Mabeau et al., 1990). Іншими істотними для структурування клітинної стінки взаємодіями є альгінат-фенольні зв'язки (Deniaud-Bouet et al., 2014). Альгінат забезпечує жорсткість клітинної стінки, ступінь якої залежить від мономерного складу полісахариду (Gacesa, 1988). Жорсткість також контролюється іонними зв'язками з Ca^{2+} і поліфенольним зв'язуванням. Додатковими компонентами клітинних стінок бурих водоростей є глікопротеїни (білки арабіногалактану), галогеновані та (або) сульфатовані фенольні сполуки, іони (Deniaud-Bouët et al., 2017).

У *Rhodophyceae* кількісно переважають такі полісахариди, як галактани. Карагінани і агари наявні у клітинній стінці у формі водорозчинної аморфної матриці. Нерозчинним компонентом є кристалічна целюлоза, маноза і галактоза також знаходяться в цій фракції. Білки і глікопротеїни — другорядні компоненти стінок червоних водоростей (Lechat et al., 1997).

6.3. Біологічні функції полісахаридів клітинних стінок макроводоростей

Клітинні стінки рослин і макроводоростей складаються переважно зі складних і гетерогенних вуглеводнів (Pomin, Mourão, 2008). Еволюція позаклітинного матриксу або клітинної стінки є одним із важливих кроків у розвитку багатоклітинної морфології морських організмів, що забезпечила основу для зв'язку між клітинами, їх кооперативну поведінку і розпізнавання (Brownlee, 2002). Наземні рослини потребують жорсткої структури, щоб підтримувати форму в умовах дії сили тяжіння, що робить кристалічну целюлозу важливою частиною клітинних стінок. Морські

водорості мають більш гнучкі структури для адаптації до різних механічних навантажень, пов'язаних із припливами і дією морських хвиль. Сульфатовані полісахариди, які відсутні у наземних і прісноводних рослин, захищають морські водорості від висихання внаслідок посиленого поглинання води і зростання кількості поверхневих іоногенних груп (Collén et al., 2014). Міжклітинна гелева матриця (альгінат, карагінан та ін.) забезпечує організму макроводорості як механічну міцність, так і гнучкість. Вміст альгінату у водоростях залежить від умов навколишнього середовища: з підвищенням імовірності механічного пошкодження водоростей вміст полісахариду збільшується (Draget et al., 2005). Це може бути однією з причин того, що в різних частинах одного талому водорості кількість сульфатованих полісахаридів різна. Крім того, вони відіграють певну роль при виборі молекул, які входять в клітини, а також у підтримці іонного балансу між цитоплазмою і навколишнім середовищем (Aquino et al., 2005).

Багато досліджень, що стосуються функціонування сульфатованих полісахаридів у клітинних стінках морських водоростей, доводять їх участь у захисті від варіювання рівня солоності, окисного стресу, токсичності важких металів, екстремальних змін рН і температури (Deniaud-Bouët et al., 2014). Сульфатування полісахаридів клітинних стінок морських водоростей вважають адаптацією до морської води, що має високий рівень сульфатних іонів (Fisko-Blean et al., 2015). Нещодавно було виявлено, що сульфатовані полісахариди наявні в деяких прісноводних макроводоростях *Cladofora* spp. і окремих судинних рослинах. *Cladofora surera*, яка здатна рости у прісній і морській воді, накопичує їх у водному середовищі, що не містить солей. Цей результат порушує нові питання щодо ролі сульфатованих полісахаридів у клітинних стінках морських водоростей, які не обов'язково пов'язані з сольовим стресом (Arata et al., 2017).

Сульфатовані полісахариди є переважаючими матричними компонентами клітинних стінок морських водоростей і відрізняються за своєю структурою між різними групами макроводоростей. Червоні водорості (Rhodophyta) містять галактани (агар і карагінан та ін.), бурі (Phaeophyta) — фукозовмісні сульфатовані полісахариди, зелені (Chlorophyta) — ульвани. Виникнення сульфатованих полісахаридів у морських водоростях корелює з конвергентною адаптацією до середовища, великим вмістом солей і не корелює з філогенетичними відстанями (Deniaud-Bouët et al., 2017).

6.4. Полісахариди бурих водоростей (фукоїдани, альгірати)

Сульфати фуканів: фукоїдани

Структура. Фукозовмісні сульфатовані полісахариди розміщені в клітинних стінках і внутрішньоклітинних просторах бурих водоростей класу Phaeophyceae (Ale et al., 2011). Їх фукани (фукоїдани) мають комплексну і гетерогенну структуру, що робить нелегким виявлення повторюваних структур, навіть якщо вони наявні. Основні труднощі виникають через нерегулярний розподіл окремих структурних одиниць уздовж вуглеводневого ланцюга, високий ступінь сульфатування і галуження (Usov et al., 2009). Гомополімерні сульфатовані фукани мають повторювані ланки α -L-фукопіранозних залишків, з'єднаних (1 \rightarrow 3)- або почерговими (1 \rightarrow 3)/(1 \rightarrow 4)-зв'язками. Короткі фукозидні (фукоолігосахаридні) бічні ланцюги можуть бути O4, зв'язаними із залишками α -L-фукопіранози основного ланцюга. Крім залишків α -L-фукопіранози фукоїдани містять незначні кількості галактози, ксилози, глюкози, манози, уронових кислот, які можуть бути сульфатованими та (або) ацетильованими (Bilan et al., 2006; Ale et al., 2011; Jiao et al., 2011). Сульфатування фуканів відбувається в положеннях фукопіранозних залишків C4, C2 або рідко в C3 (Ale, Meyer, 2103). Структури фукоїданів залежать від виду водорості та умов вирощування. Фукоїдани становлять 40 % маси стінок водоростей і понад 20 % біомаси сухої речовини водорості (Pomin, Mourão, 2008).

Синтез. Сульфатовані гомофукани полімеризуються з утворенням нейтральних полісахаридів за участю однієї або кількох фукозилтрансфераз. Мономери гомофуканів — це похідні ГДФ-L-фукози, які, ймовірно, синтезуються de novo з ГДФ-манози. Проміжними ланками цього шляху є ГДФ-4-кето-6-дезоксиманоза і ГДФ-4-кето-6-дезоксигалактоза, що утворюються за участю ГДФ-маноза-4,6-дегідратази і біфункціональної ГДФ-1-фукозасинтази відповідно. ГДФ-фукозу також можна отримати з L-фукози з фукоза-1-фосфатом як проміжної сполуки (Skriptsova, 2015). Нейтральний ланцюг фукану можна синтезувати за участю лише α -1,3-фукозилтрансферази або з використанням як α -1,3-фукозилтрансферази, так і α -1,4-фукозилтрансферази. Після реакції полімеризації відбувається специфічне сульфатування (Ficko-Vlean et al., 2015). Фукоїдани етерифікуються сульфатними групами 3-фосфат-5-фосфосульфату, до складу якого входить асимільований сульфат (Skriptsova, 2015).

Альгірати

Структура. Альгірати — це нерозгалужені структурні полісахариди, компоненти клітинних стінок і міжклітинного матриксу бурих водоростей, що становлять до 47 % маси сухої речовини водоростей і містять катіони: K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} (Florez et al., 2017). Вони складаються з β -*D*-мануронової кислоти та її C5-епімеру — α -*L*-гулурунової кислоти, які зв'язані глікозидними (1→4)-зв'язками в різних співвідношеннях. Альгірати можуть складатися з майже одного типу мономерів (β -*D*-мануронат або α -*L*-гулуруонат) чи приблизно рівних пропорцій обох мономерів. Ці полісахариди також можуть містити гомополімерні ділянки (блоки β -*D*-мануронату — М-блок або α -*L*-гулуруонату — Г-блок), що чергуються з ділянками змінної структури (Draget et al., 2005). Співвідношення мономерів і властивості альгіратів залежать від виду організму: різні види бурих водоростей, деякі бактерії (*Pseudomonas*, *Azotobacter*), періоду збору врожаю, частини талому і процедури екстракції. Основна відмінність між альгіратами водоростей і бактерій полягає в наявності О-ацетильних груп у положенні С2 у водоростей та (або) С3 у альгірату бактерій (Gacesa, 1988).

Синтез. Активованим попередником альгіратів є ГДФ-мануронова кислота, яка синтезується у цитоплазмі в ході поетапного перетворення фруктоза-6-фосфату. Основним джерелом останнього є глюконеогенез. Альгіратспецифічний і біфункціональний фермент фосфоманозоізомераза (ФМІ)/ГДФ-манозапірофосфорілаза (ГМП) каталізує дві стадії синтезу ГДФ-мануронової кислоти. Першу реакцію синтезу альгірату каталізує ФМІ: перетворення фруктоза-6-фосфату на маноза-6-фосфат. ГМП перетворює маноза-1-фосфат, який утворюється за участю фосфоманомутази, на ГДФ-манозу з одночасним гідролізом ГТФ. ГДФ-маноза дегідрогеназа є ключовим ферментом у біосинтезі альгірату, який каталізує практично необоротне перетворення ГДФ-манози на ГДФ-мануронову кислоту. Кофактором ГДФ-манозадегідрогенази є НАД(Н). Полімеризація залишків ГДФ-мануронової кислоти відбувається за участю альгіратної полімерази. Мануронан-С5-епімераза перетворює частину *D*-мануронату в полісахариді на α -*L*-гулуруонат (Gacesa, 1988; Draget et al., 2005).

6.5. Полісахариди червоних водоростей

Сульфатовані галактани: агари, карагінани

Структура. Сульфатовані галактани (агари і карагінани) належать до лінійних полісахаридів клітинних стінок червоних водоростей. Нативні агари і карагінани є сульфатовмісними поліаніонами, з меншою щільністю заряду в агарів. Ці полісахариди мають дуже складну хімічну структуру залежно від виду водорості, стадії життя і методу екстракції (McCandless, Craigie, 1979). Агар — основний компонент позаклітинної матриці деяких червоних макроводоростей (Usov, 2011; Chang et al., 2014). Він є сумішшю двох компонентів: лінійного полісахариду агарози, який складається з *D*- і *L*-галактози, і гетерогенної суміші менших молекул, названих «агаропектин». Агароза є нейтральним полісахаридом із повторюваними *D*-галактозними і 3,6-ангідро-*L*-галактозними ланками, з'єднаними β -(1→3)- і α -(1→4)-глікозидними зв'язками відповідно (Lee, et al., 2017). Ця лінійна структура становить до 70 % полісахаридів агару. Регулярна структура агарів часто маскується через різні хімічні модифікації: наявність сульфатних і метоксильних груп, ангідрогалактози (McCandless, Craigie, 1979). Дисахаридна агаробіоза β -*D*-галактоза-(1→4)-3,6-ангідро- α -*L*-галактопіраноза-(1→3) є основною повторюваною частиною агарів.

Карагінани — клас сульфатованих водорозчинних лінійних галактанів, до якого входять карабіозоїдні (або неокарабіозоїдні) субодиниці, він представлений широким спектром хімічних структур. Скелет карагінанів складається з почергово 4-зв'язаної α -*D*-галактопіранози і 3-зв'язаної β -*D*-галактопіранози з гетерогенною структурою сульфатування (Guibet et al., 2007). Існує дві основні відмінності між агарами і карагінанами: залишки, зв'язані в положенні C4, можуть бути 3,6-ангідро-*D*-галактозою (завжди у *D*-конфігурації), а залишки, зв'язані в положенні C3, частково C4- або C2-сульфатовані. Нативні карагінани мають гібридні структури з різним співвідношенням повторюваних дисахаридних одиниць. Основними дисахаридами карагінанів є карабіози, які відрізняються кількістю і положенням груп сульфатних естерів, і наявністю 3,6-ангідро-містка в α -зв'язаному залишку. К-, ι - і λ -карагінани відповідно заміщені однією, двома або трьома групами складного естеру сульфату на одиницю повторюваної дигалактози (Guibet et al., 2007; Collén et al., 2014).

Сульфатовані галактани також знаходять у зелених водоростях роду *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta), у яких ці полісахариди можуть мати велику кількість зв'язаних залишків пірувату і утворюють циклічні кеталі (Bilan et al., 2007).

Синтез. Порівняно з іншими сульфатованими полісахаридами біосинтез агару є недостатньо дослідженим. Поточні уявлення про біосинтез агару ґрунтуються на передбачуваній схожості цього процесу з біосинтезом ульвану і альгінату в зелених і бурих водоростях відповідно (Lee et al., 2017). Агар вважають кінцевим продуктом вуглеводневого метаболізму в червоних водоростей без подальшої його деградації з використанням вуглецю в інших циклах. УДФ-глюкоза-пірофосфорилаза каталізує оборотне перетворення глюкоза-1-фосфату і УТФ на УДФ-*D*-глюкозу. Остання є субстратом галактоза-1-фосфатної уридилілтрансферази, ферменту, який бере участь у біосинтезі УДФ-*D*-галактози, субодиниці агару в червоних водоростях. Глюкоза-1-фосфат також може стати субстратом ГДФ-глюкозапірофосфорилази з подальшим утворенням ГДФ-глюкози, субстрату ГДФ-маноза-3,5-епімерази, яка бере участь в утворенні другої субодиниці агару — ГДФ-*L*-галактози. УДФ- і ГДФ-галактозилтрансферази каталізують включення УДФ-*D*-галактози і ГДФ-*L*-галактози відповідно в полісахаридний ланцюг (Chang et al., 2014).

Шлях біосинтезу карагінанів ще не повністю зрозумілий, тому більшість етапів залишається вельми спекулятивною. Передбачається, що карагінани спочатку синтезуються в комплексі Гольджі, де відбуваються полімеризація і сульфатування. В результаті полімеризації УДФ-галактози за участю α -(1,3)- і β -(1,4)-галактозилтрансфераз утворюється нейтральний галактан. Сульфотрансфераза додає С6-сульфатну групу з утворенням *D*-галактоза-6-сульфату в галактані, ця реакція може відбуватися на стадії утворення УДФ-мономерів (Ficko-Blean et al., 2015). Дисахарид *D*-галактоза- β -(1 \rightarrow 4)-*D*-галактоза-6-сульфат є γ -карабіозою, її полісахарид — γ -карагінан. Активність різних сульфотрансфераз приводить до синтезу μ -, ν - і λ -карагінанів. Сформовані сульфатовані галактани переносяться в клітинну стінку, де утворюють 3,6-ангідро-містки з виникненням κ - і ι -карагінанів. Галактоза-6-сульфорилаза каталізує синтез κ -карагінану з μ -карагінану і θ -карагінану з λ -карагінану. Галактоза-2,6-сульфорилаза каталізує утворення ι -карагінану з ν -карагінану. ι -Карагінан також можна отримати з κ -карагінану сульфатуванням у положенні С2 (Collén et al., 2014; Ficko-Blean et al., 2015).

6.6. Полісахариди зелених водоростей

Ульвани (сульфатовані глюкуронамноксилікани)

Структура. Ульвани — це сильно розгалужені сульфатовані поліелектроліти представників Ulvales (Lahaye, Robic, 2007), вони суттєво різняться щільністю заряду молекули, її молекулярною масою, типами зв'язків, розподілом моносахаридів, галуженням, ступенем сульфатування. Хімічну структуру, склад і молекулярну масу ульванів складно встановити однозначно, оскільки вони залежать від виду, умов навколишнього середовища, методу екстракції і т. д. (Yaich et al., 2014). Основними компонентами ульванів є *L*-рамноза, *D*-ксилоза, *D*-глюкуронова кислота, *L*-ідуронова кислота, *D*-глюкоза і сульфатні групи, локалізовані переважно у положеннях C2 і C3 рамнози. Рамноза і глюкуронова кислота наявні здебільшого у формі альдобіуронової кислоти і сульфатованих альдобіуронових кислот, β -*D*-глюкуронозил (1 \rightarrow 4)- α -*L*-рамноза-3-сульфату (тип A_{3s}) і α -*L*-ідуронової кислоти (1 \rightarrow 4)- α -*L*-рамноза-3-сульфату (тип B_{3s}) (Lahaye, Robic, 2007). Інші типи альдобіуронової кислоти є мінорними ланками і містять глюкуронову кислоту як відгалуження на рівні O2 рамноза-3-сульфату або частково сульфатованої ксилози, яка заміщує уронову кислоту (Robic et al., 2009). Природа ульванів і частка різних послідовностей цукрів у їх складі можуть слугувати хемотаксономічними маркерами водоростей. Вихід ульванів варіює від 8 до 29 % маси сухої речовини водоростей залежно від процедур екстракції та очищення (Lahaye, Robic, 2007).

Синтез. Схема біосинтезу ульванів оснований на останніх досягненнях вивчення біосинтезу матричних полісахаридів у різних організмах. Синтез основних мономерів ульванів відбувається по-різному. УДФ-*D*-глюкуронова кислота утворюється з УДФ-*D*-глюкози або інозиту. Потім формується УДФ-ксилоза в результаті інтерконверсії УДФ-*D*-глюкуронової кислоти. УДФ-*D*-глюкоза або dТДФ-*D*-глюкоза є можливими попередниками УДФ-*L*-рамнози. В ульванах ідуронова кислота формується вже на рівні полімеру. Полімеризація нуклеотидних попередників цукрів може відбуватися у везикулах комплексу Гольджі можливо одночасно з розгалуженням і сульфатуванням. Епімеризація глюкуронової кислоти з утворенням ідуронової кислоти, сульфатування і десульфатування, що відбуваються після утворення полімеру, можуть залежати від умов росту і зовнішніх чинників. β -1,4-Глюкуронозилтрансфераза і α -1,4-рамнозилтрансфераза ката-

лізують реакцію об'єднання УДФ-*D*-глюкуронової кислоти і УДФ-*L*-рамнози з утворенням альдобіоуронової кислоти. Існує два варіанти наступних трансформацій, в яких альдобіоуронова кислота перетворюється на альдобіоуронову кислоту B_{3s} або альдобіоуронову кислоту типу A_{3s} за участю сульфотрансферази і глюкуроніл-С5-епімерази в першому випадку. Сульфотрансферази переносять сульфогрупу від молекули донора, часто 3-фосфаденозин-5-фосфосульфату, до *L*-рамнози з утворенням *L*-рамнозо-3-сульфату або в деяких випадках до *D*-ксилози в положення С2 (Ficko-Blean et al., 2015).

6.7. Особливості та застосування сульфатованих полісахаридів

Відомо, що більшість сульфатованих полісахаридів мають властивості, характерні для гідрофільних колоїдів, внаслідок наявності гідроксильних і сульфатних груп в їх ланцюгах. За певних умов вони можуть утворювати гідрогелі, тривимірні сітки, здатні утримувати велику кількість води (Arata et al., 2017). Гідрогелі сульфатованих полісахаридів комерційно використовують як гелеформувальні та стабілізуючі агенти при виробництві харчових продуктів і косметичних засобів. Вони також є біоматеріалом для біомедичного застосування: інкапсуляції клітин, ферментів або біологічно активних сполук при виробництві, наприклад, протизапальних препаратів, системи доставки ліків, а також у тканинній інженерії. Гелеформувальна здатність і біологічна активність сульфатованих полісахаридів дають змогу використовувати ці сполуки як сировину для виробництва дієтичних добавок або функціонального харчування (Pankiewicz et al., 2015; Wells et al., 2017).

Карагінани і агарі широко використовують у різних галузях промисловості через їх унікальну здатність до формування міцних гелів. Сульфатовані галактани застосовують як структуруючі агенти при виробництві харчових продуктів. Модифікація скелета сульфатованих галактанів суттєво впливає на їхні фізико-хімічні властивості і, як результат, потенційне застосування цих сполук (Pomin, Mourão, 2008). Приблизно 80 % промислово виробленого агару використовують у виробництві продуктів харчування, а решта 20 % — для біотехнологічних цілей (Maeda et al., 2005). Нейтральна регулярна агароза є найпотужнішим гелеформувальним полісахаридом, тому високоякісні агарі отримують із

сировини з великим вмістом незаміщеної агарози (Usov, 2011). Агарозний гель має високу міцність за низької концентрації, у зв'язку з цим його широко використовують як антиконвекційне середовище у хроматографії та гель-електрофорезі. Водні розчини агарів зазвичай формують термічно оборотні гелі (McCandless, Craigie, 1979). Основними джерелами агару є червоні водорості, такі як *Gracilaria*, *Gelidium*, *Hypnea* і *Gigartina* (Ruocco et al., 2016). Карагінани є одним із головних інгредієнтів для структурування продуктів у харчовій промисловості, слугують як загусники, желеутворювальні та стабілізуючі агенти. Їх використовують у виробництві різних немолочних продуктів харчування (шоколадне молоко, желе, соуси, сир тофу і т. д.) і непродовольчих товарів (у косметичних, фармацевтичних композиціях тощо). Здатність до желеутворення деяких карагінанів залежить від наявності певних катіонів, таких як K^+ , Rb^+ , Cs^+ . κ - і ι -Карагінани, а також μ - і ν -карагінани можуть утворювати гелі за наявності іонів калію (K^+), тоді як λ -карагінан не може формувати гель (McCandless, Craigie, 1979). Кількість біосинтетичних попередників, μ - і ν -карабіозних ланок у ланцюгах κ - і ι -карагінану відповідно сильно впливає на здатність цих макромолекул до желеутворення (Guibet et al., 2007). Основним джерелом комерційного карагінану є *Chondrus crispus* («ірландський мох») — значно поширена в північній частині Атлантичного океану карагінофітна червона водорість (Ficko-Blean et al., 2015).

На відміну від нерозчинної альгінової кислоти альгінати калію і натрію у воді утворюють колоїдні розчини. За наявності певних двовалентних або багатовалентних катіонів, особливо Ca^{2+} , в розчинах альгінатів виникають гелі. Цю властивість альгінатів використовують при створенні мікрокапсул і штучних клітин, а також деяких харчових продуктів. Альгінати, багаті М-блоками, утворюють гнучкіші й слабкіші гелі, ніж альгінати, збагачені Г-блоками, оскільки останні мають вищу спорідненість до іонів Ca^{2+} , ніж М-блоки. Більшість альгінатів містять усі три типи блоків і в середньому утворюють гелі з класичною структурою. Альгінатні гелі зазвичай термостабільні в діапазоні 0—100 °С, на відміну від гелів карагінану або агару/агарози (Gacasa, 1988). Усі комерційні альгінати отримують з водоростей, велику їх частину — із родів морських бурих водоростей: *Macrocystis*, *Laminaria* і *Ascophyllum*. Альгінати є поліелектролітами і єдиними природними полімерами, що містять карбоксильну групу на кожному з мономерів. Сульфатування альгінатів хлоросульфоною

кислотою утворює біополімер з високими антикоагуляційними властивостями, такими як у гепарину (Arlov, 2012). Їх зазвичай застосовують у формі гідрогелю в біомедицині, при загоєнні ран, доставці ліків і у тканинній інженерії: з метою доставки клітин до місця трансплантації забезпечують простір для нового формування тканини, контролюють структуру і функцію сконструйованої тканини. Біосумісність, м'які умови гелеутворення і простота модифікацій, які дають змогу отримувати альгінатні похідні з новими властивостями, є найціннішими властивостями альгінату як біоматеріалу (Lee, Mooney, 2012).

Основним джерелом фукоїданів є *Fucus vesiculosus*. Усі фукоїдани мають широкий спектр біологічної дії, який, імовірно, визначається ступенем їх сульфатування, тонкою структурою, моносахаридною композицією і молекулярною масою (Skriptsova et al., 2010). Деякі біологічні активності залежать від розміщення сульфатних груп і десульфатування або додаткове «пересульфатування» можуть істотно змінити активність фукоїданів. Терапевтичний потенціал фукоїданів як і раніше використовують недостатньо через велику молекулярну масу і структурну гетерогенність цих сульфатованих полісахаридів (Florez et al., 2017).

За міцністю зв'язування з ульванами іони важких металів розміщуються в такому порядку: $\text{Al} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Zn} > \text{Cd} = \text{Mn} > \text{Sr} > \text{Mg} = \text{Ca}$. Зв'язування Cu^{2+} з ульваном, що походить з *Ulva rigida*, залежить від вмісту в ньому ідуронової кислоти (Paradossi et al., 2002). Здатність до селективного зв'язування іонів важких металів дає підстави розглянути перспективу використання ульванів як біоіндикаторів для моніторингу забруднення важкими металами прибережних вод, використовувати їх для розробки іонообмінників з особливою іонною селективністю для очищення промислових стоків або збагачення продуктів харчування, кормів, ґрунтів особливими мінеральними елементами. Ульвани здатні створювати гелі за наявності іонів двовалентних катіонів ($\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Ca}$) і борної кислоти при рН 7,5–8,0 (Lahaye, Robic, 2007).

Ульвани отримують переважно з *Ulva* spp., їх відносять до харчових нетоксичних волокон, які не розкладаються під дією ендогенних ензимів людини. Вони можуть бути джерелом рідкісних цукрів — попередників для синтезу тонких хімічних речовин. Наприклад, рамнозу з ульванів використовують для синтезу ароматичних сполук, а ідуронову кислоту — аналогів гепарину з антитромботичною активністю. Ульвани також можна застосову-

вати в сільському господарстві для захисту рослин від інфекції патогенними грибками (Lahaye, Robic, 2007). Деякі біологічні ефекти сульфатовані полісахариди, такі як антиоксидантна активність і здатність поліпшувати регенерацію шкіри, створюють передумови для використання їх у виробництві нових антивікових і регенерувальних видів косметики. Ульвани є природними аніонними полімерами, їх можна використовувати як поверхнево-активні речовини в косметичі та у виробництві мийних засобів (Pankiewicz et al., 2015). Деякі види біологічної активності (імунomodуючі та ін.) значно знижуються після десульфатації ульванів (Patel, 2012).

6.8. Екзополісахариди

Утворення позаклітинних полісахаридів морськими мікродоростями відіграє величезну роль у формуванні та підтримці морських екосистем (Urbani et al., 2005; Шнюкова, Золотарьова, 2015). Екзополісахариди, будучи продуктами фотосинтетичної фіксації неорганічного вуглецю, включаються в трофічний ланцюг океанів як первинна ланка, беруть участь у створенні симбіотичних асоціацій (біоплівок), важливих у геохімічних і біологічних процесах (Шнюкова, Золотарьова, 2017). Синтезовані щорічно морськими діатомовими водоростями ЕПС становлять близько 40 % органічної речовини Світового океану, що відповідає приблизно 20 % глобальної первинної продукції (Шнюкова, Золотарьова, 2015).

Екзополісахариди поділяють на дві групи: гомополісахариди, що складаються з одного типу моносахариду, такі як декстран або леван, і гетерополісахариди — ксантони або гелани, які мають складну структуру і включають кілька типів моносахаридів (Donot et al., 2012).

Молекулярна маса ЕПС мікродоростей становить $0,5\text{--}2 \cdot 10^6$ кДа. Вони містять переважно складні гетерополісахариди з високим ступенем галуження (Xiao, Zheng, 2016). Передбачається існування як мінімум двох можливих шляхів утворення ЕПС з фіксованого при фотосинтезі вуглецю. Вони можуть синтезуватися безпосередньо з фотоасимілятів або із запасних глюканів за участю екзо-(β -1,3)-*D*-глюканази (Underwood et al., 2004). Трансформація запасних глюканів в ЕПС відбувається також у темряві, причому в цьому разі продукування низькомолекулярних вуглеводнів швидко припинялося, а кількість ЕПС збільшувалась до

85—99 % позаклітинних полімерних вуглеводнів (Smith, Underwood, 2000). Існує, однак, невідповідність між моносахаридним складом глюканів, що складаються здебільшого (понад 90 %) із глюкози, і складом багатьох типів ЕПС, які крім глюкози містять значні кількості інших моносахаридів і уронових кислот. Отже, хоча глюкоза з глюкану може безпосередньо включатися в ЕПС, інші моносахариди мають бути синтезовані *de novo*. Глюкан у цьому разі може бути джерелом енергії і вуглецю для їх біосинтезу, особливо в темряві. Аналіз результатів дослідження показав, що ЕПС у діатомових синтезуються в тільцях комплексу Гольджи і переносяться транспортними везикулами до клітинної мембрани. Ці везикули потім зливаються з мембраною і ЕПС видавлюються через шов, тріщини або інші пори у кремнієвому панцирі (фрустулі) діатомей (Wang et al., 2000).

Більшість схем біосинтезу ЕПС містять глікозилтрансферази, які каталізують приєднання глікозильних груп до ланцюга ЕПС, що зростає з використанням як донори вуглеводні похідні нуклеотидів. Моносахаридний склад ЕПС різних видів діатомових водоростей відрізняється, основними складовими зазвичай є глюкоза, галактоза, фукоза і маноза (Abdullahi et al., 2006; Gügi et al., 2015). За насичення живильного середовища біогенними елементами діатомові водорості *Cylindrotheca closterium* (Ehrenburg), *Navicula perminata* (Grün.) і *Amphora exigua* (Greg) продукували комплекс ЕПС, що містить рамнозу, фукозу, ксилозу, манозу, галактозу, глюкозу і уронові кислоти, а в разі лімітування живлення клітини додатково виділяли ЕПС, до складу яких входять маноза, галактоза, глюкоза і уронові кислоти. Обидва типи ЕПС виділялися клітинами при освітленні і в темряві (Gügi et al., 2015). Практично всі ферменти, що беруть участь в біосинтезі різних моносахаридів, які формують ЕПС, виявлені в діатомових водоростей.

Клітини, що ростуть у культурі за оптимального живлення, продукують більше неполімерних позаклітинних вуглеводнів, ніж ЕПС. В умовах недостатнього мінерального живлення загальмовується багато метаболічних процесів, які залежать від доступності біогенних елементів, водночас фотосинтетичне виробництво вуглецевих скелетів може перевищувати потреби росту, а якісний склад біомаси мікроводоростей змінюватися (Stepanov, Zolotareva, 2015; De Farias Silva et al., 2018). Цей надлишковий вуглець може зберігатися у вигляді вуглеводнів (хризоламінарин), ліпідів (ТАГ) або виділятися як ЕПС. В умовах дефіциту поживних ре-

човин у низки діатомових водоростей зростає утворення ЕПС до 44—69 % загального пулу полісахаридів (Underwood et al., 2004; Abdullahi et al., 2006). Зазвичай лімітування за фосфором є потужнішим індуктором виробництва ЕПС, ніж дефіцит азоту, хоча існують і протилежні приклади (Xiao, Zheng, 2016).

За нестачі фосфору змінюються моносахаридний склад і ступінь полімеризації ЕПС. Ці зміни видоспецифічні (Urbaní et al., 2005; Abdullahi et al., 2006). Найвищі рівні екскреції ЕПС зазвичай спостерігають при переході від експоненційного до стаціонарного росту, що збігається з виснаженням середовища за фосфатом (Underwood et al., 2004; Abdullahi et al., 2006).

Незважаючи на велику цікавість до позаклітинних полісахаридів мікроводоростей як джерела первинної органічної речовини в морських екосистемах, шляхи і регуляція біосинтезу ЕПС залишаються маловивченими, як і підходи до їх можливого використання у біотехнології.

**ПРОДУКУВАННЯ ЗАПАСНОГО
ПОЛІСАХАРИДУ ПАРАМІЛОНУ
МІКРОВОДОРІСТЮ *EUGLENA GRACILIS***

Ефективність трансформації світлової енергії мікроводоростями набагато перевищує фотосинтетичну ефективність вищих рослин, у зв'язку з чим промислове культивування мікроводоростей розглядають як перспективний напрям біотехнології, здатний забезпечити виробництво багатьох корисних сполук, а також сировину для біопалива (Золотарьова та ін., 2008). Метаболічна пластичність дає змогу мікроводоростям пристосовуватися до різних умов існування і використовувати для росту як неорганічний вуглець, так і різні органічні субстрати (Mykhaylenko et al., 2004; Sivash et al., 2004; Cheirsilp, Torpee, 2012; Mokrosnop, Zolotareva, 2014).

До таких мікроводоростей відносять *Euglena gracilis* (G.A. Klebs, 1883), яка здатна одночасно накопичувати амінокислоти, вітаміни і жирні кислоти (Takeyama et al., 1997; Ogbonna et al., 2002; Mokrosnop et al., 2016). Цей організм, що має гібридний фотоавтотрофно-гетеротрофний геном, в якому виявлено латеральне перенесення і злиття генів, часто використовують в еволюційних дослідженнях (Ahmadinejad et al., 2007).

Кінцеві продукти фотосинтетичної фіксації вуглецю формують у клітинах мікроводоростей депо полісахаридів, які виконують різні екологічні функції (Шнюкова, Золотарьова, 2015, 2017). У клітинах *Euglena gracilis* надлишок вуглецю і енергії накопичується як полісахарид парамілону, що утворюється за наявності в навколишньому середовищі органічних субстратів. Цей глюкан вперше відкрили саме у клітинах *E. gracilis* (Garlaschi et al., 1974).

Парамілон відносять до фібрилярних нерозгалужених β -(1,3)-глюканів (Freimund et al., 2003; Barsanti et al., 2011) (рис. 7.1). У клітинах *Euglena gracilis* цей полісахарид відкладається у формі висококристалізованих гранул і комплексу фібрилярних струк-

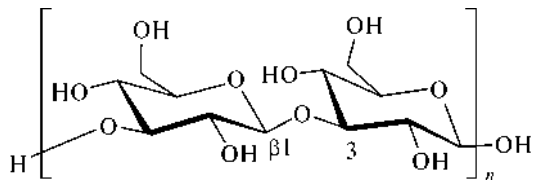


Рис. 7.1. Структурний елемент полісахариду парамілону

тур, локалізованих у цитоплазмі і оточених мономембраною (Kiss et al., 1988; Baumer et al., 2001). Рівень кристалізації гранул парамілону досягає 90 %, що відрізняє цей полісахарид від інших запасних продуктів рослин і водоростей. Мікрофібри гранул завтовшки 4–10 нм комплектуються по три і формують нерозгалужені спіралі.

Молекулярна маса парамілону перевищує 500 кДа (Baumer et al., 2001). Його гранули можуть хаотично розподілятися у цитоплазмі або накопичуватися в ділянці піреноїдів клітин *Euglena gracilis*. Зазвичай, чим більший розмір гранул, тим менше їх у клітині (Barsanti et al., 2001).

7.1. Синтез парамілону в клітинах *Euglena gracilis*

Синтез парамілону відбувається за участю парамілонсинтази (УДФ-глюкозо- β -1,3-глюкан- β -3-глікозилтрансферази), що складається з семи субодиниць мембранозв'язаного білкового комплексу з молекулярною масою 670 кДа (Väumer et al., 2001). Найбільшу каталітичну активність парамілонсинтаза проявляє за рН 7,5–8 і температури 20–23 °С. Субстратом парамілонсинтази є УДФ-глюкоза ($K_M = 12,5$ мкМ, $V_{\text{макс}} = 0,24$ нМ/(хв · мг білка)), яка утворюється з глюкозо-1-фосфату за участю уридилтрансферази (Marechal, Goldemberg, 1964; Kiss et al., 1988). Як і у процесі біосинтезу глікогену, каталітичне перенесення глюкози з УДФ-глюкози супроводжується формуванням білок-глюканового комплексу (O'Neill et al., 2015; Takeda et al., 2015). Ультраструктура мембрани, яка оточує гранули парамілону, змінюється залежно від активності синтезу запасного полісахариду (Kiss et al., 1988). Парамілонсинтазну активність виявлено в мембранній фракції гранул парамілону. В клітинах, культивованих у гетеротрофних умовах, вона набагато вища, ніж у культурі, вирощеній автотрофно (Baumer et al., 2001).

Дослідження накопичення парамілону в клітинах *Euglena gracilis* за гетеротрофного культивування довели, що в нефотосинтетичній фіксації CO₂ клітинами мікрководорості беруть участь фосфоенолпіруваткарбоксилаза і ГТФ-залежна фосфоенолпіруваткарбоксикіназа. Перша з них каталізує перетворення фосфоенолпірувату на оксалоацетат у мітохондріальному матриксі. Друга, локалізована у внутрішній мітохондріальній мембрані, — перетворення оксалоацетату на фосфоенолпіруват, який вступає в ланцюг реакцій глюконеогенезу вже поза матриксом мітохондрій. Синтез парамілону і накопичення його зерен відбуваються у везикулах мітохондрій, відокремлених внутрішньою мітохондріальною мембраною від їх матриксу (Cook, 1965; Briand et al., 1980, 1981; Calvayrac et al., 1981). За фотогетеротрофного культивування гранули парамілону накопичуються не лише у везикулах мітохондрій, а й в ділянці піреноїду хлоропластів, де синтез полісахариду здійснюється в результаті енергії світла і карбоксилазної активності Rubisco (Cook, 1965). При такому культивуванні в клітинах формується система везикул із парамілоном, яка може бути структурним посередником між мітохондріоном і хлоропластами, який розділяє ці два компартменти лише однією мембраною (Calvayrac et al., 1981).

7.2. *Euglena gracilis* як продуцент парамілону

Парамілон доволі поширений у природі полісахарид, що синтезується у клітинах багатьох бактерій, грибків, водоростей і вищих рослин (Freimund et al., 2003; Michel et al., 2010). У промисловому масштабі для отримання парамілону використовують пекарські або пивні дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*. В результаті комплексного процесу екстракції полісахариду досягається його збір у кількості лише 7—9 % біомаси сухої речовини мікроорганізму (Ivusic et al., 2015). β-1,3-Глюкан у клітинах цих організмів локалізується у клітинній стінці, становить 50—55 % біомаси її сухої речовини (Shokri et al., 2008). Зазвичай β-1,3-глюкани відкладаються в негранулярній формі в усіх організмах, крім евгленіодних (Baumer et al., 2001). Гранули парамілону, вміст яких може досягати 95 % маси клітин *Euglena gracilis*, на 100 % складаються з глюкози і мають надзвичайно високий для природних макромолекул рівень кристалізації (Barsanti et al., 2011). Оточена однією мембраною гранула парамілону складається із трикутних

і прямокутних сегментів, кожен з яких має кілька шарів (Kiss et al., 1986). Подібно до целюлози парамілон об'єднаний в мікрофібрили діаметром 4 нм, що складаються з потрійних спіралей β -1,3-глюканових ланцюгів, які далі об'єднуються у товщі волокна. Високорівневе об'єднання мікрофібрил і взаємодія їх з молекулами води сприяють утворенню висококристалічної структури парамілону (Kiss et al., 1988). Така форма організації цього полісахариду в клітинах мікроводорості значно полегшує його виділення. Для цього достатньо зруйнувати клітини, вкриті білковою оболонкою, і промити гранули розчином детергенту низької концентрації (Barsanti et al., 2011).

Фізіологічні та біохімічні властивості мікроводоростей дають підставу змінювати у широких межах умови їх вирощування, підбирати найефективніші та маловитратні. Вирощування *Euglena gracilis* за низьких значень рН (2,5—3,5) може знизити ймовірність контамінації, а також стимулювати ріст культури (Barsanti et al., 2001). Для росту мікроводорості й накопичення парамілону в її клітинах як живильне середовище можна використовувати гідратовані відходи сільськогосподарської або цукрової промисловості. Для отримання великих обсягів біомаси *E. gracilis* успішно застосовують біореактори і відкриті системи (Barsanti et al., 2001).

7.3. Динаміка накопичення β -1,3-глюкану за різних способів живлення культури *Euglena gracilis*

Синтез полісахариду активно відбувається в експоненційній фазі росту культури як на світлі, так і в темряві (Briand et al., 1980). Рівень накопичення парамілону в клітинах періодичної культури *Euglena gracilis* за наявності лактату (сукцинату, глутамату, ацетату) змінюється разом зі змінами фаз її росту. Максимальну активність фосфоенолпіруваткарбоксилази за наявності 33 мМ лактату спостерігали на 18-ту годину культивування, на 36-ту годину вона знижувалась (Cook, 1965). У процесі вирощування клітин культури *E. gracilis* на світлі в ранній експоненційній фазі росту істотно підвищувалась не лише активність фосфоенолпіруваткарбоксилази, а й карбоксилазна активність RUBISCO і активність фосфоенолпіруваткарбоксикінази (Calvayrac et al., 1981).

На світлі та у темряві вміст полісахариду після інокуляції клітин в живильне середовище досягає максимального значення на 36-ту годину культивування, після чого стрімко знижується (Briand et al., 1980, 1981; Kiss et al., 1986). Використання лактату з міченими атомами вуглецю довело, що парамілон синтезується значною мірою із субстрату. Подібне дослідження асиміляції ацетату мікрободорості *E. gracilis* показало, що 75—80 % міченого вуглецю субстрату вбудовується у парамілон (Marzullo, Danforth, 1964). У цій же фазі росту в культурі на світлі активно відбуваються процеси фотосинтезу і дихання. Вуглекислий газ і кисень як кінцеві продукти дихання і фотосинтезу знову залучаються в метаболізм клітин і підтримують біосинтетичні процеси (Cook, 1963). Водночас на світлі й у темряві мінімально виділяється CO_2 , що утворюється під час окиснення субстрату в процесі дихання, це засвідчує його активну участь у процесах карбоксилювання (Marzullo, Danforth, 1964; Briand et al., 1980, 1981; Calvayrac et al., 1981).

У другій половині експоненційної фази росту кількість парамілону зменшується внаслідок його гліколітичної трансформації. У цей період клітини *Euglena gracilis* починають використовувати накопичений полісахарид для росту і розмноження, що спостерігають при незначному вмісті екзогенного субстрату (Rodriguez-Zavala et al., 2010). Коли вичерпується лактат у живильному середовищі, велика частина карбоксилазної активності пов'язана з активністю цитозольної фосфоенолпіруваткарбоксилази. У цьому разі фосфогліцерінова кислота, утворена у процесі гліколізу, потрапляє в цитозоль і перетворюється послідовно на малат, далі через проміжні фосфоенолпіруват і оксалоацетат входить в цикл трикарбонових кислот (Briand et al., 1981). Максимальна концентрація клітин *E. gracilis* з невеликим вмістом парамілону досягається до моменту переходу від експоненційної у стаціонарну фазу росту культури (Kiss et al., 1986).

Динаміка накопичення парамілону в клітинах міксотрофних і фотоавтотрофних культур наростає порівняно з гетеротрофною культурою, в якій максимальний вміст парамілону припадає на кінець експоненційної фази росту і в процесі подальшого культивування зменшується (Grimm et al., 2015). Фотоавтотрофне культивування формує невелику кількість гранул парамілону в клітинах *Euglena gracilis*, що концентруються поблизу піреноїду — в ділянці локалізації RUBISCO у хлоропластах. Піреноїди

знижують за достатньої кількості субстрату в середовищі і великого вмісту парамілону в клітинах, тобто протягом експоненційної фази росту фотогетеротрофної культури. Після досягнення стаціонарної фази піреноїди знову стають помітними (Kiss et al., 1986).

У процесі переведення культури *Euglena gracilis* в анаеробні умови вирощування активується синтез восків як запасних сполук замість полісахаридів. Цей процес отримав назву «ферментація воскових естерів» (Coleman, 1988b). Анаеробіоз стимулює синтез ліпідів в результаті індукції киснечутливої мітохондріальної піруватдегідрогенази, яка каталізує перетворення пірувату на ацетил-КоА. Водночас використовують вуглець парамілону, внаслідок чого спостерігають деградацію полісахариду і синтез воскових естерів. Вміст ліпідів може збільшитися з 5—10 до 55 % біомаси сухої речовини за 7 діб анаеробіозу. Коли кисень стає знову доступним, у клітинах *E. gracilis* ліпиди деградують і синтезуються парамілон (Coleman, 1988b).

7.4. Оптимізація умов культивування *Euglena gracilis* для збільшення виходу парамілону

Рівень накопичення біомаси і біохімічний склад клітин *Euglena gracilis* істотно залежать від способу вирощування мікробородістю (Kiss et al., 1986; Золотарьова та ін., 2008), так як і активність системи синтезу парамілону та акумуляція його гранул у клітинах (Mokrosnop, 2016). В оптимальних умовах вміст полісахариду може досягати 70 % біомаси сухої речовини клітин *E. gracilis* (Barsanti et al., 2011; O'Neill et al., 2015). У зв'язку з цим оптимізація складу живильного середовища має важливе значення у процесі використання *E. gracilis* як продуцента парамілону, оскільки забезпечує значне підвищення рентабельності біотехнологічного процесу.

Дослідження накопичення гранул парамілону залежно від умов освітлення довели, що при цілодобовому освітленні культур *Euglena gracilis* в їх клітинах формуються лише дуже маленькі гранули полісахариду, на відміну від культур, культивованих за періодичного освітлення. Формуванню більших зерен парамілону в клітинах сприяло вирощування культури в темряві. При гетеротрофному культивуванні *E. gracilis* можна отримати в 6 разів більше запасного полісахариду, ніж за фотоавтотрофного (Bri-

Таблиця 7.1. Накопичення парамілону в клітинах *Euglena gracilis* залежно від типу живлення культури (Grimm et al., 2015)

Тип живлення	Парамілон, г/л	Біомаса, г/л	Масова частка парамілону в біомасі, %
Автотрофний	0,6	3	20,0
Фотогетеротрофний	3	7	42,9
Гетеротрофний	9	12,2	73,8

Примітка. Як органічний субстрат використано глюкозу (22 г/л).

and, Calvaугас, 1980). Встановлено, що рН живильного середовища впливає на накопичення біомаси: зі збільшенням від 3 до 7 лінійно зменшується вихід біомаси і парамілону (Sanrek et al., 2009).

Гетеротрофне культивування *Euglena gracilis* з використанням глюкози (фруктози) як екзогенного джерела вуглецю є найефективнішим способом досягнення великого виходу парамілону в культурі (Cook, 1965; Garlaschi et al., 1974; Grimm et al., 2015) (табл. 7.1). Значно менш виражений позитивний ефект спостерігали в разі заміни глюкози на галактозу, лактозу, мальтозу або сахарозу у процесі культивування *E. gracilis* з метою отримання парамілону. Сахароза і мальтоза дуже повільно метаболізуються клітинами *E. gracilis*, а лактоза і галактоза, хоча і стимулюють поділ клітин мікроводорості, проте не сприяють накопиченню біомаси. Для вирощування *E. gracilis* у промислових масштабах можна ефективно використовувати сахарозу, але лише після попереднього гідролізу (хімічного або ферментативного) до глюкози і фруктози (Ivusic et al., 2015).

Під час фотогетеротрофного культивування *Euglena gracilis* за наявності глюкози майже дворазово зменшується вихід біомаси та парамілону (див. табл. 7.1). Такий результат пов'язують із взаємодією процесів фотосинтетичної асиміляції CO₂ і асиміляції органічного вуглецю клітинами. Глюкоза пригнічує фотосинтез навіть за низького освітлення (Nicolas et al., 1980; Mykhaylenko et al., 2004), а світло змінює проникність мембран, що, у свою чергу, зменшує поглинання глюкози клітинами. До того ж в умовах освітлення парамілон частково використовується для побудови фотосинтетичного апарату (Garlaschi et al., 1974; Grimm et al., 2015). Результати інших досліджень показали, що в процесі міксотрофного вирощування за наявності глюкози і (NH₄)₂SO₄

Таблиця 7.2. Залежність максимального рівня накопичення клітинами парамілону від внесення поживних екстрактів у культуральне середовище за гетеротрофного вирощування *Euglena gracilis* (Hutner et al., 1966; Sanrek et al., 2009; Ivusic, Santek, 2015)

Середовище культивування	Тривалість культивування, год	Максимальний вміст парамілону, г/л	Біомаса, г/л
СХ, 20 г/л глюкози	96	7	13,5
СХ + дріжджовий екстракт, 40 г/л	68	5,13	11,08
СХ + кукурудзяний екстракт, 30 г/л	68	8,28	15,65
СХ + кукурудзяний екстракт (30 г/л) + м'ясний екстракт (5 г/л)	120	8,35	17,05
СХ + картопляний розчин, 37,5 %	96	12	15,1

Примітка. СХ — середовище Хатнера.

можна отримати приблизно на 20 % більше біомаси, ніж при гетеротрофному культивуванні (Yamane et al., 2001). Підвищену інтенсивність росту міксотрофних культур порівняно з гетеротрофними пов'язують з ефективним використанням енергії світла, витраченої на анаболічні процеси, для забезпечення яких із живильного середовища асимілюються органічні джерела вуглецю (Yamane et al., 2001).

Внесення джерела азоту органічного або неорганічного походження може в кілька разів збільшити накопичення біомаси культурою (Rodriguez-Zavala et al., 2010; Ivusic et al., 2015). Останнім часом активно досліджують використання побічних продуктів харчових виробництв як джерел поживних речовин для вирощування *Euglena gracilis* і накопичення парамілону в її клітинах (табл. 7.2).

Серед досліджених дріжджового, м'ясного і кукурудзяного екстрактів останній мав найвищу поживну цінність для культури *Euglena gracilis* (див. табл. 7.2). Додавання кукурудзяного екстракту (20–30 г/л) в живильне середовище з глюкозою (20 г/л) стимулює накопичення парамілону (на 15 %) і ліпідів (на 40 %) за гетеротрофних і міксотрофних умов культивування відповідно (Rezic et al., 2013; Ivusic et al., 2015). Внесення в живильне середовище одночасно кукурудзяного і м'ясного екстрактів збільшу-

вало вихід біомаси, але незначно позначалося на вмісті в ній парамілоу (Ivusic et al., 2015).

Вирощування *Euglena gracilis* з використанням картопляного розчину, основного побічного продукту крохмальної промисловості, виявилось ефективнішим, ніж культивування на синтетичному середовищі. Картопляний розчин містить велику кількість мінеральних речовин, білків, амінокислот, цукрів і є відділеним від крохмальних зерен крохмальним молоком. Для швидкого отримання великого виходу біомаси і парамілоу в живильному середовищі використовували 37,5 % картопляного розчину і 25 г/л глюкози. Водночас вже на 4-ту добу вміст парамілоу перевищував 70 % біомаси. Культура, що росла на синтетичному середовищі Хатнера без добавляння картопляного розчину, містила не більш як 50 % парамілоу (Hutner et al., 1966, Sanrek et al., 2010).

Автотрофне культивування *Euglena gracilis* не розглядають при створенні оптимальних умов для накопичення парамілоу, оскільки цей спосіб вирощування не забезпечує накопичення ні великих кількостей біомаси, ні полісахариду в клітинах (Briand et al., 1981). За фотоавтотрофного культивування лише невелика кількість надлишкової енергії запасується як полісахарид, і рівень синтезу парамілоу зростає зі збільшенням інтенсивності світла в оптимальних межах (Cook, 1963).

7.5. Накопичення парамілоу за утилізації екзогенного етанолу в процесі міксотрофного культивування *Euglena gracilis*

Міксотрофний ріст багатьох мікроводоростей стимулюється за використання метанолу як джерела вуглецю і енергії (Stepanov, Zolotareva, 2015), однак більшість видів мікроводоростей не здатні утилізувати етанол (Stepanov, Zolotareva, 2011). Асиміляція етанолу відрізняє *Euglena gracilis* від більшості мікроорганізмів, для яких цей спирт токсичний (Мокросноп та ін., 2015а, б), його метаболізм у клітинах *E. gracilis* здійснюється в результаті дії мітохондріальних НАД⁺-дегідрогеназ і високоактивних альдегіддегідрогеназ, а також ферментів гліоксилатного циклу, ізоцитратліази і малатсинтази. За окиснення етанолу алкоголь- і альдегіддегідрогеназ у мітохондріях генерується енергія у вигляді АТФ і синтезується ацетил-КоА.

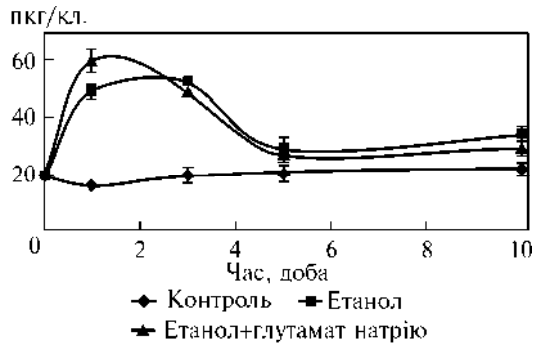


Рис. 7.2. Накопичення парамілону клітинами *Euglena gracilis* у процесі міксотрофного культивування за наявності 100 мМ етанолу

У процесі гліоксилатного циклу синтезуються С4-сполуки, які залучаються до глюконеогенезу (Yoval-Sanchez, 2011). Більшість досліджень впливу етанолу на метаболізм мікроводорості *Euglena gracilis* проводили в умовах гетеротрофії на клітинах, не здатних до фотосинтезу. Культивування *E. gracilis* на світлі за наявності етанолу досліджено недостатньо. Припускають, що внаслідок цього процесу можуть бути отримані інші характеристики дихання і акумуляції цінних метаболітів клітинами. У міксотрофних (Мокросноп та ін., 2015а, б) і гетеротрофних умовах етанол активує дихання, глюконеогенез і фотосинтетичне виділення кисню.

Добавлення 1%-го етанолу як джерела вуглецю в живильне середовище мікроводорості *Euglena gracilis* з малатом і глутаматом збільшує вихід біомаси і парамілону в періодичній гетеротрофній культурі майже у 5 разів на 5-ту добу культивування. Приблизно такий самий результат отримано в разі заміни етанолу на глюкозу, але внаслідок більшого вмісту парамілону в клітинах (Marzullo, Danforth, 1964).

У наших дослідах вміст парамілону в культурах з етанолом варіював у процесі їх росту (рис. 7.2). У 1-шу добу культивування зафіксовано різке збільшення вмісту запасного полісахариду в клітинах культури з етанолом та в разі добавлення етанолу і глутамату натрію. До 5 діб поступово знижувалась концентрація парамілону в клітинах міксотрофних культур, яке все ж не досягло контрольного рівня. У клітинах контрольного варіанта рівень парамілону не змінювався, а його концентрація (~20 пкг/кл.) протягом всього періоду досліджень залишалася незмінною (Мокросноп, 2016).

Порівнявши ефект етанолу з іншими екзогенними джерелами органічного вуглецю, автори (Rodriguez-Zavala et al., 2010) дійшли висновку, що цей спирт легше, ніж глюкоза, асимілюється клітинами та інтенсифікує ріст культури. При вирощуванні її з етанолом за відсутності додаткових джерел азоту поділ клітин культури інгібується, однак кількість накопиченого полісахариду в клітинах і розмір самих клітин збільшуються майже вдвічі (Coleman, 1988a; Rodriguez-Zavala et al., 2010).

Вивчення впливу етанолу на метаболізм клітин *Euglena gracilis*, культивованих гетеротрофно, встановило, що цей спирт швидко окиснюється у клітинах до ацетату, 50 % вуглецю якого вбудовується у парамілон. Також є дані стосовно того, що етанол як субстрат пригнічує гліколіз у клітинах і змінює напрям метаболічних перетворень пірувату на користь переваги глюконеогенезу над синтезом білків, ліпідів і нуклеїнових кислот.

Водночас кількість CO₂, який виділяється у процесі дихання, зменшується до 10 %, а 70 % глюкози клітин вбудовується в парамілон. За використання глюкози як субстрату лише 25—30 % її переходить до складу запасного полісахариду (Garlaschi et al., 1974). Пригнічування синтезу полісахариду під час фотогетеротрофного культивування пояснюють стимуляцією світлозалежного синтезу ліпідів, пігментів, білків за наявності додаткових джерел азоту (Coleman et al., 1988a, b).

7.6. Перспективи використання парамілону *Euglena gracilis* у фармакології та ветеринарії

Аналіз результатів досліджень впливу β-глюканів на здоров'я людини (Bashir, Choi, 2017) встановив, що ці полісахариди знижують рівень насичених жирів у крові та можуть зменшити ризик серцевих захворювань. β-Глюкани мають сильну імунomodulatory і антиостеопатичну активність, що було доведено клінічними випробуваннями *in vitro* на тваринах і людині. Вивчено ефективність використання β-глюканів як протимікробних, протипухлинних, антидіабетичних засобів, а також з'ясовано їх здатність запобігати остеопорозу (Bashir, Choi, 2017). Ці полісахариди можуть пригнічувати ріст пухлин активуванням макрофагів і клітин-кілерів, що діють цитотоксично на клітини пухлин, які експресують цитокіни. Онкостатична дія β-глюканів також може бути пов'язана з уповільненням ангиогенезу в осередках росту

пухлини. Механізм дії β -глюканів включає їх зв'язування з клітинними рецепторами, яке стимулює імунну відповідь (Rodríguez-Zavala et al., 2010). Однак систематичне вивчення клінічного і фізіологічного значення β -глюканів не проводили.

Застосування β -глюканпарамілоу в медицині і ветеринарії надзвичайно перспективно. До біологічно активних і лікувальних властивостей парамілоу відносять його здатність до стимуляції імунної системи організму, захисту від вірусних і бактеріальних інфекцій, а також протипухлинну і радіопротекторну дію. Цей полісахарид також використовують для підгодівлі тварин, оскільки він активує імунітет і стимулює їх ріст, також сприяє зниженню рівня холестерину в крові, регулюючи глікометаболізм (Freimund et al., 2003; Barsanti et al., 2011).

Отже, парамілон можна використовувати для профілактики і лікування захворювань серцево-судинної системи і раку — найпоширеніших захворювань у промислово розвинених країнах (Barsanti et al., 2011).

ПРОДУКУВАННЯ ВІТАМІНУ Е ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИМИ ЕУКАРІОТАМИ

В організмі людини постійно утворюються вільні радикали і активні форми кисню (АФК), які ушкоджують структуру компонентів клітин: ДНК, білків, вуглеводнів і ліпідів. Подібна руйнівна дія спостерігається у разі відхилення від нормального редокс-стану клітин і розвитку оксидативного стресу, що спричинює порушення тканин, старіння, атеросклероз, нейродегенеративні, серцево-судинні захворювання та індукування розвитку ракових пухлин. У боротьбу з АФК вступає антиоксидантна система організму, що поділяється на ферментативну і неферментативну. До останньої відносять і вітамін Е, який разом із коферментом Q10, β -каротином є ліпофільним антиоксидантом. З огляду на хімічну реактивність і фізіологічні концентрації вітаміну Е можна зазначити, що він є найважливішим ліпофільним антиоксидантом *in vivo*. До того ж лише антиоксидантною функцією роль вітаміну Е в організмі людини і тварин не обмежується (Rippert et al., 2004; Abbasi, 2007; Munne-Bosch, 2007; Li et al., 2008).

α -Токоферол — домінуюча ізоформа вітаміну Е в більшості тканин людини, в тому числі у плазмі крові концентрацією 20,5—26,8 мкмоль/л. Інші форми токохроманолів наявні у значно менших кількостях, наприклад, γ -токоферолу всього 1,5—3,0 мкмоль/л. За наявності в організмі людини α -токоферолтранспортувального білка (α -ТТБ), синтезованого клітинами печінки і мозку, відбувається вибіркове перенесення здебільшого α -ізоформи токоферолу в плазму крові (Sattler et al., 2004).

α -Токоферол є складовою вітаміну Е, яка проявляє найвираженішу активність, водночас на α -токоферол її припадає лише 10—20 %. Антиоксидантна активність токоферолів *in vivo* зменшується в напрямку α -Т > β -Т > γ -Т > δ -Т відповідно до рівня (α > β = γ > δ) і патерну метилювання (Rippert et al., 2004; Sattler et al., 2004). Токотриеноли, хоча і проявляють кращу антиокси-

дантну активність за більшої рухливості в межах мембрани, проте їх кількість зазвичай занадто мала (Sattler et al., 2004).

Біологічна активність 1 мг вітаміну Е, вимірювана в інтернаціональних одиницях (ІО), відповідає 1 ІО для хімічно синтезованого рацемату *dl*- α -токоферолу-ацетату і 1,49 ІО для природного *d*- α -токоферолу. Отже, вітамін Е, отриманий з натуральних джерел, у ~1,5 рази активніший за синтетичний (Friedrich, 1988; Henry, Qungang, 2005). Національними інститутами здоров'я США визначено рекомендовану добову дозу вітаміну Е для дорослої людини, яка становить 15—19 мг, що відповідає 22—28 ІО натурального *d*- α -токоферолу. Це значення може збільшуватись до 100—1000 ІО задля сприяння поліпшення стану в разі деяких захворювань (Henry, Qungang, 2005).

Вітамін Е застосовують у фармакології та косметології, в харчовій промисловості для продовження терміну зберігання продуктів. Переважну кількість виробленого вітаміну Е згодують тваринам, близько чверті іде на потреби людини, для чого насамперед використовують вітамін Е природного походження. Загальна маса токоферолу, спожита для цих потреб, у 2002 р. становила близько 40 тис. т, з яких 4 тис. були екстраговані з натуральних джерел, тобто лише 10 %. Природним джерелом вітаміну Е, що комерційно продається, є олії, переважно соєва. Натуральний вітамін Е приблизно у 2 рази дорожчий, ніж синтетичний, отриманий з ізофітолу і триметилгідрокінону, добутих із викопного палива (Henry, Qungang, 2005).

Біотехнологічно створені культури можуть бути потенційними альтернативними джерелами вітаміну Е, забезпечувати ще дешевше продукування цих сполук, ніж хімічний синтез. Найвищі концентрації природних токоферолів знайдено в насінні олієвмісних культур, таких як ріпак, олійна пальма, соя, сафлора і соняшник, у насінні якого середня концентрація токоферолів у 10—20 раз вища, ніж в інших тканинах (Qungang, 2005). Результати досліджень, проведених на еукаріотичних водоростях, довели, що ці організми мають перспективи як альтернативні джерела вітаміну Е, а мікроводорість *Euglena gracilis* вже визнана його найкращим мікробіологічним продуцентом (Vandamme, 1992). Розробка ефективної системи для продукування α -токоферолу мікроорганізмами, наприклад мікроводоростю *E. gracilis*, може забезпечити стабільніше і дешевше отримання зазначеного натурального вітаміну, ніж сучасна екстракція його з олій (Ogbonna, 2009).

8.1. Хімічна структура вітаміну Е та його синтез

Назва «вітамін Е» об'єднує родину з восьми хімічно подібних сполук, які є похідними 6-хроманолу — токохроманолі. Їх базова структура містить полярне хроманольне кільце (2-метил-6-гідроксихроманол) і гідрофобний насичений або ненасичений ізопреноїдний бічний ланцюг C16 (табл. 8.1) (Abbasi, 2007). Вісім природних сполук вітаміну Е поділяють на дві групи: токоферолі і токотриєнолі. Чотири ізоформи токоферолів (α -, β -, γ -, δ -токоферол) мають насичені бічні ланцюги, а чотири ізоформи токотриєнолів (α -, β -, γ -, δ -токотриєнол) — ненасичені. Ізоформи в межах кожної групи розрізняються за патернами метилювання хроманового кільця молекули (рис. 8.1) (Preedy, Watson, 2007). Основні скелети токоферолів і токотриєнолів безметильних груп на ароматичних кільцях не трапляються у природі, їх називають «токол» і «токотриєнол» відповідно (Friedrich, 1988).

Токохроманолі — це жиророзчинні антиоксиданти, що синтезуються виключно фотосинтезувальними організмами: рослина-

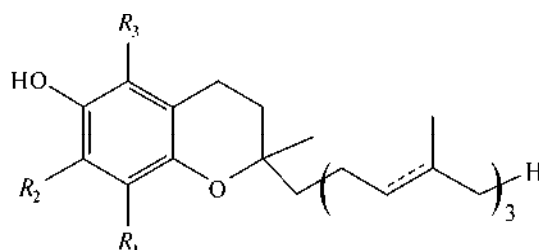


Рис. 8.1. Хімічна формула токохроманолів

Таблиця 8.1. Типи токохроманолів і відповідні їм види радикалів (R) у складі молекул

Тип токохроманолу	R_1	R_2	R_3
α -Токоферол	CH ₃	CH ₃	CH ₃
α -Токотриєнол	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -Токоферол	CH ₃	H	CH ₃
β -Токотриєнол	CH ₃	H	CH ₃
γ -Токоферол	CH ₃	CH ₃	H
γ -Токотриєнол	CH ₃	CH ₃	H
δ -Токоферол	CH ₃	H	H
δ -Токотриєнол	CH ₃	H	H

ми, водоростями і деякими ціанобактеріями (Preedy, Watson, 2007). У рослинах біосинтез цих сполук відбувається у пластидах, а ферменти асоційовані з пластидною мембраною. Небагато відомо про локалізацію цього процесу в фотосинтезувальних мікроорганізмах (Kayal et al., 2006).

До синтезу токохроманолів залучається цитозольний шикіматний метаболічний шлях, де формується ароматичне кільце молекули і пластидний діоксисилулознофосфатний шлях (метилеритритолфосфатний шлях) для синтезу ізопреноїдного хвоста (DellaPenna, Barry, 2006). Токохроманолі є амфіпатичними молекулами з гідрофільною групою голови, похідною гомогентизинової кислоти, і гідрофобним фітильним хвостом, який походить від фітилдифосфату (ФДФ) при синтезі токоферолів і від геранілгеранілдіфосфату (ГГДФ) у токотриєнолів. Гомогентизинова кислота утворюється з 4-гідроксифенілпірувату, катаболіту ароматичної амінокислоти тирозину за участю ферменту 4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази. ГГДФ виникає внаслідок об'єднання чотирьох молекул ізопентенілдіфосфату, які походять з 1-деокси-*D*-силулозо-5-фосфату. В результаті багатоступеневої реакції, каталізованої геранілгеранілредуктазою, з ГГДФ утворюється ФДФ, що також може формуватись із фітолу, продукту катаболізму хлорофілу, з наступним його двостадійним фосфорилуванням за дії кіназ, асоційованих із мембраною хлоропластів (Lushchak, Semchuk, 2012).

Першим спільним кроком синтезу токоферолів і токохроманолів є пренілювання гомогентизинової кислоти ФДФ або ГГДФ з утворенням 2-метил-6-фітил-бензохінону (МФБХ) або 2-метил-6-геранілгеранілбензохінону (МГГБ) відповідно. Ці реакції каталізуються гомогентизиновими пренілтрансферазами: фітилтрансферазою і геранілгеранілтрансферазою (Li et al., 2008). Наступні два кроки синтезу δ - і β -ізоформ токохроманолів каталізуються δ -токоферолциклазою і δ -токоферолметилтрансферазою. Синтез γ - і α -токохроманолів супроводжується реакціями метилювання метилтрансферазами сполук МФБХ і МГГБ з утворенням відповідних 2,3-диметил-5-фітил-1,4-бензохінону і 2,3-диметил-5-геранілгераніл-1,4-бензохінону. Далі утворені в цій реакції сполуки піддаються дії ферментів γ -токоферолциклази та γ -токоферолметилтрансферази, в результаті чого формуються спочатку γ -, а потім α -ізоформи токоферолів і токотриєнолів (DellaPenna, Barry, 2006; Lushchak, Semchuk, 2012).

Регуляція синтезу токоферолів у фотосинтезувальних організмах хоча б частково здійснюється на рівні ключових ферментів, таких як 4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази, гомогентизинової фітилтрансферази, токоферолциклази і двох метилтрансфераз. Експериментально встановлено, що синтез токоферолів у клітинах рослин активується різними видами абіотичних стресів, у тому числі світлом високої інтенсивності, дефіцитом води, високими концентраціями іонів важких металів, сольовим стресом, озоном і УФ-опроміненням, варіаціями температури. Стресові умови є причиною змін стаціонарного рівня АФК у клітинах. Нетривале чи хронічне підвищення рівня АФК, оксидативний стрес є причиною порушень ключових метаболічних процесів і внутрішньоклітинної передачі сигналів, спричинених окисненням клітинних компонентів, і може призвести до смерті клітини. Резистентність рослин до стресів, особливо оксидативного, тісно пов'язана з рівнем антиоксидантів. Наприклад, рослини *Arabidopsis*, які тривалий час росли на природі, мали у 8–12 раз вищу загальну концентрацію токоферолів ніж ті, що росли в лабораторних умовах. Токофероли є антиоксидантами, вони стабільно залучаються у відповідь на дію різноманітних стресів, захищають рослину від АФК. Їх рівень співвідноситься з інтенсивністю стресу, фізіологічним станом рослини та її видоспецифічною чутливістю до стресу. Проте експерименти, проведені з метою вивчення впливу різноманітних стресових чинників як на концентрацію токоферолів, так і на регуляцію експресії генів, що кодуєть ферменти їх синтезу, однозначних результатів не отримали. У межах виду або між видами можна спостерігати різні реакції у відповідь на той чи інший стресовий чинник, які проявляються у зниженні концентрації токоферолів, її підвищенні або варіації кількості лише окремих ізоформ. Біосинтез токоферолів під час стресу також може регулюватись рівнем фітогормонів і антиоксидантів, залучених до відновлення токоферолів (Li et al., 2008; Lushchak, Semchuk, 2012).

8.2. Функції токохроманолів у клітинах рослин

Підтримання балансу між поглинутою і використаною енергією світла має життєво важливе значення для оксигенних фотосинтезувальних організмів. Змінювані умови навколишнього середовища можуть спричинювати стреси, які порушують цей баланс, призводять до формування шкідливих АФК і, як наслі-

док, — до можливої загибелі клітин. Інтенсивне світло може стимулювати утворення таких АФК: синглетний кисень ($^1\text{O}_2^*$), супероксид (O_2^-), гідроген пероксид (H_2O_2), гідроксильні радикали. АФК безпосередньо ушкоджують найближчі ліпіди, білки, пігменти і нуклеїнові кислоти, якщо вчасно не будуть знешкоджені. Для попередження згубної дії АФК оксигенні фотосинтезувальні організми мають захисні механізми, серед яких своє місце посідають токохроманоли. Разом із каротиноїдами, розміщення яких у тилакоїдних мембранах обмежується білок-пігментними комплексами, токоферолі є найпоширенішими жиророзчинними антиоксидантами, локалізованими в місці фотосинтетичного поглинання світла і транспорту електронів. Таким чином, токоферолі захищають пігменти і білки фотосинтетичного апарату, ліпіди тилакоїдних мембран від оксидативних ушкоджень (Zhirong et al., 2012).

Захист фотосинтетичного апарату фотосинтезувальних організмів від індукованих світлом оксидативних ушкоджень є однією з основних функцій синтезованого ними вітаміну Е. Досліджено кілька шляхів захисної дії токоферолів від розвитку фотоінгібування — індукованого світлом ФС II.

Реакційний центр ФС II складається з двох гомологічних поліпептидів D1 і D2, які мають сайти зв'язування для важливих молекулярних компонентів фотосинтетичного апарату. Відомо, що білок D1 у процесі виділення кисеню постійно і швидко оновлюється, особливо на інтенсивному світлі. У процесі фотосинтезу ФС II постійно генерує синглетний кисень ($^1\text{O}_2$), що утворюється в результаті реакції між хлорофілом у триплетному стані ($^3\text{P680}^*$) і киснем у його основному стані ($^3\text{O}_2$). АФК, що генеруються у хлоропластах фотосинтезувальних організмів, на яких впливає інтенсивне світло, спричиняють фотоінгібування. Цей процес $^1\text{O}_2$ та інші АФК в результаті пригнічення репарації ФС II опосередковано інгібуванням синтезу білка на стадії елонгації трансляції. α -Токоферол знешкоджує $^1\text{O}_2$ фізично, абсорбуючи енергію збудження, або хімічно з формуванням токоферолхінону і токоферол-хінонових епоксидів, чим сприяє відновленню ФС II, стимулюючи синтез білка D1 *de novo*. Захист ФС II від дії синглетного кисню, що здійснюється через токоферолі, є однією з причин, чому рослини їх потребують і стабільно продукують (Inoue et al., 2011; Trebst et al., 2012). Відсутність такого захисту призводить до деградації білка D1, розборки комплексу

ФС II і вивільнення хлорофілів, результатом чого є фотозалежне вибілення хлоропластів. Вторинні АФК, що супроводжують пігментне вибілення, також можуть знешкоджуватись α -токоферолами в результаті їх окиснення (Preedy, Watson, 2007).

За стресових умов циклічний електронний транспорт навколо ФС II є першим кроком захисту від фотоінгібування. Припускають, що валентність і спіновий стан гемового та негемового заліза є критичним у регуляції лінійного і циклічного електронних потоків. Виявлено близькість гемового і негемового заліза як сайтів зв'язування α -токоферол-хінону, окисненого токоферолу, в нативному центрі ФС II. Найімовірніше, що розрив водневих зв'язків гемового і негемового заліза пренілхінонами є механізмом ініціації подальших електричних і конфірмаційних змін цих двох залізов'язувальних сайтів. Більше того, зв'язування α -токоферол-хінону із залізо-хіноновим комплексом і цитохромом b_{559} сильно модифікує оточення атомів заліза, цим підвищує ригідність їх білкових матриксів. α -Токоферол-хінон впливає на циклічний потік електронів і розсіяння енергії у ФС II. Це означає, що пренілхінони здатні ініціювати фотозахисні механізми ФС II (Preedy, Watson, 2007).

Циклічний електронний транспорт навколо ФС II інгібується α -токоферолом і активується α -токоферол-хіноном (Munne-Bosch, 2007). Накопичення токоферол-хінону, яке відбувається за такої інтенсивності стресу, що перевищує ліміт толерантності рослини до нього, є сигналом про виснаження токоферольного захисту та ініціює запрограмовану загибель клітин (Li et al., 2008). Отже, акумуляція α -токоферолів у тилакоїдах забезпечує захист від фотоінгібування такими шляхами: знешкодження $^1\text{O}_2$ та інших АФК і активація циклічного електронного транспорту навколо ФС II внаслідок формування α -токоферол-хінонів (Munne-Bosch, 2007).

Зміни рівня вітаміну E, який локалізується в мембранах, можуть впливати на текучість і стабільність мембран. Існують свідчення того, що токоферолі розподіляються в мембрані не випадково, а формують комплекси зі специфічними мембранними компонентами. Вітамін E діє як стабілізатор в результаті утворення зв'язків між хроманольною гідроксильною групою α -токоферолу і карбоксильною групою фосфоліпідної молекули, внаслідок чого ригідність мембрани підвищується (Abbasi, 2007). Таким чином, забезпечується ще один спосіб захисту ФС II від фотоінгі-

бування зниженням проникності тилакоїдних мембран до протонів, що окиснює люмену за високого освітлення і активації віолоксантиндеепоксидази (Munne-Bosch, 2007).

Вітамін Е також захищає ліпиди тилакоїдних мембран, збагачені ПНЖК, від пероксидного окиснення, індукованого АФК. Тут токоферол діє як ланцюг-термінувальний антиоксидант, і є донором фенольного гідрогену для ліпідпероксидного радикала, який пропагує ланцюг. Він може запобігти розвитку пероксидного окиснення ліпідів, віддаючи гідроген ліпідним пероксидним радикалам, або прямо прореагувавши з ініціюючим радикалом (Blokhuin, 2000; Abbasi, 2007). В результаті утворюються гідропероксид жирної кислоти і токофероксидний радикал, який реагує з іншими ліпідними радикалами, похідними окиснення ПНЖК, що призводить до утворення нерадикальних продуктів. Токофероксидні радикали можуть відновлюватись антиоксидантною системою, що складається з аскорбату і глутатіону, можливе відновлення через коензим Q або ковалентну взаємодію з вільними радикалами і формування токоферольних похідних, які не так швидко рециклуються (Sattler et al., 2004; Abbasi, 2007).

У насінні рослин завжди акумулюється більша кількість токоферолів, ніж у фотосинтезуючих тканинах. Запасні ліпиди насіння, збагачені ПНЖК, знаходяться під загрозою окиснення АФК, які генеруються під час проростання у процесі β -окиснення і глюконеогенезу, а у проростків з'являється додаткове їх джерело — фотосинтез. Токофероли як ліпофільні молекули, розміщені в олійних тілах, забезпечують основний антиоксидантний захист насіння і проростків на ранніх стадіях росту від оксидативного стресу, цим сприяють їх виживанню (Sattler et al., 2004).

Молекули токоферолів можуть реагувати з сірковмісними радикалами білків, перетворюючи їх на гідросульфідні, та стимулюють синтез і підвищують внутрішньоклітинну концентрацію антиоксидантів, наприклад глутатіону. АФК можуть бути сигналами, що активують різні фізіологічні процеси, з урахуванням тих, що призводять до апоптозу. З цього погляду, токофероли відіграють важливу регуляторну роль, відновлюють сірковмісні радикали білків, оскільки рецепторні білки в мембрані здатні до окиснення тіолових груп (Li et al., 2008).

З антиоксидантними властивостями токоферолів пов'язана і можливість їх участі у внутрішньоклітинній сигнальній трансдукції та регуляції експресії генів. Залежно від кількості АФК і роз-

витку пероксидного окиснення ліпідів у рослинних клітинах може індукуватись синтез антиоксидантів. Це відбувається опосередковано, наприклад, через вторинний продукт окиснення, ендогенний фітогормон — жасмонову кислоту, залучену до внутрішньоклітинної передачі сигналів. Токофероли знешкоджують АФК і запобігають пероксидному окисненню ліпідів, тому вони можуть опосередковано контролювати рівень жасмонової кислоти у листі, тим самим впливати на експресію генів, регульованих цією сполукою (Sattler et al., 2003; Abbasi, 2007; Li et al., 2008).

Вітамін Е також може відігравати сигнальну роль, оскільки бере участь у передачі сигналів від хлоропластів до ядра, що, можливо, пов'язано з метаболізмом вуглеводнів. Токофероли захищають рослинний організм не лише від оксидативного стресу, а й від інших абіотичних стресів, наприклад низької температури. Експериментально встановлено, що мутантні рослини, дефектні за синтезом токоферолів, мають такі спільні ознаки при вирощуванні в умовах зниженої температури навколишнього середовища: акумуляція антоціанів і фотоасимілянтів, розчинних цукрів й крохмалю і, як наслідок, пригнічення загального росту рослин (Munne-Bosch, 2007; Li et al., 2008). Акумуляція розчинних цукрів у листках може бути сигналом, що регулює кодовані ядром гени. Широка різноманітність генів регулюється цукрами на транскрипційному рівні, у тому числі гени, залучені до фотосинтезу, метаболізму вуглецю і азоту, відповіді на стреси, вторинного метаболізму. Градієнт цукрів між різними тканинами рослини може бути сигналом для її розвитку. Отже, токофероли розглядають як регулятори клітинних сигналів через прямий або опосередкований вплив на рівень цукрів. Ця роль токоферолів може не залежати від оксидативного стресу (Li et al., 2008).

8.3. Вміст і локалізація токохроманолів у рослинах

Загальний вміст вітаміну Е в рослин відрізняється між різними видами і тканинами у межах виду (Abbasi, 2007). Кількість токохроманолів варіює від дуже низьких концентрацій (менш ніж 1 нг/мг сирої маси) у картоплі до дуже високих (500—1200 нг/мг сирої маси) у пальмовій олії. Основними джерелами вітаміну Е для споживання є овочі, фрукти, насіння і олії з нього. Токофероли також наявні у коренях, клубнях, сім'ядолях, гіпокотиллях, стеблї, листках і квітках вищих рослин. Ізоформа α є переважаючою формою токоферолів у всіх тканинах рослин, особливо зе-

Таблиця 8.2. Вміст токоферолів у зеленому листі деяких вищих рослин (Friedrich, 1988)

Рослина	Токоферолі, мкг/г маси сирої речовини			
	α	β	γ	δ
<i>Spinacea oleracea</i> (шпинат)	24,3	Н.з.	4,2	Сл.
<i>Coleus blumei</i> (колеус)	32,3	Н.з.	14,8	Н.з.
<i>Zea mays</i> (кукурудза)	2,4	Н.з.	2,1	0,13
<i>Ligustrum vulgare</i> (вовча ягода)	41,4	Н.з.	10,3	Н.з.
<i>Hevea brasiliensis</i> (гевея)	71,2	1,0	18,4	2,3
<i>Hordeum vulgare</i> (ячмінь)	15,7	Н.з.	8,3	Н.з.

Примітка. Н.з. — не знайдено; Сл. — слідова кількість.

лених, за винятком насіння (табл. 8.2). Наприклад, у листках *Arabidopsis* частка α-токоферолу становить 90 %, а в насінні цієї рослини переважає γ-токоферол, де на нього припадає 95 % (Abbasi, 2007). В основному концентрація токохроманолів у листках рослин є меншою, ніж 50 мкг/г маси сирої речовини, з переважним вмістом α-токоферолу, тоді як у насінні зернових культур γ-токохроманолі становлять 500—2000 мкг/г добутої олії (Friedrich, 1988). Кількість α-токоферолу істотно варіює залежно від віку і швидкості росту рослин: молоді і ті, які швидко розвиваються, мають дуже мало α-токоферолу, тоді як вічнозелені та рослини, що повільно ростуть, містять його більше. Ізоформи токоферолів β, γ і δ ніколи не знаходили в зелених листках у високих концентраціях, але γ-токоферол наявний завжди. δ-Токоферол також виявили у деяких рослин, а β-ізоформа трапляється рідко (Friedrich, 1988). Токотриєноли не завжди знаходять у зелених тканинах вищих рослин, а переважно у насінні більшості однодольних і деяких дводольних рослин (Abbasi, 2007).

У рослинних клітинах токоферолі і токотриєноли локалізуються в амілопластах насіння і бульб, хлоропластах фотосинтезувальних тканин, лейкопластах пелюсток і хромопластах фруктів, іноді їх знаходять у вакуолях. Однак не весь α-токоферол міститься у хлоропластній фракції, мітохондрії також можуть бути місцем його локалізації. Про внутрішньоклітинну локалізацію не-α-токоферолів відомо ще менше, але деякі дослідники встановили, що більшість γ- і δ-токоферолів має зовнішньохлоропластне походження (Abbasi, 2007).

У пластидах α-токоферол знаходять переважно у внутрішній мембранній оболонці, де синтезується вітамін Е, пластоглобулі та

мембранах тилакоїдів (Abbasi, 2007). У насінні γ -токоферол асоціюється із триацилгліцеридами в олійних тілах і, можливо, у гліоксисомах, де вони окиснюються у процесі проростання. У низці незалежних експериментів із використанням різних методів встановлено розміщення молекул вітаміну Е у мембранах: гідрофобний ізопреноїдний хвіст токохроманолів вбудовується в ліпідний бішар мембран, а більш гідрофільна хроманольна голова тримається на її поверхні (Preedy, Watson, 2007).

8.4. Рослини як продуценти вітаміну Е

Токохроманолі, активність яких позначається як активність вітаміну Е, є важливими ліпофільними антиоксидантами для тварин і людини, ними вони не синтезуються, а тільки окисненними фотосинтетиками — рослинами і водоростями. Ведуться інтенсивні дослідження з пошуку способів поліпшення накопичення біологічно активного вітаміну Е фотосинтезувальними мікроорганізмами і рослинами (Henry, Qungang, 2005).

Значні кількості токоферолів завжди знаходять у насінні, проростках та інших олійних фракціях. Олії деяких рослин використовують для комерційного продукування токоферолів. Їх продають як багаті на токоферол олії овочів або як концентрати токоферолів різного рівня очищення (Ogbonna, 2009). Найбагатші активним вітаміном Е олії зародків пшениці (192 мг/100 г) і соняшнику (59 мг/100 г) (табл. 8.3).

Люцерна (5 мг/100 г), кукурудза (15 мг/100 г) і соя (110 мг/100 г) є основними джерелами вітаміну Е для тварин. Чим більше вітаміну Е міститься у кормі свійських тварин, тим більше його отримує людина у разі споживання м'яса та інших продук-

Таблиця 8.3. Вміст токохроманолів (мг/100 г) в оліях культурних рослин (Schwartz et al., 2008)

Олія рослини	α -Т	β -Т	γ -Т	δ -Т	α -Т3	β -Т3	γ -Т3	δ -Т3
Соняшник	59	2,4	1,4	0,27	—	—	—	—
Рапс	26	—	36	1	—	—	—	—
Соя	11	3	74	36	—	—	—	—
Зародки пшениці	192	65	18	—	2,5	8,2	—	0,24
Кукурудза	18	1,1	44	2,2	0,94	—	1,3	0,26

Примітка. Т — токоферол; Т3 — токотриєнол, мг/100 г.

тів тваринного походження (Rocheford et al., 2002). Насіння основних олійних культур, насіння коричневого рису, який є основною їжею для половини населення світу, містить значну кількість токохроманолів з відносно великою часткою α -токоферолу.

Проблема отримання токоферолів із вищих рослин полягає в досить низькому загальному рівні цих сполук з невеликою часткою найактивнішої ізоформи — α -токоферолу.

Соева олія — одна з найспоживаніших людиною олій у світі, містить ~100 мг токоферолів у 100 г. Проте активність вітаміну Е в ній низька внаслідок невеликого вмісту α -токоферолу — 10—20 %, тоді як γ -токоферол становить 60—65 % загальної кількості токоферолів, а δ -токоферол — 20—26 %, β -токоферолу всього 2—5 % (Van Eenennaam et al., 2003).

Одним із біотехнологічних способів отримання рослин із великим вмістом активного вітаміну Е, тобто із збільшеною кількістю α -токоферолу, є селекція. З використанням специфічних молекулярних маркерів, які зв'язуються з генами, що контролюють рівні α - і γ -токоферолів у рослин, можлива селекція бажаних алелей генів для модифікації співвідношення α -/ γ -ізоформ. Таким способом досягається незначне збільшення вмісту α -токоферолу при домінуючій у насінні γ -ізоформі. Активність γ -токоферолу як вітаміну Е втричі менша, ніж α -токоферолу (Wang, 2015). Для істотного накопичення α -токоферолів необхідне застосування трансгенних методик (Rocheford et al., 2002).

Генна інженерія здатна підвищити рівень активного вітаміну Е в культурних рослинах, особливо олійних. У спробах досягнення цієї мети намагались змінювати експресію структурних генів, які кодуєть основні ферменти синтезу токохроманолів (Rippert et al., 2004). Вже існують дані щодо успішного застосування стратегії в цьому напрямі, які уможливили поліпшити якість трансгенних рослин як продуцентів вітаміну Е порівняно з диким типом (Li et al., 2008).

У процесі генетичних досліджень, проведених на модельних організмах (*Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis* PCC 6803), визначено гени і білки, які беруть участь у синтезі токохроманолів. Характеризовано такі ключові ензими: 4-гідроксифенілпіруватдіоксигеназа (ГФПД), токоферолциклаза (*vte1*/ТЦ), гомогентизинова фітилтрансфераза (*vte2*/ГФТ), 2-метил-6-фітилпластохінол-метилтрансфераза (*vte3*), γ -токоферол-метилтрансфераза (*vte4*/ γ -ТМТ) і фітолкіназа (*vte5*) (рис. 8.2). Зі зниженням рівня експресії поодиноких або груп генів біосинтезу токоферолів вдалося визна-

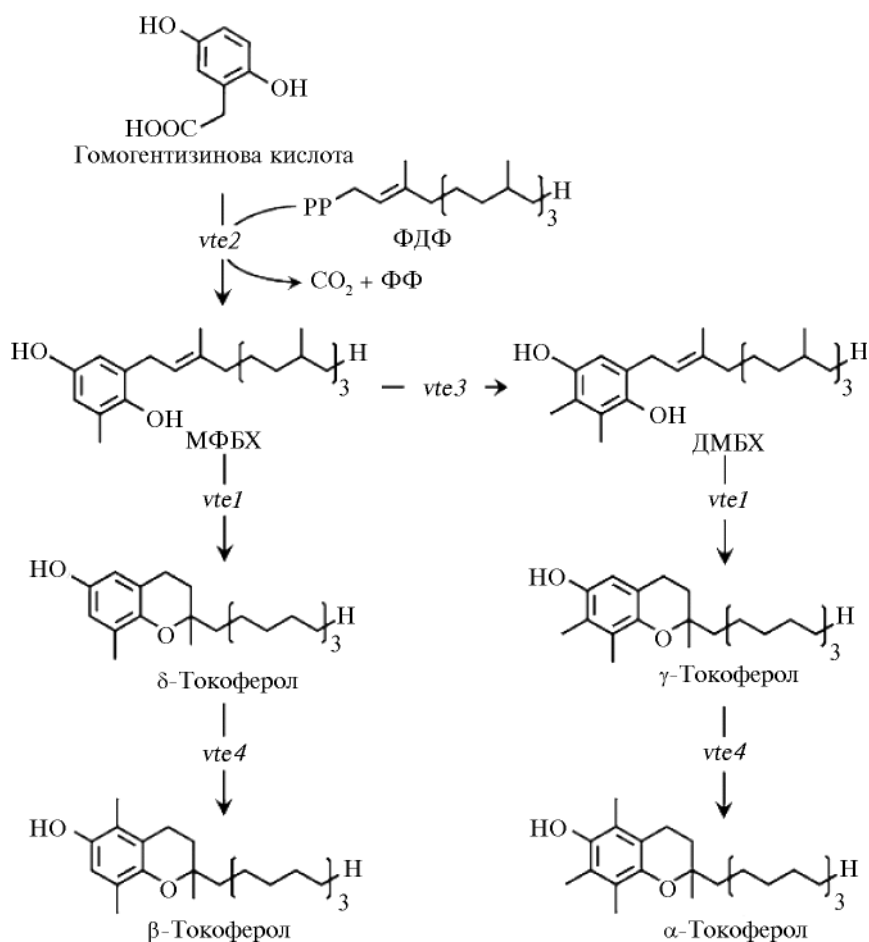


Рис. 8.2. Схема синтезу токоферолів (Zhirong et al., 2012):

ФДФ — фітиліфосфат; ФФ — пірофосфат-аніон; МФБХ — 2-метил-6-фітил-1,4-бензохінон; ДМБХ — 2,3-диметил-5-фітил-1,4-бензохінон; *vte1* — токоферолциклаза; *vte2* — гомогентизинова фітилтрансфераза; *vte3* — МФБХ метилтрансфераза; *vte4* — γ-токоферолметилтрансфераза

чити процеси метаболізму, які впливають на акумуляцію токоферолів та поліпшити вміст і склад цих сполук у дослідних рослинах (Yuan et al., 2019).

Акумуляцію найактивнішої ізоформи вітаміну Е у клітинах трансгенних рослин забезпечують переважно перетворенням накопичених токохроманолів на α-токоферол або підвищенням кон-

центрації всіх ізоформ токохроманолів. Обидва способи успішно застосовано на *Arabidopsis*, ріпаку і сої. Насіння цих рослин містить переважно γ - і δ -токоферолі внаслідок зниженої активності γ -токоферолметилтрансферази (*vte4*), що метилує γ - і δ -токоферолі до відповідно α - і β -токоферолів (див. рис. 8.2).

Повногеномний пошук асоціацій — напрям біологічних досліджень, який виник як стратегія для визначення генів і локусів кількісних ознак, покладених в основу складних ознак у рослин. Вчені на чолі з X.Q. Wang (2015) провели дослідження з виявлення генетичних послідовностей, експресія яких впливає на кількість α -токоферолу у клітинах рису (*Oryza* spp.). У процесі повногеномного пошуку асоціацій використали 1,44 млн високоякісних одонуклеотидних поліморфізмів, що охоплюють усі хромосоми рослини, і виявили 13 генів, серед яких γ -токоферолметилтрансфераза (*OsyTMT*) була визначена як основний фактор, відповідальний за вміст α -токоферолу серед усіх проаналізованих зразків рису. Варіація нуклеотидної послідовності, що кодує *OsyTMT*, як і нуклеотидний поліморфізм у промоторній ділянці *OsyTMT*, чітко впливали на зміну вмісту α -токоферолу. Подібний результат отримали на рослинах сої та кукурудзи після аналізу впливу варіацій у нуклеотидній послідовності, що кодує γ -ТМТ цих рослин, на вміст α -токоферолу і загальну кількість вітаміну Е (Wang et al., 2015). На основі цих досліджень можна зробити висновок, що нуклеотидний поліморфізм на ділянці, яка кодує γ -ТМТ, відіграє ключову роль у здатності того чи іншого виду рослини до накопичення α -токоферолу.

Трансформація рослин *Arabidopsis*, спрямована на підвищення експресії γ -токоферолметилтрансферази у насінні, перетворила >95 % γ -токоферолів на α -ізоформу, а невеликого пулу δ -токоферолів — на β -токоферол без збільшення загального вмісту токохроманолів. Отже, активність вітаміну Е, накопичуваного в насінні *Arabidopsis*, зросла у 9 раз (Shintani, DellaPenna, 1998). Надекспресія гена, що кодує 2-метил-6-фітилбензохінолметилтрансферазу (*vte3*) у рослин *Arabidopsis*, зменшила вміст δ - і β -ізоформ токоферолів з пропорційним підвищенням γ - і α -ізоформ (Van Eenennaam et al., 2003). Комерційно важливі олійні культури, такі як ріпак, соя і кукурудза, які мають знижені співвідношення ізоформ α -/ γ та загальну кількість активного вітаміну Е, можна модифікувати подібним способом (Shintani, DellaPenna, 1998). Генна трансформація сої з вбудовуванням генів *vte4* та *vte3*

з *A. thaliana* змінює співвідношення ізоформ токоферолів із підвищенням частки α -токоферолу до 96—98 %, β -токоферолу — до 2—4 % та зменшенням γ - і δ -ізоформ до <0,2 % (Van Eenennaam et al., 2003). Одночасна надекспресія генів *vte4* та *vte3* сприяє перетворенню практично всіх ізоформ токоферолів на α -токоферол, тим самим суттєво поліпшує якість рослини як продуцента вітаміну Е, але одночасно загальна кількість токоферолів залишається незмінною (Shintani, DellaPenna, 1998).

Збільшення концентрації всіх ізоформ токоферолів у 5 раз в листках і в 2 рази у насінні *Arabidopsis* досяглась методом вбудовування гена з *Synechocystis* sp., що кодує гомогентизинову фітилтрансферазу (*vte2*). Надекспресія гена *vte2* в насінні *Arabidopsis* і сої підвищує загальний рівень токохроманолів у 1,8 та 1,4 раза відповідно. Одночасна експресія генів *hppd* (*p*-гідроксифенілпіруватдіоксигеназа) та *tyrA* (префенатдегідрогеназа), продукти яких збільшують кількість доступного попередника гомогентизинової кислоти, підвищують рівень токоферолів у 1,8 раза у *Arabidopsis* і 2,6 раза у сої (Henry, Qungang, 2005). Найбільший вміст вітаміну Е у насінні *Arabidopsis* порівняно з диким типом спостерігали у трансгенних рослин із вбудованими усіма трьома генами: *vte2*, *hppd*, *tyrA*. Накопичення токохроманолів у листях і насінні рослин досягається також експресією гомогентизинової геранілгеранілтрансферази (Rippert et al., 2004; Henry, Qungang, 2005; DellaPenna, Barry, 2006). Трансгенні рослини створювали різними способами, це мало різний результат щодо збільшення накопичення основного продукту (табл. 8.4). Попри всі плюси генетичної трансформації трансгенні рослини викликають підозру у споживачів, у зв'язку з чим перевагу віддають нетрансформованим рослинам.

На продукування токоферолів трансгенними рослинами впливають сезонність і умови навколишнього середовища, тому застосування культур рослинних клітин відкриває нові можливості у технології отримання α -токоферолу. Рослинні клітинні й тканинні культури є потенційним джерелом цінних метаболітів, які можна використовувати як харчові добавки, нутрицевтики і фармацевтичні препарати на постійній основі цілий рік з відведенням під їх вирощування невеликих приміщень. Вони також можуть бути корисними інструментами для вивчення метаболічних шляхів клітин. Клітинні культури можуть забезпечувати про-

Таблиця 8.4. Розвиток трансгенної модифікації рослин з метою збільшення біосинтезу α -токоферолу (Yuan et al., 2019)

Рослина-донор гена → вид трансгенної рослини	Ензим/ген → продукт	Літературне джерело
Рис → Рис	Токоферолциклаза (<i>vte1</i>) → токоферол	Ouyang et al., 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i> → Салат	Гомогентизинова фітилтрансфераза (<i>vte2</i>) і γ -токоферол-метилтрансфераза (<i>vte4</i>) → токоферол	Ouyang et al., 2011
<i>A. thaliana</i> → → Рис	ρ -Гідроксифенілпіруватдіоксигеназа → α -токоферол	Farré et al., 2012
<i>A. thaliana</i> → → Табак	P47/P80 і гомогентизинова фітилтрансфераза (<i>vte2</i>) → α -токоферол	Espinoza et al., 2013
<i>A. thaliana</i> → → Пшениця	Гідроксифенілпіруватдіоксигеназа і γ -токоферолметилтрансфераза → токохроманолі	Chaudhary, Khurana, 2013
<i>A. thaliana</i> → → Табак	γ -Токоферолметилтрансфераза → α -токоферол	Jin, Daniell, 2014
Соя → Соя	Те саме	Vinutha et al., 2015
Рис → Рис	« »	Wang et al., 2015
Люцерна → → Люцерна	« »	Jiang et al., 2016

дукування фітохімікатів з однорідною якістю і високою специфічністю, що не досягається хімічним синтезом.

Калус клітин соняшнику *Helianthus annuus* L. вивчали для відтворення *in vitro* системи продукування α -токоферолу. Клітини калусу отримали із суспензії клітин саджанців, у яких вміст α -токоферолу вже становив 91 %, що важливо, такий же відсоток сполуки зберігався і у клітинах калусів. У процесі дослідження клітинам створювали гетеротрофні умови росту, вносили у поживне середовище попередники синтезу токохроманолів і еліситори. Обробка калусів цими речовинами сприяла збільшенню вмісту α -токоферолу у клітинах. Внесення гомогентизинової кислоти, яка є попередником полярної «голови» молекул токоферолу, мало виражений позитивний ефект на відміну від внесення фітолу, попередника гідрофобного «хвоста» молекули. Жасмонова кислота, яка стимулює експресію генів різних біосинтетичних шляхів в умовах стресу, концентрацією 5 мкМ стимулює синтез

α -токоферолу у клітинах калусу *H. annuus*. Аналіз експресії генів білків, залучених до біосинтезу токоферолів, на клітинах культур *Arabidopsis* показав, що жасмонова кислота збільшує інтенсивність експресії генів, які кодують *p*-гідроксифенілпіруватдіоксигеназу і гомогентизинову фітилтрансферазу (Furuya et al., 1987).

Калуси з клітин бутонів квітів *Carthamus tinctorius* також акумулюють переважно α -токоферол, їх використовували для вивчення динаміки накопичення цієї сполуки у відповідь на впливи зовнішніх чинників. Дослідження на калусах *Helianthus annuus* і *C. tinctorius* довели, що наявні у складі поживного середовища амінокислоти казеїну і міоїнозитол стимулюють продукування токоферолів клітинами калусів (Furuya et al., 1987).

Виявлення взаємозв'язку між інтенсивністю накопичення α -токоферолу в культурі клітин *Helianthus annuus* і фотоміксотрофними умовами її культивування проводили на особливій клітинній лінії, здатній рости на середовищі з дефіцитом сахарози. Серед її особливих ознак порівняно з вихідними культурами клітин були збільшена кількість хлоропластів, високі концентрації хлорофілів і RUBISCO, а також підвищений рівень ензиму геранілгеранілпірофосфатсинтетази, істотно більший вміст α -токоферолу в клітинах (Furuya et al., 1987).

Для культури рослинних клітин завжди характерний певний рівень варіабельності, в межах якого важливо ідентифікувати високопродуктивні клітинні лінії. Селекція клітинних ліній є важливим кроком у розробленні культури клітин як «клітинної фабрики» для продукування цінної сполуки. У *Helianthus annuus* виділили дві лінії клітин, одна з яких характеризувалась високими концентраціями не лише α -токоферолу, а й інших антиоксидантних вітамінів: аскорбінової кислоти і трипептиду глутатіону. Інша лінія клітин накопичувала менше α -токоферолу, але компенсувала нестачу антиоксидантних молекул антиоксидантними ензимами, такими як аскорбатпероксидаза і каталаза. Виділені лінії клітин є хорошим інструментом для вивчення регуляції біосинтезу антиоксидантних молекул і гомеостатичних реакцій, що відбуваються внаслідок зміни їх вмісту в клітинах.

8.5. Мікробіологічне продукування токоферолів

Фотосинтезувальні мікроорганізми відомі як перспективні джерела токоферолів. Деякі мікроводорості (*Euglena gracilis*) накопичують α -токоферол у більшій концентрації, ніж рослинні

продукти, які традиційно вважаються багатим джерелом вітаміну Е. Мікродорості та ціанобактерії мають більшу продуктивність порівняно з наземними рослинами, містять невелику кількість лігніну і геміцелюлози, здатні у широкому діапазоні регулювати вміст специфічних метаболітів у відповідь на змінювані умови навколишнього середовища і не вибагливі до якості водного середовища, внаслідок чого можна використовувати для культивування стічні води або морську воду (Mudimu et al., 2017). Бажаними характеристиками для мікроорганізмів-продуцентів токоферолів є велика внутрішньоклітинна концентрація всіх ізоформ токоферолів, значний відсоток α -токоферолу, швидке накопичення біомаси культурою, висока кінцева концентрація клітин, прості умови культивування, дешеве середовище культивування і низька чутливість до зараження (контамінації) (Ogbonna, 2009).

Можливість отримання токоферолів із мікродоростей і ціанобактерій досліджується менш інтенсивно порівняно з рослинами, тому відносно мало відомостей про вміст вітаміну Е у цих групах фотосинтезувальних організмів. Виділяють низку видів мікродоростей, здатних до акумулювання токоферолів: *Spirulina platensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Synechocystis* spp., *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica*, *Euglena gracilis*, *Dunaliella salina*, *Isoschrysis galbana*, *Diacronema vlkianum* та ін. Різний внутрішньоклітинний вміст токоферолів і продуктивність зазначених штамів детально вивчали, проте порівнювати їх досить складно через різницю в умовах вирощування.

Внутрішньоклітинний вміст α -токоферолу залежить від умов культивування, тому основним способом підвищення вмісту цього вітаміну є модифікація складу культуральних середовищ, температурного і світлового режимів. Експериментально встановлено вплив віку культури, температури, фотоперіоду, вмісту азоту, інтенсивності освітлення, типу вуглецевого живлення і природи екзогенних органічних поживних добавок. Проведені дослідження дають підстави для висновку про стимуляцію синтезу токоферолів АФК, які утворюються у клітинах у разі пошкодження (Rodriguez-Zavala et al., 2010). Для одного і того самого штаму залежно від умов культивування можлива різниця концентрації токоферолів у клітинах може сягати 7 разів.

Результати досліджень О. Mudimu та співавт. (2017), проведені на 130 штаммах водоростей і ціанобактерій, показали, що найбільша концентрація α -токоферолу в клітинах припадає на

стаціонарну фазу росту культури і є найбільшою за вмісту джерел азоту в кількості лише 1/4 стандартної для живильного середовища. Разом з тим вчені встановили філогенетичну залежність за кількістю акумульованого вітаміну Е між мікроводоростями на рівні класів. Найменше α -токоферолу накопичували представники класів у межах Rhodophyta і Streptophyta (Mudimu et al., 2017). Нижче наведено вміст α -токоферолу в оптимальних умовах і умовах ліміту азоту в середовищі у клітинах мікроводоростей різних відділів, що накопичують найвищі значення антиоксиданту (за Mudimu et al., (2017).

Відділ/клас Вид	Концентрація α -токоферолу (мкг/г) у стандартних умовах/ умовах лімітування кількості азоту (стаціонарна фаза росту культур)
Chlorophyta/Chlorophyceae	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	580,43/1179,91
<i>Coccomyxa</i> sp.	663,86/1062,02
Heterokontophyta/Eustigmatophyceae	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	575,10/1445,66
<i>Microchloropsis salina</i>	671,80/1094,19
Rhodophyta/Porphyrordiophyceae	
<i>Porphyridium purpureum</i>	43,45/89,54
Сyanobacteria/Сyanophyceae	
<i>Synechocystis</i> sp.	173,67/—
<i>Arthrospira maxima</i>	177,23/—

Дослідження можливості використання морських планктонних водоростей для отримання біомаси, збагаченої вітаміном Е, довели, що серед 5 видів мікроводоростей — *Tetraselmis suecica* (Chlorophyta), *Isochrysis galbana*, *Pavlova luther* (Haptophyta), *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta), *Chaetoceros calcitran* (Bacillariophyta) — перший з них накопичує найбільшу кількість вітаміну Е, яка становить до 6,3 мг/г маси сухої речовини, що співвідноситься з кількістю вітаміну Е у зародках кукурудзи. Макроводорість *Sargassum muticum* (Ochrophyta), яка є інвазивною бурю водорістю з дуже швидким темпом росту, накопичувала лише 10 мкг/г маси сухої речовини вітаміну Е і тому не може бути ефективним джерелом цієї сполуки для людини (De Roesck-Holtzhaueg, 1991).

Морська мікроводорість *Nannochloropsis oculata* (Ochrophyta) є важливим джерелом живлення для водних тварин, наприклад

коловерток, яких використовують як корм для годівлі багатьох комерційно важливих водних тварин та їх личинок. Поживна цінність першої ланки цього трофічного ланцюга має важливе значення, тому проводять експерименти з пошуку способів її підвищення. Встановили залежність концентрації токоферолів для *N. oculata* від фотоперіоду, хімічного складу живильного середовища, стадії росту. Вміст α -токоферолу стабільно збільшується у клітинах цієї мікроводорості з віком культури, що пов'язують із потребою старіючої культури в антиоксидантному захисті. За даними Y. Durmaz (2007), який проаналізував вплив різних концентрацій і форм азоту на акумуляцію α -токоферолу в *N. oculata*, наявність у середовищі нітратів концентрацією 441 мкМ/л найбільше стимулює накопичення цього антиоксиданту (до 2,33 мг/г маси сухої речовини) по досягненні культурою пізньої стаціонарної фази росту. Цей показник рівня α -токоферолу був більшим на 26 % порівняно з культурою, яка мала вдвічі більший вміст нітрату в середовищі та на 59 % більшим, ніж у культурі з тією самою концентрацією нітрату, але у ранній стаціонарній фазі її росту (Durmaz, 2007).

Ліміт азоту в живильному середовищі, який є одним із ключових компонентів метаболічних процесів у клітинах, спричинює оксидативний стрес мікроводорості та, як наслідок, активує синтез антиоксидантних молекул. У разі переважання процесів внутрішньоклітинного ушкодження ресурси клітин обмежуються і ріст культури гальмується. Синтез антиоксидантів морської мікроводорості *Dunaliella salina* (Chlorophyta) проаналізували Abd El-Baky та співавт. (2004) при комбінуванні дії таких стресових чинників, як нестача азоту у живильному середовищі, надлишок солей і УФ-опромінення. Відповідно до отриманих результатів, дія УФ-опромінювання за оптимального складу живильного середовища, збільшення вмісту NaCl і зменшення кількості азоту в середовищі сприяють зростанню антиоксидантного захисту клітин *D. salina* шляхом підвищення синтезу каротиноїдів, антиоксидантних ензимів і вітамінів. У дослідженні вміст α -токоферолу досягав максимального значення 3,83 мг/г маси сухої речовини в умовах комбінованої дії сольового стресу (16 % NaCl) і дефіциту азоту (2,5 мМ) (Abd El-Baky et al., 2004).

Вплив комбінації абіотичних стресів на синтез β -каротину і α -токоферолу у планктонних мікроводоростей було оцінено гру-

пою вчених (Häubner et al., 2014). Для експерименту взяли 6 фітопланктонних видів: *Nadularia spumigena* (Cyanobacteria), *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta), *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta), *Prorocentrum cordatum* (Dinophyta), *Rhodomonas salina* (Cryptophyta). Три види з перелічених виділили як кращі продуценти α -токоферолу і β -каротину: *N. spumigena*, *P. tricornutum*, *D. tertiolecta*. Інтенсивність накопичення β -каротину і α -токоферолу в досліджуваних мікробіодоростей залежно від фактора впливу відрізнялась. Найвищі концентрації α -токоферолу у *P. tricornutum*, *S. costatum* і *P. cordatum* отримано за найвищих досліджуваних значень температури (25 °C) та інтенсивності освітлення 240 мкмоль фотонів/(м² · с), у *Rhodomonas salina* за середньої температури (15 °C) та інтенсивності освітлення 50 мкмоль фотонів/(м² · с), у *N. spumigena* за низької температури (5 °C) та інтенсивності освітлення 50 мкмоль фотонів/(м² · с). Таким чином, для різних груп мікробіодоростей інтенсивність накопичення α -токоферолу визначається рівнем їх чутливості до діючої комбінації стресових чинників. Для *D. tertiolecta* головну роль у стимуляції синтезу відіграла інтенсивність освітлення 240 мкмоль фотонів/(м² · с) незалежно від температури. Для *D. tertiolecta* виявлено стимуляцію синтезу β -каротину збільшенням фотосинтетичної активності мікробіодорості (F_v/F_M), але при цьому спостерігали зменшення вмісту α -токоферолу, що пов'язують з першочерговою роллю у тилакоїдних мембранах β -каротину як переносника енергії світла до хлорофілу, а α -токоферолу як антиоксидантного протектора ліпідного шару (Häubner et al., 2014).

Вітамін Е є домінантним антиоксидантом ліпідного бішару мембран тилакоїдів і оболонки хлоропластів, властивості якого обумовлюють залежність рівня його накопичення від вмісту ліпідів у клітинах фотосинтезуючого організму. *Dunaliella tertiolecta* і *Tetraselmis suecica* — морські одноклітинні зелені джугитикові водорості з відносно високим вмістом ліпідів і токоферолів. Ці мікробіодорості широко застосовують в аквакультурі для підкормки риби і личинок молюсків, оскільки вони невибагливі до умов культивування, можуть житись органічною речовиною та швидко накопичувати біомасу понад 70 г/л. Порівнянням інтенсивності росту і накопичення α -токоферолу в клітинах *D. tertiolecta* і *T. suecica* в експериментальних умовах визначено фактори

впливу на синтез і накопичення вітаміну Е у клітинах цієї групи організмів. Очікуваний вплив високої інтенсивності освітлення на синтез токоферолів як антиоксидантів, які захищають фотосинтетичний апарат від фотооксидативних ушкоджень, не підтвердився у *D. tertiolecta* в цьому дослідженні. Зі збільшенням концентрації клітин у суспензії культури *D. tertiolecta*, а отже, зменшенням густини потоку фотонів, які досягають окремої клітини мікродорості, концентрація α -токоферолу не лише не зменшувалась, а й збільшувалась. Дослідники пояснюють це стимуляцією синтезу токоферолів у клітинах не лише інтенсивністю освітлення, а і старінням культури. У процесі накопичення біомаси культурою *T. suecica*, а отже, її затінення, також не спостерігали зменшення вмісту α -токоферолу. Отримані дані дають підставу для висновку щодо можливості одержання високих концентрацій α -токоферолу з культур мікродоростей, які мають велику щільність клітин (Carballo-Cardenas, et al. 2003).

Швидкий приріст біомаси у культурах мікродоростей зазвичай стимулюється внесенням органічних сполук, які легко засвоюються клітинами і є пластичним матеріалом. Здатність мікродорості до гетеротрофного живлення (*D. tertiolecta*, *T. suecica*, *E. gracilis* та ін.) може спрощувати культивування потенційного продуцента α -токоферолу в результаті стимуляції росту культури органічними субстратами і синтезу α -токоферолу в умовах відсутності освітлення (Carballo-Cardenas et al., 2003). На клітинах культури не здатного до фотосинтезу мутантного штаму WZSL мікродорості *Euglena gracilis* встановлено накопичення α -токоферолу в мітохондріоні клітин, що вказує на можливість залучення токоферолів до реакції мембранного електронного транспорту і регуляції проникності й текучості мембран цих органел (Kusmic et al., 1998).

Тип органічної сполуки, яку використовують як джерело вуглецю та (або) азоту для клітин мікродорості, має значення для акумуляції нею вітамінів (Herrero et al., 1991).

Технологія застосування біореакторів є одним із важливих способів промислового виробництва біологічно активних молекул. Можливість їх використання вивчали з метою промислового отримання RRR- α -токоферолу з потенційного продуцента мікродорості *Stichococcus bacillaris* штам siva2011 (Chlorophyta). Як речовину-елісатора синтезу токоферолів у клітинах мікродорості G. Sivakumar та співавт. (2014) залучили метилжасмонат. Жас-

монати — молекули, які синтезуються у клітинах рослин у відповідь на стреси та підвищують активність експресії деяких генів, залучених до захисних механізмів рослинного організму. Один із таких генів кодує тирозинамінотрансферазу, залучену до біосинтезу токоферолів. Вчені проаналізували концентрації 50, 100 і 200 мкл метилжасмонату у живильному середовищі *S. bacillaris*, з-поміж яких найменша мала найвираженіший вплив на продукування вітаміну Е. На 24-ту годину культивування *S. bacillaris* у біореакторі за наявності 50 мкл жасмонату рівень RRR- α -токоферолу у клітинах організму зростав на ~50 % порівняно з контрольним варіантом і досягав 1,3 мг/г маси сухої речовини. Таким чином, цей спосіб збільшення продуктивності *S. bacillaris* не є трансгенним. Цитотоксична дія більших концентрацій метилжасмонату і триваліший період експозиції негативно впливали на інтенсивність синтезу токоферолів. Балонний біореактор, що використовували для культивування *S. bacillaris*, є рідинно-фазним із поліпшеною геометрією і збільшеним вільним простором, в якому рух культуральної рідини здійснюється таким чином, що ефективно забезпечує доступ світла до клітин культури та, відповідно, сприяє накопиченню біомаси (Sivakumar et al., 2014).

Synechocystis sp. PCC 6803 є основним модельним організмом для досліджень синтезу токоферолів у клітинах ціанобактерій. Біосинтез токоферолів на ньому був досконало вивчений методом «вимкнення» основних генів метаболічного шляху та встановлено деяку різницю процесу порівняно з рослинами. Гасіння активності експресії гена, що кодує *p*-гідроксифенілпіруватдіоксигеназу, яка каталізує формування гомогентизинової кислоти з *p*-гідроксифенілпірувату, зменшує вміст токоферолів у клітинах ціанобактерій, тоді як такі саме дії з геном-ортологом у *Arabidopsis thaliana* призводять до летальної мутації. Гомогентизинова кислота залучена до синтезу не тільки токоферолів у клітинах рослин, а й пластохінонів, із чим пов'язана летальність мутації. Особливістю *Synechocystis* ssp. PCC 6803 є можливість створення мутантних організмів, у яких не синтезуються токоферолі, але біосинтез пластохінонів відбувається як незалежний процес.

На *Synechocystis* sp. PCC 6803 вперше показано вплив умов росту на накопичення α -токоферолу у клітинах ціанобактерій. Досліджували такі фактори впливу: інтенсивне світло, глюкозу

як субстрат, забезпечення CO_2 . Встановлено, що залежність біосинтезу токоферолів у ціанобактерії *Synechocystis* sp. PCC 6803 від наведених чинників подібна до еукаріотичних мікроводоростей. Зі збільшенням інтенсивності освітлення найвираженішим було зростання вмісту токоферолів як наслідок розвитку фотооксидативного стресу і відповідної реакції організму. Паралельно з підвищенням рівня освітлення зменшували концентрацію CO_2 у повітрі, яким продували культуру, і спостерігали за ще більшим підвищенням рівня токоферолів у клітинах. Ліміт CO_2 обмежує швидкість темної реакції фотосинтезу і підвищує вірогідність утворення електронної пробки в умовах варіабельності інтенсивності освітлення і, відповідно, фотооксидативного стресу. Навпаки, збільшення вмісту CO_2 у середовищі поліпшує функціональний стан фотосинтетичного апарату клітин і його стійкість до розвитку стресу. Внесення органічного джерела вуглецю, наприклад глюкози, спрямовує метаболізм клітин на отримання енергії, передусім у зв'язку з диханням. Глюкоза як субстрат сприяє збільшенню відновлювального потенціалу клітин, що підтверджує зниження швидкості ресинтезу білка D1 як наслідок зменшення інтенсивності його ушкодження. Таким чином, глюкоза в умовах низької інтенсивності освітлення істотно зменшує і потребу мікроводорості в антиоксидантах (Backasch, 2005).

Вміст токоферолів у перерахунку на клітину в інших представників зелених одноклітинних водоростей родів *Chlorella* і *Chlamydomonas*, а також ціанобактерій *Spirulina* невеликий, через що, незважаючи на простоту вирощування і швидке накопичення біомаси, ці культури не розглядаються як перспективні продуценти вітаміну Е.

Кількість α -токоферолу, яку можна отримати з мікроводорості, залежить не лише від його внутрішньоклітинного вмісту, а й від способу екстракції вітаміну. J. Mendiola та співавт. (2008) в низці вимірювань встановили вміст α -токоферолу в клітинах *Spirulina platensis* лише 0,011—0,014 мг/г маси сухої речовини змодельовали процес екстракції α -токоферолу з використанням рідкого діоксиду вуглецю з метою виявлення найефективніших показників температури і тиску під час екстракції. Оптимальні умови для неї, представлені статистичною програмою, відповідають максимальним аналізованим і становлять 83,3 °C і 36,2 МПа. При дотриманні вказаних умов екстракції α -токоферолу рідким

діоксидом вуглецю є теоретична можливість отримати концентрацію сполуки 29,4 мг/г маси сухої речовини *S. platensis*.

Мікрородорість *Euglena* spp. є найінтенсивніше досліджуваним родом для продукування токоферолів, внутрішньоклітинна концентрація яких може досягати 7,35 мг/г клітин зі вмістом α -токоферолу до 97 % (Ogbonna, 2009). В кінці експоненційної фази росту при фотоавтотрофному культивуванні концентрація α -токоферолу в клітинах *Euglena gracilis* становить у середньому 1,56 мг/г маси сухої речовини клітин, що більше, ніж у *Spirulina platensis* (0,063 мг/г), *Isochrysis galbana* (0,058 мг/г), *Dunaliella tertiolecta* (0,12 мг/г), *Tetraselmis suecica* (0,42 мг/г), *Diacronema vlkianum* (0,069 мг/г), *Nannochloropsis oculata* (0,51 мг/г). *E. gracilis* є найбільшим продуцентом токоферолів серед 285 досліджуваних штамів мікроорганізмів. Крім того, клітини мікрородорості *E. gracilis* накопичують у великих кількостях інші антиоксиданти, такі як β -каротин, вітамін С, глутатіон, а також ПНЖК, всі 20 основних амінокислот, імуностимулюючий не розгалужений полісахарид β -глікан (парамілон) (Vismara et al., 2003). Внаслідок високої поживної цінності та нетоксичності його застосовують як основний корм або підкормку для тварин, він споживається людиною у вигляді біологічно активних добавок (Ogbonna, 2009).

Мікрородорість *Euglena gracilis* здатна асимілювати різноманітні органічні джерела вуглецю (глюкозу, ацетат, глутамат, сукцинат, піруват, малат, етанол та ін.), досягаючи щільності клітин 10,8 г маси сухої речовини на 1 л за культивування у середовищі з підібраним комбінованим їх вмістом (Rodriguez-Zavala et al., 2010). Цей організм також добре росте в автотрофних і гетеротрофних умовах, має широкий оптимум рН і температури росту, не надто вибагливий до інтенсивності освітлення, пристосовується до дефіциту кисню. Клітини мікрородорості *E. gracilis* позбавлені целюлозної клітинної стінки, що значно полегшує екстракцію токоферолів, і в разі вживання біомаси *E. gracilis* в їжу вона легко засвоюється і асимілюється. Проте порівняно з деякими іншими мікрородоростями (*Dunaliella* і *Spirulina*) культура *E. gracilis* легко контамінується мікроорганізмами, які швидко ростуть (Ogbonna, 2009).

Проведено низку експериментів для дослідження збільшення ефективності отримання вітаміну Е з мікрородорості *Euglena gracilis*. Оптимізація синтезу α -токоферолу культурою *E. gracilis* —

це модифікація умов культивування, двостадійне вирощування і пошук субстратів, які сприяють не лише росту, а й накопиченню α -токоферолу. Одним із найпростіших і дешевших способів є варіація умов культивування з урахуванням знань про чинники, які стимулюють синтез токоферолів, і специфіку об'єкта. Фотогетеротрофно культивовані клітини *E. gracilis* досягають високих показників накопиченої біомаси за одиницю часу, проте з меншим вмістом антиоксидантних вітамінів, ніж у фотоавтотрофно вирощеної культури. Для ефективного продуктування цих вітамінів застосовано двостадійне культивування (Takeyama et al., 1997). Після того як клітини *E. gracilis* були вирощені в культурі з підкормкою у фотогетеротрофних (або гетеротрофних) умовах на 6-ту добу їх густина досягала 19 г/л. Наступне перенесення цих клітин у сольове живильне середовище і культивування протягом 3 діб фотоавтотрофно збільшувало вміст у клітинах вітаміну Е до 30,1 мг/л, а β -каротину і вітаміну С — до 71,0 і 86,5 мг/л відповідно. Водночас такий самий вміст зазначених сполук спостерігали у клітинах, культивованих лише фотоавтотрофно. Метод двостадійного вирощування, застосований до деяких інших водоростей, показав, що мікрводорість *D. tertiolecta* хоча і накопичує дещо більше токоферолів на клітину, проте фінальна концентрація клітин невелика в результаті низького виходу вітаміну Е на культуру порівняно з культурою *E. gracilis*. Водорості *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Spirulina*, незважаючи на простоту вирощування і швидке досягнення високої концентрації клітин, мають малий вміст вітаміну Е на клітину (Takeyama et al., 1997).

Застосування циклічної фотоавтотрофно-гетеротрофної системи культивування, за якої клітини протягом дня культивуються фотоавтотрофно, а вночі гетеротрофно, вирішує проблему втрати біомаси вночі та досягнення тривалого (продовжуваного) росту культури в умовах циклів світло-темрява (Ogbonna et al., 2002).

Синтез токохроманолів у клітинах *Euglena gracilis* можна стимулювати екзогенно внесенням у живильне середовище сполук — джерел вуглецю і азоту. З-поміж значної кількості органічних сполук, якими цей організм здатен живитися, виявлено такі, що істотно підвищують концентрацію клітин і вміст у них вітаміну Е. Додавання етанолу до сольового живильного середовища для гетеротрофного культивування приводить до нако-

Таблиця 8.5. Вміст α -токоферолу в клітинах мікроводорості *Euglena gracilis* за різних способів культивування

Фаза росту культури	Умови культивування	Вміст α -токоферолу, мг/г маси сухої речовини	Літературне джерело
Кінець експоненційної фази	Фотоавтотрофне	1,56	Ogbonna et al., 1998
	Фотоавтотрофно-фотогетеротрофне двостадійне	1,45	Ogbonna et al., 1998
	Гетеротрофне (етанол)	1,2	Ogbonna et al., 1988
Експоненційна фаза	Гетеротрофне (етанол)	1,4	Rodriguez-Zavala et al., 2010
	Гетеротрофне (етанол + глутамат)	2,45	Rodriguez-Zavala et al., 2010
	Гетеротрофне (етанол + глутамат + малат)	3,7	Rodriguez-Zavala et al., 2010

пичення біомаси мікроводорості до 39,5 г/л на 19-ту добу, що більше, ніж за фотоавтотрофного, чи навіть фотогетеротрофного культивування, і економічно вигідно через незалежність від освітлення. Водночас вміст токоферолів становить 1,2 мг/г клітин мікроводорості, що не набагато поступається показникам для фотоавтотрофного (1,56 мг/г кл.) і фотогетеротрофно-фотоавтотрофного двостадійного культивування (1,45 мг/г кл.). Продуктивність α -токоферолу дорівнює 102,1 мкг/(л · год) (Ogbonna et al., 1998). Етанол спричинює помірний оксидативний стрес у клітин організму, що індукує синтез токохроманолів. Цей спирт зменшує імовірність зараження культури іншими мікроорганізмами і сприяє накопиченню парамілону, запасного полісахариду *E. gracilis*, який також є біотехнологічно важливою сполукою (Tani, Tsumura, 1989; Ogbonna et al., 1998; Afiukwa, Ogbonna, 2007). Набагато більшу концентрацію α -токоферолу (6,1 мг/г маси сухої речовини) отримано при використанні мутантного штаму *E. gracilis* з додаванням у живильне середовище попередників синтезу α -токоферолу (Tani, Osuka, 1989). Існує припущення, що ацетил-КоА, який формується у процесі метаболізму етанолу, можна застосовувати як попередник синтезу токоферолів.

Комбінація екзогенно внесених органічних сполук може забезпечити досягнення ще більшого ефекту. Культури з етанолом і глюкозою вже за 6 діб дають концентрацію клітин 19,69 г/л із вмістом α -токоферолу 1,19 мг/г кл. (Fujita et al., 2008). Культури з етанолом разом із малатом і глутаматом на 5-ту добу гетеротрофного культивування — 3,7 мг/г кл. Дані щодо вмісту α -токоферолу у клітинах *Euglena gracilis* за різних умов культивування, представлені у табл. 8.5, засвідчують, що мікроводорість *E. gracilis* здатна накопичувати α -токоферол у значно більших кількостях, ніж насіння соняшнику (0,27 мг/г) і сої (0,2 мг/г) (Rodriguez-Zavala et al., 2010).

З погляду простоти і економічності процесу, ці дані демонструють, що гетеротрофні культури мікроводорості *Euglena gracilis* можуть бути перспективними комерційними продуцентами активного вітаміну Е і замінювати нинішні природні комерційні його джерела — олії (Ogbonna et al., 1998).

КАРОТИНОЇДИ ВОДОРОСТЕЙ

Каротиноїди — природні жиророзчинні пігменти, які синтезуються переважно в рослинах, водоростях і фотосинтетичних бактеріях. Їх значення як компонентів світлозбиральних комплексів і фотопротекторів у процесі фотосинтезу полягає в захисті складових фотосинтетичного апарату від ушкоджень (Faraloni, Torzillo, 2017).

Ці речовини поділяють на дві групи: гідрокарбоніві каротиноїди, які ще називають каротинами (α -каротин, β -каротин та ін.), і оксигенвмісні каротиноїди (ксантофіли, астаксантин та ін.). Відповідно до структури вони можуть по-різному розподілятися між клітинними компартментами. Ксантофіли є відносно гідрофобними молекулами і зазвичай асоціюються з мембранами та (або) утворюють нековалентні зв'язки зі специфічними білками (Eonseon et al., 2003). Колір цих пігментів варіює від жовтого до червоного.

Представники різноманітних груп водоростей синтезують каротиноїди різного кількісного і якісного складу. Зелені мікрowodорості синтезують практично всі ксантофіли, відомі у вищих рослинах (Henríquez et al., 2016). Каротиноїди ксантофілового циклу відрізняються у групах зелених, червоних і бурих водоростей. Акумуляція зеаксантину і відсутність антраксантину та віолаксантину характерна для *Rhodophyceae*, *Glaucophyceae* і *Charophyceae*. Діадиноксантин і діатоксантин виявлено у *Bacillariophyceae*, *Euglenophyceae*, *Haptophyta*. У деяких водоростей ідентифікують лише діадиноксантин, що є свідченням практично повного перетворення діатоксантину на діадиноксантин. Зеаксантин/антраксантин/віолаксантин ідентифіковано у *Chlorophyta* і *Chlorarachniophyceae*, в деяких із представників не ідентифіковано антраксантин, що свідчило про його повне перетворення на зеаксантин або віолаксантин. *Isochrysidaceae* і *Skeletonemata* мають не лише діатоксантин/діадиноксантинову захисну систему, а

й здатні до синтезу зеаксантину, антраксантину та (або) віолаксантину (Serive et al., 2017).

Вміст каротиноїдів у клітинах мікроводоростей становить 8–14 % їх біомаси (Henríquez et al., 2016). Найважливішим джерелом каротиноїдів є представники родини *Chlorophyceae*, яка об'єднує *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Muriellopsis* і *Haematococcus* spp. У їх клітинах накопичується найбільше різноманіття каротиноїдів і найінтенсивніше активується синтез у відповідь на зміну умов росту (Henríquez et al., 2016). За стресових умов мікроводорості здатні накопичувати каротиноїди у значних кількостях, через що їх називають клітинними фабриками. Зелена одноклітинна мікроводорість *Haematococcus pluvialis* може продукувати значну кількість астаксантину, який з часом повністю заповнює клітини та забезпечує червоний колір мікроводорості. Зелені мікроводорості *Dunaliella salina* і *D. bardawil* є добре відомими продуцентами β-каротину, який зумовлює помаранчевий колір клітин. У клітинах колоніальної мікроводорості *Scenedesmus* акумулюється у значних кількостях лютеїн, тому клітини набувають жовтого кольору (Faraloni, Torzillo, 2017). Мікроводорість *Muriellopsis* spp., яка також накопичує у великих кількостях лютеїн (до 35 мг/л культури) за спеціально підібраних умов вирощування, використовують для промислового отримання лютеїну (Del Campo et al., 2000).

Комерційне значення каротиноїдів полягає у їх застосуванні для виготовлення барвників, їжі, фармацевтичних і косметичних засобів. Концентрація β-каротину у клітинах мікроводоростей-продуцентів суттєво змінюється залежно від умов вирощування і зазвичай зростає в умовах стресу (Ramos et al., 2011; Rajesh et al., 2017) (рис. 9.1, див. вклейку).

Лише незначну кількість мікроводоростей комерційно використовують для отримання каротиноїдів, тому постійно ведеться пошук нових продуцентів і оптимізуються умови вирощування для продукування продуцентами каротиноїдів. Методи біотехнології та генної інженерії також залучають для отримання збільшеного виходу цінних сполук із біомаси (Leon et al., 2007).

9.1. Синтез каротиноїдів

Біосинтез каротиноїдів відрізняється від виду до виду, проте майже всі фотосинтезувальні мікроводорості й рослини мають спільний первинний метаболічний шлях. Більшість каротиноїдів

синтезується у хлоропластах мікроводоростей, але каталіз реакцій синтезу відбувається за участю закодованих у ядрі ферментів. Найпоширенішими у природі є гідрофобні тетратерпеноїди з довжиною ланцюга C₄₀. Полієнові ланцюги каротиноїдів містять кон'юговані подвійні зв'язки, які відповідають за пігментацію молекул та їх здатність до поглинання фотонів у видимій ділянці спектра (Leon et al., 2007).

Каротиноїди формуються з використанням блоків C₅ — ізопренових одиниць (C₅H₈). Ізопентенілпірофосфат (ІПП) і його ізомер диметилалілпірофосфат (ДМАПФ) утворюються з ацетил-КоА (цитозольний ацетат/мевалонатний шлях (МВА)) або з піруватату і гліцеральдегід-3-фосфату (пластидний метилеритритол-4-фосфатний шлях (МЕФ)). Шлях МЕФ характерний для більшості водоростей і рослин, але деякі мікроводорості, наприклад *Euglena gracilis*, синтезують ІПП та ДМАПФ цитозольним шляхом МВА (Paniagua-Michel, 2012; Kato, 2016). Із трьох молекул ІПП, що послідовно приєднуються до ДМАПФ за участю пренілтрансфераз, формуються спочатку геранілпірофосфат (C₁₀) і фарнезилпірофосфат (C₁₅), а потім геранілгеранілпірофосфат (C₂₀) (Carotenoids..., 2016; Kato, 2016). Далі відбувається конденсація двох молекул C₂₀ з утворенням фітоїну (C₄₀) — першого синтезованого безбарвного каротиноїду. Реакція утворення фітоїну каталізується фітоїнсинтазою. Потім фітоїн перетворюється на лікопін в результаті послідовних реакцій десатурації за дії фітоїндесатурази. У реакціях десатурації також утворюються фітофлуїн, ζ-каротин. β-Каротин та його похідні (ксантофіли) синтезуються з лікопіну (Cazzonelli, 2011; Carotenoids..., 2016; Kato, 2016). У темряві збільшується вміст фітофлуїну і ζ-каротину, а на світлі продовжується формування β-каротину. Світло індукує формування та активацію ферментів, залучених до перетворення фітофлуїну і ζ-каротину на β-каротин (Dolphin, 1970). Останній синтезується за участю лікопін-β-циклази, α-каротин — β- та ε-циклаз (Rajesh et al., 2017) (рис. 9.2). Гідроксилування β- і ε-кілець α-каротину утворює лютеїн. Деякі групи водоростей, такі як діатомові, дінофітові та гаптофітові, синтезують більшу різноманітність ксантофілів: діатоксантин, діадиноксантин і фукоксантин. У процесі дослідження діатомових водоростей встановлено, що віолаксантин є посередником у біосинтезі діадиноксантину, який, у свою чергу, є попередником фукоксантину (Eonseon et al., 2003).



Рис. 9.2. Схема біосинтезу каротиноїдів (позначено →). Шляхи біосинтезу астаксантину з β-каротину в клітинах мікрободоростей *Haematococcus pluvialis* (позначено --) та *Chlorella zofingiensis* (позначено → і ··)

Астаксантин синтезується у ліпідних тільцях цитозолу особливо активно в умовах стресу. Із β-каротину утворюються попередники синтезу астаксантину — кантаксантин і зеаксантин, за участю ензимів β-каротинкетоксилази і β-каротингідроксилази відповідно.

9.2. Фактори стимуляції синтезу каротиноїдів

Інтенсивність каротиногенезу визначається умовами росту водоростей і зазвичай підвищується за дії стресових чинників різної природи (табл. 9.1). На синтез каротиноїдів у клітинах фотосинтезуювальних організмів значно впливає освітлення, оскільки первинною функцією каротиноїдів є запобігання розвитку стресу, спричиненого надмірною його інтенсивністю. Перевідновлення акцепторів електронів електронтранспортного ланцюга, а саме пулу Pх, є сигналом для активації захисних механізмів, таких як переміщення СЗК ФС II, перемикання з лінійного потоку електронів на циклічний та індукцію синтезу каротиноїдів. За

цих умов знижується рН тилакоїдного люмену, що приводить до деепоксидзації пігментів ксантофілового циклу і може активувати ензими, залучені до каротиногенезу (Faraloni, Torzillo, 2017).

Індукція каротиногенезу залежить від типу світла і штаму. В клітинах мікродорості *Chlamydomonas reinhardtii* при 300–350 мкмоль фотонів/(м² · с) індукується спочатку деепоксидация віолаксантину з утворенням зеаксантину, тоді як його синтез зафіксовано лише через 10 хв дії світла інтенсивністю 800 мкмоль фотонів/(м² · с) (Niyogi et al., 1997). Виявлено стимуляцію синтезу каротиноїдів у відповідь на дію УФ-опромінення (Salguero, 2005).

Анаеробні умови, що можуть виникати в культурах мікродоростей під час їх вирощування в біореакторах закритого типу і в умовах, які лімітують фотосинтетичну активність, сприяють підвищенню внутрішньоклітинного рівня каротиноїдів. Нестача кінцевого акцептора електронів кисню — одна з причин перевідновлення пулу Пх, який не активує ксантиновий цикл, але спостерігається синтез de novo його компонентів, зокрема віолаксантину, а також лютеїну, β-каротину (Demmig-Adams, 1990; Faraloni, Torzillo, 2013).

Для низьких температур також стимулює синтез каротиноїдів. Так, у 4 рази збільшується вміст β-каротину за переведення культури *Dunaliella bardawil* з температури вирощування 30 °С на 10 °С (Ben-Amotz, 1996). Для *Dunaliella salina* стимулювали синтез каротиноїдів екстремальними значеннями рН живильного середовища. Максимальний рівень лютеїну в клітинах спостерігали при рН 6 і 9, тоді як рН 6,5 є найоптимальнішим для росту цієї водорості (Worowitzka, 1988).

Лімітування кількості поживних сполук стимулює акумуляцію каротиноїдів. Нестача нітрогену, фосфору, сірки та (або) хлору призводить до накопичення каротиноїдів у мікродоростей, оскільки негативно відбивається на інтенсивності їх росту. Нітроген є одним із компонентів найважливіших макромолекул клітин, білків, ферментів, від яких безпосередньо залежить ріст організму. Крім того, в умовах нестачі нітрогену в клітинах мікродоростей накопичуються ліпіди (Rabbani et al., 1998; Liang et al., 2015), які є середовищем для розміщення каротиноїдів. У процесі інгібування синтезу жирних кислот клітинами *Dunaliella salina* не формуються ліпідні глобули у клітинах, але і не накопичується β-каротин, що у них локалізується (Rabbani et al., 1998). Синтез первинних (фотосинтетичних) каротиноїдів за умов нестачі нітрогену знижується через інгібування синтезу білків СЗК.

Таблиця 9.1. Мікрводорості-продуценти антиоксидантних каротиноїдів і стресові умови, що індукують їх синтез (за Faraloni, Torzillo, 2017)

Мікрводорість	Каротиноїд	Стресові умови
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Астаксантин, кантаксантин, лютеїн	Висока інтенсивність світла, дефіцит нітрогену
<i>Dunaliella salina</i>	β-Каротин	Висока інтенсивність світла, висока температура
<i>Scenedesmus</i> sp.	Лютеїн, β-каротин	Висока інтенсивність світла, дефіцит поживних сполук
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Діатоксантин, фукоксантин	Те саме
<i>Isochrysis</i>	Те саме	« »
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Зеаксантин, лютеїн	Висока інтенсивність світла, дефіцит сірки, анаеробіоз

9.3. Функції каротиноїдів

Каротиноїди функціонують як світлозбиральні пігменти, структурні компоненти фотосинтетичного апарату, посередники нефотохімічного гасіння і уловлювачі АФК у клітинах фотосинтезуювальних організмів.

Їх поділяють на первинні, ксантофіли і β-каротин, які знаходяться у хлоропластах за стандартних умов росту водорості та прямо залучені до фотосинтетичного процесу. Стресові умови росту (висока інтенсивність освітлення, ліміт доступних поживних сполук та ін.) стимулюють синтез первинних каротиноїдів для розсіювання надлишкової енергії світла. У деяких фотосинтезуювальних мікроорганізмах в умовах стресу утворюються також вторинні каротиноїди: астаксантин, лютеїн, віолаксантин, антраксантин, зеаксантин, що зумовлюють червоне/жовте забарвлення стресованих водоростей. Вторинні каротиноїди, пігменти ксантофілового циклу, залучені до нефотохімічного гасіння флуоресценції хлорофілу, яке є безпечним шляхом розсіювання енергії (Faraloni, Torzillo, 2017). Вторинні каротиноїди не мають тісного зв'язку з фотосинтетичним процесом і не локалізуються у тилакоїдних мембранах хлоропластів, а можуть накопичуватись поза його межами в ліпідних везикулах цитозолу або строми хлоропластів (Henríquez et al., 2016).

Каротиноїди як антиоксиданти попереджують пероксидне окиснення ліпідів, здатні напряду гасити триплетний стан хлорофілів ($^3\text{Хл}^*$) і синглетний кисень ($^1\text{O}_2$), що утворюється у фотохімічних

реакціях (Gong, Bassi, 2016). Вторинні каротиноїди — діадіноксантин, астаксантин, фукоксантин, лороксантин, зеаксантин — це антиоксиданти, які знешкоджують $^1\text{O}_2$ і цим запобігають пошкодженню клітинних компонентів (Faraloni, Torzillo, 2017). АФК утворюються в разі виникнення фотосинтетичного дисбалансу між поглинутою енергією світла антенними комплексами і енергією, використаною для фіксації CO_2 . Фотосинтетичний енергетичний дисбаланс може виникати як унаслідок дії світла високої інтенсивності, так і в умовах, які лімітують фіксацію CO_2 та зумовлені зовнішніми чинниками, такими як нестача поживних речовин та CO_2 у навколишньому середовищі, низька температура, висока солоність та ін.

Кількісне співвідношення каротиноїдів різної структури в ліпідному бішарі клітинних мембран визначає їх товщину, текучість і проникність, а отже, стабільність і резистентність до пошкоджувальних чинників (Faraloni, Torzillo, 2017).

9.4. Застосування каротиноїдів

Вторинні каротиноїди широко використовують як антиоксиданти для знешкодження високореактивних і токсичних форм кисню, вони чинять протидію вільним радикалам, є ефективними противіковими та протипухлинними агентами. Роль каротиноїдів як антиоксидантів для підтримання здорового функціонування організму людини почали розглядати відносно недавно.

Лютеїн і зеаксантин застосовують у разі патологій зору, а β -каротин — для захисту шкіри від дії сонячного світла та для лікування шкірних захворювань (Faraloni, Torzillo, 2017). Каротиноїдами збагачують функціональну їжу, важливе значення має природне походження цих антиоксидантів.

Лютеїн використовують для підфарбовування ліків і косметики, сполука надає яскравішого забарвлення м'ясу риби та птиці в разі його згодовування. Астаксантин — надзвичайно поширений пігмент у природі, особливо в морській воді, де він зумовлює забарвлення фітопланктону і надає рожево-червоного відтінку м'ясу морських тварин, які його поїдають (Eonseon et al., 2003). Астаксантином як цінною поживною сполукою додатково збагачують їжу морських тварин, яких вирощують у промислових умовах.

Пігменти, що в незначних кількостях наявні в мікрододоростях і потребують обережного виділення для ідентифікації, можна використовувати як хемотаксономічні маркери, вони перспективні для застосування у біотехнології та медицині (Serive et al., 2017).

ПОЛІФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ МАКРОСКОПІЧНИХ І МІКРОСКОПІЧНИХ ВОДОРОСТЕЙ

Водорості — це багате джерело біологічно активних речовин, у яких продукти первинного і вторинного метаболізму проявляють протигрибкову, противірусну, альгоцидну, антиензиматичну або антибіотичну активності (Золотарьова та ін., 2008; de Jesus Raposo et al., 2013). Високий протизапальний потенціал ПНЖК, фікоціаніну лютеїну (De Moraes et al., 2015), вітаміну E, β -каротину (Mokrosnop et al., 2016) підтверджений клінічною практикою в разі лікування і профілактики різних захворювань. Необхідність пошуку нових препаратів з антимікробною активністю можна пояснити тим, що опірність патогенних мікроорганізмів до традиційних антибіотиків зростає. Мікроводорості здатні синтезувати сполуки, що містять ПНЖК, стероли, вуглеводи, феноли, каротиноїди та інші біоактивні речовини, і можуть стати джерелом натуральних препаратів із широким спектром антибактеріальної активності.

Важливими природними антиоксидантами, що входять до інтегральної системи регуляції біохімічних і біоенергетичних процесів у рослинній клітині, є фенольні сполуки. Їх молекули утворені одним або кількома ароматичними кільцями з однією чи кількома фенольними групами. Поліфеноли можна поділити на кілька класів: фенолкарбонові кислоти (похідні гідроксибензойної, гідроксикоричної кислот), флавоноїди (флаволи, флавоноли, флаванони, флаванололи, флаваноли, антоціани).

Широкий спектр біологічних потенційних можливостей поліфенолів пов'язаний з їх антиоксидантними властивостями. Багато досліджень присвячено участі флавоноїдів у захисті рослинної клітини від стресових чинників і детоксикації АФК, таких як супероксид (O_2^-), пероксид водню (H_2O_2), гідроксильний радикал (OH^\cdot), синглетний кисень (1O_2), гідропероксильний радикал (HO_2^\cdot) (Rice-Evans et al., 1997; Pourcel et al., 2007 та ін.). Часто накопи-

чення поліфенольних сполук у клітині розглядають як індикатор стресового фізіологічного навантаження (Winkel-Shirley, 2002). Основним джерелом АФК у рослинах є фотосинтетичний електронний транспорт і мітохондріальне дихання (Suzuki et al., 2012). Молекули поліфенолів діють як антиоксиданти: дезактивують АФК у результаті перенесення одного електрона і одного атома водню (Rice-Evans et al., 1997). Ефективне захоплення і детоксикація АФК відбуваються при фотоокисненні флавоноїдів за участю пероксиду водню (Takahama, Oniki, 2000) і флавоїдпероксидази (Pourcel et al., 2007). Поліфенольні сполуки наявні в різних наземних і водних рослинах. Відомо понад 10 тис. фенольних сполук (Ferrer et al., 2008). Їх різноманітність пов'язана з модифікацією базальних флавоноїдних структур, які містять флаволи, флавоноли, флаван-3-оли, флаванони, ізофлавоноїди, ізофлавані. Скелет флавоноїду може бути модифікований глікозилуванням, малонілюванням, метилюванням, гідроксилуванням, ацилюванням, пренілюванням або полімеризацією, що приводить до величезного розманіття кінцевих продуктів (Winkel-Shirley, 2002). Наявність таких груп атомів модифікує функції флавоноїдів, їх розчинність, рухливість, кислотно-основні властивості і здатність до хелатування важкими металами (Muzafarov, Zolotareva, 1989). Нині більшість поліфенолів, виділених із морських джерел, отримано з макроводоростей (Li et al., 2011).

10.1. Поліфенольні сполуки макроводоростей

Морські водорості широко використовують у харчуванні в багатьох південно-східних країнах. Через великий вміст біологічно активних речовин такі види, як *Ecklonia cava* Kjellman, *E. Stolonifera* Okamura, *E. kurome* Okamura, *Eisenia bicyclis* Kjellman, *Sargassum thunbergii* Kuntze, *S. fusiformis* Setch і *Laminaria japonica* Areschoug, мають анти-ВІЛ, протипухлинні, бактерицидні, радіозахисні, протиалергічні властивості, що пояснюється наявністю в них поліфенолів (Freile-Pelegn, Robledo, 2014).

Флоротаніни. Поліфенольні сполуки, які у значній кількості містяться в бурих водоростях. Вони можуть становити до 25 % біомаси сухої речовини водоростей (Koivikko et al., 2007) і є полімерами флорглюцінолу (1,3,5-тригідроксибензолу) з різними розміром і складом (рис. 10.1).

Існують чотири основні класи флоротанінів: фугалоли і флоторетолі, що містять естерний зв'язок, фуколи — фенільний зв'язок

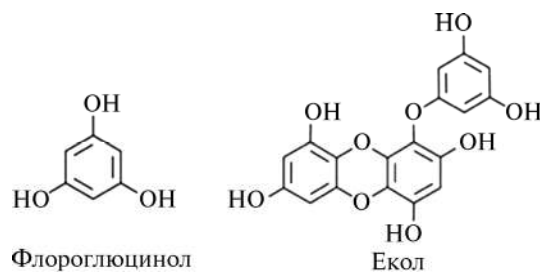


Рис. 10.1. Структура флороглуцинолу і еколу — тримера флороглуцинолу

зок, фукофторетолі — естерні і фенільні зв'язки, еколи — бензодіоксиновий зв'язок (Kim et al., 2013). Крім того, ця група поліфенолів проявляє велику хімічну мінливість, пов'язану з різним ступенем полімеризації, широким діапазоном розмірів молекул (зазвичай від 10 до 100 кДа) і розгалуженнями у структурі. Флоротаніни локалізуються переважно на периферії клітин, є складовими структурних компонентів клітинних стінок і утворюють комплекси з альгіновими кислотами (Kim et al., 2013). На відміну від танінів наземних рослин (проціанідинів і галотанінів), не здатних формувати ковалентні комплекси з білками (Koi-vikko et al., 2005), деякі флоротаніни можуть утворювати ковалентні зв'язки з окремими білками.

Флоротаніни, можливо, блокують прикріплення до поверхні талому епіфітних водоростей і молюсків. Відома також альгоцидна дія флоротанінів *Ecklonia kurome* на динофлагелят, відповідальних за виникнення у прибережних водах «червоних припливів» (Nagayama et al., 2003). З п'яти флоротанінів, виділених з *E. kurome*, найсильнішу альгіцидну дію проявляв флорофукофуроекол А, пентамер флороглуцинолу, активність якого зіставлена з дією епігалокатехінгалату — флавоноїду, що пригнічує ріст деяких мікрowodоростей (Lu et al., 2014). Одна з функцій флоротанінів, можливо, пов'язана із захистом таломів від поїдання тваринами, наприклад гастроподами.

Частина синтезованих флоротанінів виводиться в позаклітинний простір, а розчинні форми накопичуються у клітинних компартментах, здебільшого в особливих вакуолях — фізодах, під оптичним мікроскопом вони у формі невеликих контрастних включень діаметром 1—4 мкм. Ці флоротаніни відіграють допоміжну роль у пристосуванні водоростей до умов навколишнього середовища — захищають їх від УФ-опромінення і токсичної дії важких металів.

Молекули флоротанінів поглинають світло у середній і дальній ділянках УФ-спектра, у зв'язку з чим дослідники припускають, що ці сполуки мають фотозахисну властивість (Gómez, Huovinen, 2010). Існує кореляція між індукцією синтезу флоротанінів і зниженням інгібування фотосинтезу, а також ушкодженням ДНК — основних негативних наслідків дії УФ-опромінення на рослинні тканини (Swanson, Druehl, 2002). На прикладі *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis, *Fucus vesiculosus* Linnaeus (Koivikko et al., 2005) і *Macrocystis integrifolia* Вору доведено, що у стресових умовах підвищеного УФ-опромінення бурі водорості виділяють флоротаніни в навколишнє середовище, внаслідок чого морська вода в місцях їх проживання набуває властивостей світлозахисного екрану і послаблює рівень УФ-радіації. У воді, збагаченої флоротанінами *M. integrifolia*, краще виживали проростаючі мейоспори іншої бруї водорості — *Laminaria groenlandica* Rosenvinge (Swanson, Druehl, 2002). У прибережних морських ділянках із високою щільністю *Phaeophyta* шкідлива дія ультрафіолету на біоту послаблюється внаслідок високої концентрації водорозчинних УФ-екранувальних сполук.

Через наявність значної кількості фенольних груп у молекулах флоротанінів відбувається ефективне зв'язування іонів двовалентних металів: Sr, Mg, Ca, Be, Mn, Cd, Co, Zn, Ni, Pb і Cu (Amsler, Fairhead, 2005). Флоротаніни беруть участь у накопиченні важких металів всередині клітин, а їх позаклітинні форми разом з іншими екзометаболітами водоростей (Wang et al., 2014; Шнюкова, Золотарьова, 2015, 2017) долучаються до хелатування важких металів, чим знижують їх токсичну дію.

Незважаючи на важливість флоротанінів для біології та екології *Phaeophyta*, біохімічні й молекулярні механізми їх біосинтезу не повністю розкриті. Висловлювалося припущення про те, що в біосинтезі флоротанінів задіяний шикіматний метаболічний шлях, як і у процесі синтезу танінів наземних рослин (Amsler, Fairhead, 2005; Золотарьова та ін. 2017). Однак більш обґрунтованим є ацетатно-малонатний шлях синтезу, згідно з яким, флоротаніни синтезуються у хлоропластах або ЕПР в результаті конденсації ацетатних і малонатних залишків аналогічно синтезу жирних кислот. Цей процес каталізується полікетидсинтазою типу III, а отриманий полікетидний ланцюг може циклізуватись і таутомеризуватись з утворенням флорглюцинолу (Amsler, Fairhead, 2005).

Механізм біосинтезу флоротанінів значно прояснився після ідентифікації і схарактеризування полікетидсинтази типу III PKS1

бурої водорості *Ectocarpus siliculosus* (Dilwyn) Lynbye (Meslet-Cladière et al., 2013). Визначено основну стадію біосинтезу флоротаніну — синтез мономера флорглюцинолу з малоніл-СоА за участю PKS1. Філогенетичний аналіз сімейства генів PKS-типу III в *Stramenopiles* вказує на латеральне перенесення генів від предкової актинобактерії, що, як передбачають, стало основною подією у становленні синтезу альгінату, який визначив появу багатоклітинних бурих водоростей (Michel et al., 2010). В опублікованому геномі *E. siliculosus* (Meslet-Cladière et al., 2013) виявлено три потенційних локуси PKS. Продукт експресії одного з них в *Escherichia coli* — PKS1 виявився ідентичним білку PKS з очікуваною молекулярною масою 40 кДа.

Разом зі флоротанінами в бурих водоростях наявні також інші поліфенольні сполуки. Так, у *Stypocaulon scoparium* (Linnaeus) Kütz., зібраних у Середземному морі, виявлено флавоноли: мірицетин (2 %), рутин (1 %), кверцетин (0,3 %) (López et al., 2011).

Бромфеноли. Морські макроводорості здатні у великих кількостях накопичувати поліфенольні речовини, серед яких трапляються отруйні для молюсків бромфеноли, що захищають таломи водорості від поїдання (Титлянов та ін., 2011). Вони містять одне або кілька бензольних кілець, різну кількість бромів і гідроксильних замісників (рис. 10.2). Вперше бромфеноли виділив з червоної водорості *Rhodomela larix* (Turner) C. Agardh у 1967 р., а потім їх отримали та ідентифікували з різних видів морських водоростей: червоних, бурих і зелених (Liu et al., 2011). Ці речовини — звичайні морські вторинні метаболіти, що синтезуються за наявності бромпероксидази, пероксидаз водню і броміду (Flodin, Whitfield, 1999), який знаходиться в морській воді й водоростях концентрацією близько 0,65 мг/кг (Liu et al., 2011).

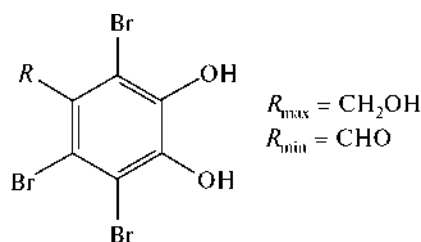


Рис. 10.2. Структура бромфенолів, отриманих із червоної водорості *Symphyclocladia latiuscula*, для яких характерна максимальна (R_{\max}) та мінімальна (R_{\min}) антиоксидантна активність

На рис. 10.2 наведено структури бромфенолів із максимальною і мінімальною антиоксидантною активностями, при цьому напівмаксимальний ефект (I_{50}) досягався за концентрацій 7,5 і 24,7 мкМ відповідно (Duan et al., 2007). Таким чином, обидві сполуки були більш ефективними у процесі дезактивації DPPH-радикалів, ніж бутильований гідрокситолуол ($I_{50} = 81,8$ мкМ), що застосовували як контроль. Очевидно, антиоксидантна активність бромфенолів залежить від числа гідроксильних груп у молекулі.

Бромфенольні сполуки, виділені з червоних водоростей, мають протипухлинну активність і знижують рівень глюкози в крові. Галогеновані поліфеноли *Laurencia majuscula* (Harvey) A.Y.S. Lucas пригнічують ріст колоній *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* і *Salmonella* sp., причому антимікробна дія поліфенолів *L. majuscula* еквівалентна комерційним антибіотикам (Титлянов та ін., 2011). Подальші дослідження показали, що бромфеноли морських водоростей мають широкий спектр біологічної активності (Liu et al., 2011), що привертає велику увагу виробників харчових добавок і фармацевтичних препаратів. Крім бромфенолів у деяких представників *Rhodophyta* виявлено до 12 % флаванонглікозида гесперидину і до 3 % флавонолів (Yoshie-Stark et al., 2003). Ці показники надзвичайно високі навіть порівняно з такими у наземних рослин. При вивченні антиоксидантних властивостей червоних водоростей *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux, *H. valentiae* (Turner) Montagne і *Jania rubens* (Linnaeus) Lamouroux (Chakraborty et al., 2015) з'ясовано, що їх антиоксидантна активність корелює з концентрацією поліфенольних сполук.

За результатами численних досліджень доведено, що бромфеноли мають потенційну антиоксидантну активність, яку оцінювали методом дезактивації радикалів 1,1-дифеніл-2-пікріл-гідразила (ДФПГ). Так, бромфеноли, виділені з червоної водорості *Symphocladia latiuscula* (Harvey) Yamada, ефективно дезактивували ДФПГ-радикали (Duan et al., 2007). Для цих бромфенолів характерні високий ступінь бромування і велика кількість замісників, багато з яких мають 3,4-дигідрокси-2,5,6-трибромбензилосильну групу в молекулі.

10.2. Поліфенольні сполуки мікроводоростей

Ще наприкінці 1960-х років у багатоклітинній водорості з роду *Nitella* (*Charophyta*), тісно пов'язаної з наземними рослинами (Markham, Porter, 1969), виявлено флавоноїди, а згодом

сполуки цього класу знайдені у представників *Cyanophyta*, *Chlorophyta* і *Bacillariophyta*. Донедавна панувала думка, що у мікрободоростей і ціанобактерій відсутні флавоноїди (Iwashina, 2000; Rausher, 2006). Вона ґрунтувалася на невдалих спробах виявити у водоростей генетичні маркери флавоноїдів, а також на тому, що в жодному з кількох секвенованих дотепер геномів мікрободоростей не виявлено відкритих рамок зчитування, гомологічних кодувальним послідовностям ферментів, які беруть участь у біосинтезі флавоноїдів. На цій підставі було висловлено припущення, що поява флавоноїдів і еволюція шляхів їх біосинтезу, ймовірно, відбулися після виходу водоростей на сушу і колонізації ними наземних територій (Rausher, 2006).

Разом з тим накопичуються дані, що засвідчують наявність поліфенольних сполук у мікрободоростей, у тому числі у модельних видів, таких як *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang (Stepanov, Zolotareva, 2015; Jayshree et al., 2016), *Spirulina maxima* (Abd El-Baky et al., 2009), *Euglena gracilis* G.A. Klebs (Cervantes-Garcia et al., 2013, 2016).

Раніше для виявлення поліфенолів використовували лише методи якісної ідентифікації, при цьому кількісні вимірювання не проводили. Наявні дані щодо кількості і складу поліфенольних сполук у мікрободоростей в разі відсутності генетичних маркерів недостатньо переконливі. Результати, отримані сучасними методами ультрависококоефективної рідинної хроматографії в комбінації з мас-спектрометричним аналізом підтверджують наявність поліфенолів і флавоноїдів у різних видах мікрободоростей (Goiris et al., 2014). У таких організмах синтезуються кілька класів флавоноїдів: ізофлавоноїди, флаванони, флавоноли і дигідрохалкони (Klejdus et al., 2010). Результатами дослідження встановлено, що, хоча мікрободорості і є примітивними організмами порівняно з вищими рослинами, вони здатні синтезувати складні фенольні сполуки.

Ідентифікацію і кількісне оцінювання складу фенольних сполук проводили лише в кількох дослідженнях під час аналізу деяких видів мікрободоростей (Abd El-Baky et al., 2008; Klejdus et al., 2010; Goiris et al., 2014). Дослідження, виконані К. Goiris та співавт. (2014), стали проривними (Mouradov, Spangenberg, 2014), оскільки вони проаналізували результати всіх відомих попередників, а саме: ключові проміжні та кінцеві продукти біосинтезу флавоноїдів у представників дивергентних ліній водоростей (*Cyanophyta*, *Rhodophyta*, *Chlorophyta*, *Haptophyta*).

phyta, *Ochrophyta*). Автори встановили, що представники еволюційно віддалених груп мікроводоростей містять широкий діапазон флавоноїдів, склад яких відповідає встановленому для вищих рослин основному шляху їх біосинтезу. Отримані дані вказують на те, що здатність синтезувати флавоноїди виникла у предків сучасних вищих рослин набагато раніше, ніж передбачалося, і вона відповідає таксономічному царству *Plantae*, до якого входять рослини, глаукоцистофіти, червоні та зелені водорості.

Деякі дослідники вважають, що поліфенольні речовини мікроводоростей представлені лише найпростішими сполуками цього ряду — фенолкарбоновими кислотами і наявні в дуже невеликих кількостях. Зазвичай їх вміст не перевищує мінімальний рівень, характерний для наземних рослин (Mouradov, Spangenberg, 2014). Фенолкарбонові кислоти виявлено у представників *Cyanophyta*, *Bacillariophyceae*, *Eustigmatophyceae* і *Chlorophyta* (Miranda et al., 1998; Goiris et al., 2014; Safafar et al., 2015) і *Euglenozoa* (Cervantes-Garcia et al., 2013). Зокрема, у *Spirulina platensis* (Gomont) Geitler, *Anabaena doliolum* Bharadwaja, *Nostoc* sp. і *Cylindrospermum* sp. виявлено протокатехінову, *n*-гідроксibenзойну, ванілінову, бузкову, кавову і хлорогенову кислоти, 4-гідроксibenзальдегід і 4-дигідроксibenзальдегід (Klejdus et al., 2010), у *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Beyerinck), *Haematococcus pluvialis* Flotow, *Diacronema lutheri* (Droop) Bendif & Véron, *Phaeodactylum* sp., *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher і *Porphyridium purpureum* (Bory) KM Drew & R. Ross виявлено гідроксикоричні кислоти (ферулова і *n*-кумарова) (Goiris et al., 2014). Рівень фенольних сполук у *Spirulina platensis* значно зростає (приблизно у 8 раз, $p < 0,01$) за інтенсивного освітлення, причому їх загальна кількість достовірно корелювала з антиоксидантною активністю, а це дає підставу припустити, що фенольні сполуки разом з іншими метаболітами (Mukhaileenko et al., 2004) роблять значний внесок в антиоксидантний захист мікроводоростей під час зміни умов існування (Abd El-Baky et al., 2008).

У ранніх дослідженнях були отримані результати, що засвідчують наявність у мікроводоростей складніших поліфенольних сполук — флавоноїдів. А.Д. Вігч та співавт. (1953) описали перетворення флавонолу кверцетину на ізорамнетин у зеленої мікроводорості *Chlamydomonas eugametos* Moewus, в якій він функціонує як статевий гормон. Пізніше К.Р. Маркхам і Л.Дж. Портер

(1969) повідомили про наявність флавоноїдів у *Nittela hooker* A. Braun, в якій виявили кілька похідних апігеніну і лютеоліну — вітексин, орієтин і люценін. Згідно з подальшими дослідженнями, у мікроводоростей синтезуються ізофлавоноли, флаванони, флавоноли і дигідрофлавоноли (Klejdus et al., 2010). У результаті аналізу загального вмісту фенолів і флавоноїдів у зелених одноклітинних водоростей *Chlorella vulgaris* і *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang встановлено, що в метанольних екстрактах *C. vulgaris* міститься 220 мг-екв галової кислоти і 131,15 мг-екв кверцетину, а в екстрактах *C. reinhardtii* — 150 і 80,76 мг-екв відповідно (Jayshree et al., 2016). Ці дані підтверджують припущення про існування фенілпропанового шляху біосинтезу флавоноїдів у *C. reinhardtii* (May et al., 2008).

Наявність фенолів у мікроводоростей залежить від складу середовища і умов вирощування. Так, накопичення фенолів у клітинах *Spirulina maxima* зростала в разі додавання у середовище Заррука додаткової кількості нітрату натрію та (або) фенілаланіну (Abd El-Baky et al., 2009). За наявності цих добавок загальна кількість фенолів у культурі значно збільшувалася, як і антиоксидантна ефективність екстрактів спіруліни, що містять поліфеноли. Зростає і ступінь інгібування індукваного чотирихлористим вуглецем пероксидного окиснення ліпідів у гомогенаті печінки щурів при обробці останнього поліфенолами спіруліни. Їх захисний потенціал порівняли з потенціалом стандартних фенольних антиоксидантів (бутильованого гідрокситолуолу і α -токоферолу, причому значення I_{50} варіювали від 23,22 до 35,62 мкг/мл).

За використання методу ВЕРХ встановлено, що в усіх фенольних екстрактах спіруліни наявна значна частка фенол-карбонових кислот і флавоноїдів у різних кількостях. У цих екстрактах виявлено галову, хлорогенову, коричну, *n*-ОН бензойну кислоти і піностробін (Babić et al., 2016). Прості феноли і гідроксикоричні кислоти (ферулова і *n*-кумарова) знайдено у мікроводоростей *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Diatrypa lutheri*, *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin, *Tetraselmis suecica* і *Porphyridium purpureum* (Goiris et al., 2014).

У працях із вивчення впливу УФ-опромінення на клітини *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) (Kováčik et al., 2010) зазначено вміст у них флавонолів кверцетину 2—4 мкг/г і кемпферолу 4—7 мкг/г. У дослідженні антиоксидантних реакцій діатомової водорості *Phaeodactylum tricornerutum* в умовах Cu-індукованого окиснювального стресу (Rico et al., 2013) вміст

флавонолів кверцетину, рутину і мірицетину становив 5,3; 12,9 і 56,1 нг · 10¹⁰ кл. відповідно. За підвищення концентрації іонів Cu²⁺ у середовищі вирощування до 790 нмоль/л вміст рутину зростає більш ніж у 3 рази, мірицитину — понад 2 рази, а вміст кверцетину — майже вдвічі.

У вищенаведених дослідженнях використовували метод ВЕРХ з ультрафіолетовим детектором, який не дає змоги точно ідентифікувати флавоноїди, особливо за низьких концентрацій. Більш високий ступінь ідентифікації сполук досягається за умови використання ультра-ВЕРХ і двовимірної мас-спектрометрії. Із застосуванням сучасних методів (Klejdus et al., 2010) доведено наявність ізофлавонів (наприклад, даїдзетину, геністеїну та їх похідних у концентраціях нанограм на грам біомаси сухої речовини) в макроводоростях *Undaria*, *Sargassum*, *Chondrus*, ціанобактеріях *Nostoc* і мікроводоростях *Spongiochloris*, *Scenedesmus* (*Chlorophyceae*).

Раніше вважали, що водорості та ціанобактерії не містять ферментів, необхідних для синтезу флавоноїдів. В останні роки у мікро- і макроводоростей вдалося виявити гомологи генів біосинтезу флавоноїдів, у тому числі гени халконізомерази й ізофлавонон редуктази у *Chlamydomonas reinhardtii* (May et al., 2008), 4-дегідро-кемпферолредуктази і нарингенінхалконсинтази у *Phaeodactylum* (Bowler et al., 2008), халконізомерази і дегідрофлавонолредуктази у *Ectocarpus* (Cock et al., 2010). При цьому в геномах водоростей не виявили гени інших важливих ферментів — флавонол-3-гідроксилази або флавонолсинтази. Залишається не з'ясованим, чи справді виявлені гомологи беруть участь у біосинтезі флавоноїдів мікроводоростей. Так, раніше знайдені у грибків і бактерій гомологи генів синтезу флавоноїдів не залучені до їх метаболізму, а найімовірніше задіяні в біосинтезі жирних кислот (Ngaki et al., 2012).

На основі ідентифікації проміжних і кінцевих продуктів був запропонований ймовірний шлях біосинтезу флавоноїдів у еволюційно віддалених видів мікроводоростей *Diacronema lutheri* і *Haematococcus pluvialis*, який багато в чому подібний до шляху вищих рослин (Goiris et al., 2014). На думку авторів дослідження, в мікроводоростей мають бути наявні гени, що кодують ферменти біосинтезу флавоноїдів, які досі не виявлено. Крім того, поява флавоноїдів у різних мікроводоростей і ціанобактерій дає підставу припустити, що їх спільний предок містив генетичний код основних етапів біосинтезу флаво-

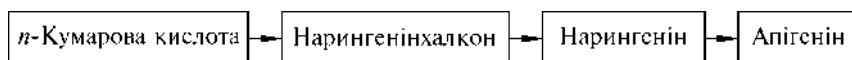


Рис. 10.3. Схема біосинтезу флавоноїдів у *Arthrospira platensis* за даними метаболоміки (Goiris et al., 2014)

ноїдів. Згідно з даними метаболоміки, у клітинах ціанобактерії *Arthrospira platensis* наявна *n*-кумарова кислота, яка поетапно трансформується в нарингенінхалкони, нарингенін і апігенін (рис. 10.3). Інших флавоноїдів в її клітинах автори не виявили. Початкові стадії біосинтезу флавоноїдів були однаковими у всіх вивчених представників дивергентних ліній водоростей (*Rhodophyta*, *Chlorophyta*, *Haptophyta*, *Ochrophyta*).

У водоростей *Diacronema lutheri*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Porphyridium purpureum*, *Haematococcus pluvialis* і *Chlorella vulgaris* апігенін трансформується в лютеолін, нарингенінхалкон послідовно — в ліквіритигенін і даїдзеїн. Наявність незначних кількостей ліквіритигеніну і даїдзеїну зафіксовано також у культурі *Tetraselmis suecica* (Goiris et al., 2014). Утворення дигідрохалкону флоретіну з нарингенінхалкону встановлено лише у *Diacronema lutheri*. Ізофлавоон геністин синтезується з нарингеніну в клітинах *Phaeodactylum tricornerutum*, *Porphyridium purpureum*, *Haematococcus pluvialis* і *Chlorella vulgaris* (Goiris et al., 2014).

У клітинах *Diacronema lutheri*, *Porphyridium purpureum*, *Haematococcus pluvialis* і *Chlorella vulgaris* флавонолкверцетин утворюється в результаті послідовних перетворень: нарингенін → дигідрокемпферол (аромадедрин) → дигідрокверцетин (так сифолін) → кверцетин. Накопичення флавонолу кемпферолу знайдено у *H. pluvialis* і в незначних кількостях — у *D. lutheri*.

Серед вивчених мікроводоростей найвищу різноманітність флавоноїдів виявлено у представника гаптофітових водоростей — *Diacronema lutheri* і мікроскопічної зеленої водорості *Haematococcus pluvialis*.

Наявні дані дають підставу для висновку про те, що процес біосинтезу флавоноїдів у мікроводоростей менш складний, ніж у вищих рослин, хоча за різноманітністю вони не поступаються представникам *Bryophyta*. У табл. 10.1 (див. с. 174—179) наведено дані щодо вмісту флавоноїдів у різних видів мікроводоростей.

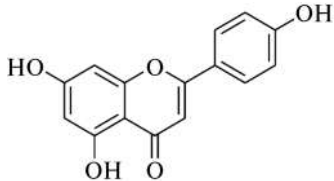
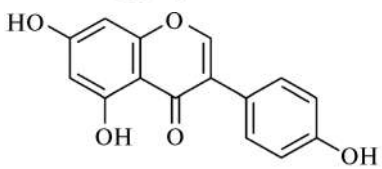
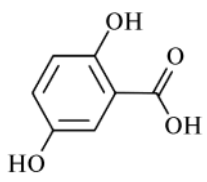
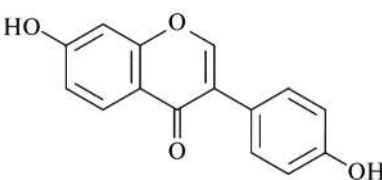
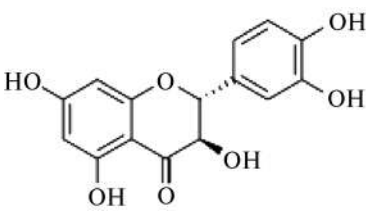
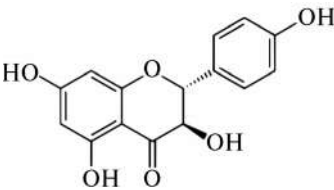
10.3. Роль поліфенолів у захисті мікробіот від токсичного впливу важких металів

Атоми металів заліза, міді, хрому, ванадію і кобальту здатні приймати або віддавати електрони, тобто відновлюватися і окиснюватися. Ці процеси прискорюють утворення вільних радикалів і АФК. Наявність навіть слідів важких металів у біологічних системах у вільній формі, не зв'язаних у білковому або іншому захисному комплексі, може значно підвищити рівень окисного стресу. Вважають, що ці метали індують реакції Фентона і Хабера—Вейсса, в результаті утворюються високоактивні гідроксильні радикали, здатні модифікувати амінокислоти і спричинювати агрегацію або деградацію білків. Токсична дія цих металів на живі клітини може бути зменшена внаслідок їх зв'язування з екзометаболітами (Koukal et al., 2007; Wang et al., 2014; Шнюкова, Золотарьова, 2015, 2017). За наявності важких металів деякі мікробіоти виділяють поліфенольні сполуки, гідроксильні та карбоксильні групи яких беруть участь у хелатуванні агресивних іонних форм металів (Muzafarov et al., 1986; Winkel-Shirley, 2002). Таким чином, екскреція фенолів, що діють як хелатори, є механізмом детоксикації та захисту водоростей (Wang et al., 2009) від шкідливої дії важких металів.

Міцність зв'язування важких металів залежить від ступеня окиснення фенілпропанового кільця (Sukhorukov et al., 1983; Muzafarov, Zolotareva, 1989). Проведено лише кілька досліджень індукції накопичення поліфенолів у мікробіот, що було спричинено наявністю стресових кількостей цих металів (Cirulis et al., 2013). У більшості досліджень з вирощування мікробіот за високих концентрацій зазначених металів основну увагу приділяли стійкості їх клітин до стресу і потенційному зв'язуванню важких металів як механізму біоремедіації забруднених ними екосистем (Levy et al., 2008; Imani et al., 2011). Лише в небагатьох дослідженнях ставили завдання ідентифікувати поліфеноли і оцінити їх роль в метаболізмі водоростей, що росли у стресових умовах (Onofrejevová et al., 2010).

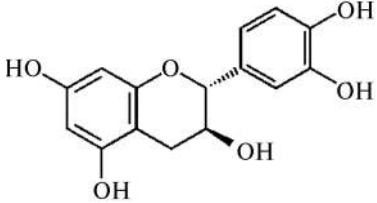
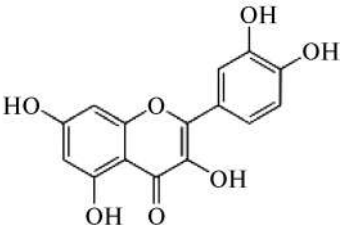
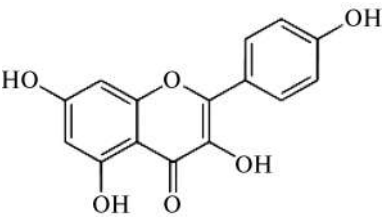
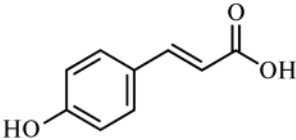
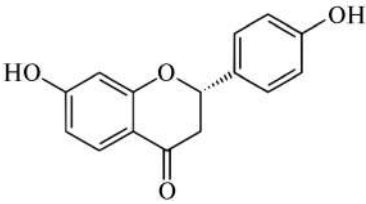
Abd El-Baky та співавт. (2008) вивчали вплив умов культивування на склад фенолів *Spirulina maxima*. Встановлено, що кількість поліфенолів у клітинах залежить від концентрації азоту (NaNO_3) і *L*-фенілаланіну в середовищі культивування. J. Worms та співавт. (2006) дійшли висновку, що водорості здатні регулювати внутрішньоклітинне зв'язування або хелатування слідів ме-

Таблиця 10.1. Флавоноїди

Флавоноїд	Структурна формула	Систематична назва
Апігенін		5,7-Дигідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-4Н-1-хромен-4-он
Геністин		5,7-Дигідрокси-3-(4-гідроксифеніл) хромен-4-он
Гентизинова кислота		2,5-Дигідроксибензойна кислота
Даїдзеїн		7-Гідрокси-3-(4-гідроксифеніл)-4Н-хромен-4-он
Дигідрокверцетин (таксифолін)		(2R, 3R)-2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-2,3-дигідрохромен-4-он
Дигідрокемпферол (аромадерин)		(2R, 3R)-3,5,7-тригідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-2,3-дигідрохромен-4-он

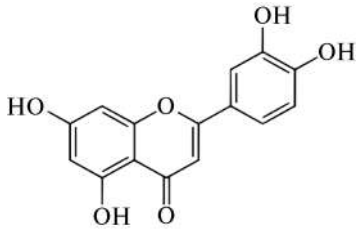
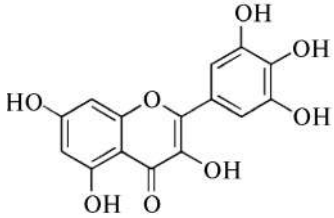
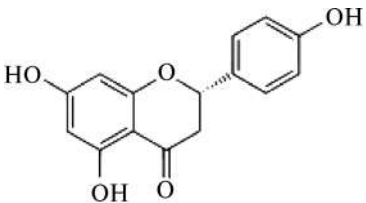
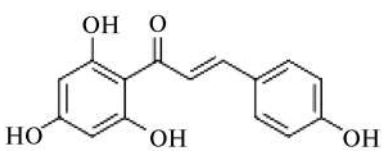
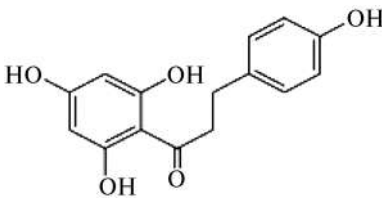
мікробіодоростей

Клас флавоноїдів	Види мікробіодоростей
Флавоон	<i>Arthrospira platensis</i> , <i>Diacronema lutheri</i> , <i>Phaeodactylum tricor- nutum</i> , <i>Porphyridium purpureum</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Tetraselmis suecica</i> (Goiris et al., 2014), <i>Nittela hookeri</i> (Markham, Porter, 1969)
Ізофлавоон	<i>P. tricor- nutum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> (Goiris et al., 2014), <i>Spirulina maxima</i> (Abd El-Baky et al., 2009), <i>Spongiochloris spongiosa</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Nostoc 17</i> (Klejdus et al., 2010)
Фенол-карбо- нова кислота	<i>Dunaliella tertiolecta</i> (López et al., 2015), <i>Phaeodactylum tri- cornutum</i> (Rico et al., 2013)
Ізофлавоон	<i>D. lutheri</i> , <i>P. tricor- nutum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>T. suecica</i> (Goiris et al., 2014), <i>S. spongiosa</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Nostoc 17</i> (Klejdus et al., 2010)
Флаванонол	<i>D. lutheri</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>H. pluvialis</i> (Goiris et al., 2014)
Флаванонол	<i>D. lutheri</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> (Goiris et al., 2014)

Флавоноїд	Структурна формула	Систематична назва
Катехін		(2R, 3S)-2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2H-хромен-3,5,7-триол
Кверцетин		2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-три-гідрокси-4H-хромен-4-он (3,3',4',5,7-пентан-гідроксифлавонол)
Кемпферол		3,5,7-тригідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-4H-хромен-4-он
<i>n</i> -Кумарова кислота (4-гідрокси-корична кислота)		(E)-3-(4-гідроксифеніл)-2-пропенова кислота
Ліквіритигенін		(2S)-7-гідрокси-2-(4-гідроксифеніл)-2,3-дигідро-4H-хроман-4-он

Продовження табл. 10.1

Клас флавоноїдів	Види мікробіодоростей
Флаван-3-ол	<i>P. tricornutum</i> (Ricoet et al., 2013, Santana-Casiano et al., 2014), <i>D. tertiolecta</i> (López et al., 2015)
Флавонол	<i>D. lutheri</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> (Goiris et al., 2014), <i>Phormidium M1</i> (Babić et al., 2016), <i>C. vulgaris</i> , <i>Euglena gracilis</i> (Cervantes-Garcia et al., 2013), <i>Spirulina maxima</i> (Abd El-Baky et al., 2008), <i>Scenedesmus quadricauda</i> (Kováčik et al., 2010), <i>P. tricornutum</i> (Rico et al., 2013)
Флавонол	<i>D. lutheri</i> , <i>H. pluvialis</i> (Goiris et al., 2014), <i>Nostoc M1</i> , <i>Anabaena M2</i> (Babić et al., 2016), <i>E. gracilis</i> (Cervantes-Garcia et al., 2013), <i>S. maxima</i> (Abd El-Baky et al., 2008), <i>S. quadricauda</i> (Kováčik et al., 2010)
Фенолкарбонова кислота	<i>A. platensis</i> , <i>D. lutheri</i> , <i>P. tricornutum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>T. suecica</i> (Goiris et al., 2014), <i>D. tertiolecta</i> (López et al., 2015), <i>E. gracilis</i> (Cervantes-Garcia et al., 2013), <i>S. maxima</i> (Abd El-Baky et al., 2008), <i>S. quadricauda</i> (Kováčik et al., 2010), <i>Spongiochloris spongiosa</i> (Onofrejšová et al., 2010)
Флаванон	<i>D. lutheri</i> , <i>P. tricornutum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>T. suecica</i> (Goiris et al., 2014)

Флавоноїд	Структурна формула	Систематична назва
Лютеолін		2-(3,4-дигідроксифеніл)-5,7-дигідрокси-4-хроменон
Мірицетин		3,3',4',5',5,7-Гексагідрокси-2-фенілхроман-4-он
Нарингенін		5,7-Дигідрокси-2-(4-гідроксифеніл)хроман-4-он
Нарингенінхалкон		(E)-3-(4-гідроксифеніл)-1-(2,4,6-тригідроксифеніл)проп-2-ен-1-он
Флоретин		3-(4-гідроксифеніл)-1-(2,4,6-тригідроксифеніл)пропан-1-он

Закінчення табл. 10.1

Клас флавоноїдів	Види мікробіот
Флавоон	<i>D. lutheri</i> , <i>P. tricornutum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> (Goiris et al., 2014), <i>N. hookeri</i> (Markham, Porter, 1969)
Флавонол	<i>P. tricornutum</i> (Rico et al., 2013), <i>D. tertiolecta</i> (López et al., 2015)
Флаванон	<i>A. platensis</i> , <i>D. lutheri</i> , <i>P. tricornutum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>T. suecica</i> (Goiris et al., 2014), <i>E. gracilis</i> (Cervantes-Garcia et al., 2013)
Халконоїд	<i>A. platensis</i> , <i>D. lutheri</i> , <i>P. tricornutum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>T. suecica</i> (Goiris et al., 2014)
Дигідроалкон	<i>D. lutheri</i> (Goiris et al., 2014)

талів, в результаті чого зменшується токсичність іонів важких металів. Кілька класів внутрішньоклітинних хелаторів, у тому числі поліфеноли, беруть участь в утворенні внутрішньоклітинних комплексів і захисті клітин.

Під час вивчення впливу важких металів на вміст поліфенольних сполук в екстрактах і ексудатах зеленої водорості *Dunaliella tertiolecta* (López et al., 2015) встановлено, що за наявності сублетальної концентрації іонів міді в середовищі ($[Cu(II)] = 790 \text{ нМ}$) швидкість росту в перші доби культивування знижувалася більш ніж удвічі, потім вона поступово підвищувалася. На думку вчених, це пов'язано з вивільненням органічних лігандів фенольної природи, здатних зв'язувати іони металів у середовищі й зменшувати їх токсичну дію. Клітини *D. tertiolecta* під впливом високих концентрацій міді виділяли в 1,4 раза більше поліфенолів у перерахунку на клітину порівняно з контролем. Найпомітнішими фенольними сполуками у клітинних екстрактах були 2,5-дигідроксibenзойна кислота, (+)катехін і (-)епікатехін. Мабуть, чим вища концентрація цих сполук, тим сильніша антиоксидантна активність клітин і ексудату культури *D. tertiolecta*. За умови повільного добавляння міді $Cu(II)$ до клітин *D. Tertiolecta* зростала їх стійкість до важких металів. За високих концентрацій міді внутрішньоклітинний вміст поліфенолів зменшувався, що дає підставу вважати виведення більшої частини фенолів з організму захисним механізмом, який забезпечує позаклітинне зв'язування важких металів.

Досліджено здатність органічних лігандів до формування комплексів з $Fe(III)$ і подальшою трансформацією його в біодоступні види $Fe(II)$ у морській воді (Rose, Waite, 2003). Наявність природних ексудатів поліфенольної природи уповільнювало окиснення $Fe(II)$ (González, Santana-Casiano, 2012). Генітинову кислоту, (+)катехін і (-)епікатехін, найвідоміші фенольні сполуки, виявлено в екстрактах водоростей, вони мали високу антиоксидантну активність (López et al., 2015). Фенольні сполуки, що виділяються з мікрowodоростей, такі як синапінова кислота і (+)катехін, впливали на окисно-відновні реакції за участю заліза підтриманням відновленого стану іонів заліза $Fe(II)$ (Santana-Casiano et al., 2014).

Відома здатність евкаріотичної джгутикової мікрowodорості *Euglena gracilis* акумулювати важкі метали. Вона легко адаптується до наявності в середовищі значної їх кількості, в неї виробилося безліч механізмів, які дають змогу впоратися з цією

токсичністю, у тому числі утворити і накопичити кон'югати фітохелатину, глутатіону, проліну і біоплівок (Rodriguez-Zavala et al., 2007; Cervantes-Garcia et al., 2013, 2016). Крім того, *E. gracilis* синтезує значні кількості біологічно активних сполук з антиоксидантною активністю (Mokrosnop et al., 2016), що сприяє захисту клітин від АФК, які утворюються під впливом важких металів. Вміст фенолкарбонових кислот і флавоноїдів значно зростає за наявності іонів міді або кадмію. Згідно з літературними даними (Cervantes-Garcia et al., 2013, 2016), в детоксикації важких металів беруть участь ферулова і хлорогенова кислоти, кверцетин і кемпферол.

Рівень поглинання вільних металів з водного середовища клітинами *Euglena gracilis* перевищує сорбційний потенціал раніше вивчених водоростей (Winters et al., 2017). Зокрема, клітини *E. gracilis* мають велику сорбційну ємність для міді та поглинають її як в однокомпонентних, так і селективно в бінарних розчинах, що містять нікель. З урахуванням таких характеристик *E. gracilis* використовують як модельний організм для екотоксикологічного оцінювання водного середовища (Azizullah et al., 2013). Біохімічні механізми стійкості *E. gracilis* до важких металів вже досліджено, але вплив потенційно токсичних елементів (наприклад, Cu^{2+}) на біосинтез фенольних сполук залишається недостатньо вивченим.

Наявні дані дають підставу вважати фенольні речовини, що містяться в мікроборостях, компонентами антиоксидантної системи захисту. Незважаючи на те що загальний вміст поліфенольних сполук у мікроборостях незначний, їх кількість у біомасі збільшується за інтенсивного освітлення, впливу УФ-опроміювання, підвищення температури, змінення складу живильного середовища і за наявності важких металів (Duval et al., 1999; Colla et al., 2007; Kováčik et al., 2010; de Souza et al., 2015), вони відіграють важливу роль в адаптативній захисній реакції на оксидативний стрес.

Макроскопічні водорості доволі багаті на поліфенольні сполуки з чітко вираженою антиоксидантною активністю, яка у цих речовин істотно залежить від кількості, положення гідроксильних груп і замісників в ароматичних кільцях. Це означає широкий спектр протизапальних, антиоксидантних, антимікробних і протиракових властивостей окремих поліфенолів. Незначний вміст поліфенольних сполук у мікроборостей забезпечує комплексну систему хімічного захисту цих

організмів, що можна використовувати при розробці нових препаратів і продуктів з потенційною терапевтичною активністю. Саме поява поліфенольних сполук, які захистили рослинні клітини від УФ-опромінювання та інших несприятливих чинників, сприяла колонізації земної поверхні судинними рослинами майже 500 млн років тому. Метаболічна пластичність поліфенолів мала вирішальне значення для адаптації ранніх наземних рослин до нових місць зростання. Вивчення поліфенольних сполук водоростей як більш примітивних організмів дає змогу розширити уявлення про походження біосинтезу флавоноїдів і біохімічних трансформацій, пов'язаних з виходом рослин на сушу. Останніми роками доведено наявність відносно широкої групи поліфенольних сполук, до якої входять флавоноїди, у різних мікрowodоростей і ціанобактерій, що дає підстави припустити, що їх загальний предок уже містив генетичний код для забезпечення основних етапів біосинтезу флавоноїдів.

МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ

Антиоксиданти є молекулами-відновниками, які віддають електрони вільним радикалам, тим самим стабілізують їх і мінімізують імовірність ушкодження ключових біомолекул клітин. Антиоксиданти включають такі сполуки: поліфеноли, флавоноїди, вітаміни та ензими. Відомо, що антиоксидантні молекули мають оздоровлювальний ефект на організм людини: знижують ризик розвитку раку, серцево-судинних захворювань і нейродегенеративних розладів. Основним джерелом природних антиоксидантів є рослини і водорості. Підвищена ймовірність генерації АФК у клітинах фотосинтезуючих організмів пов'язана з передачею надлишку енергії збуджених світлом молекул хлорофілу молекулам $^3\text{O}_2$ з наступним утворенням синглетного кисню $^1\text{O}_2$. Головне джерело АФК у рослин — електронтранспортний ланцюг хлоропластів, крім того, активність НАДФН-оксидаз плазматичних мембран і пероксидаз. Широкий спектр вторинних сполук, які рослини синтезують, здатні генерувати $^1\text{O}_2$ на світлі. Для захисту від АФК клітини рослин синтезують різноманітні антиоксидантні молекули, до яких належать *L*-аскорбінова кислота, глутатіон, каротиноїди, токохроманолі, фенольні антиоксиданти. Культивування мікроводоростей з метою отримання збагаченої на антиоксиданти біомаси набуває дедалі більшого розвитку в передових країнах світу. Розроблення нових і удосконалення вже існуючих методів визначення антиоксидантної активності — актуальне завдання фармації, косметичної та харчової промисловості. Спектрофотометричні методи аналізу є одними з найзастосовуваніших. Нижче наведено спектрофотометричні методи для визначення антиоксидантної активності екстрактів рослинного походження.

Підготовка рослинного екстракту для визначення антиоксидантної активності залежить від того, антиоксиданти якої групи аналізуються: неферментної чи ферментної. Неферментні анти-

оксиданти екстрагують з наважки водоростей (10 г) одним із розчинників — петролейним естером, ацетоном, метанолом, водою (100—200 мл). Екстракцію ацетоном і метанолом проводять із перемішуванням за 25 °С протягом 24 год доти, доки екстракційний матеріал не буде знебарвленим, після чого його відфільтровують, а розчинник видаляють з використанням роторного випаровувача. Екстракт висушують добу за температури вище 60 °С.

Екстракція та очищення антиоксидантних ензимів із рослинного матеріалу потребує дотримання умов, за яких зберігається їхня каталітична активність. Для виділення якомога більшої кількості ензимів потрібно досить ретельно подрібнити вихідний матеріал, аж до порушення цілісності субклітинних структур, уникати умов, за яких можлива денатурація білка, підтримувати низьку температуру на всіх етапах виділення і очищення та вносити захисні добавки, зокрема SH-вмісні сполуки (меркаптоетанол, цистеїн, глутатіон та ін.). Підготовка клітин мікробіологічної *Euglena gracilis* до аналізу активності антиоксидантних ензимів може бути такою. Наважку з водоростей ресуспендують у охолодженому натрій-фосфатному буфері (рН 7,0) і піддають дії ультразвуку на 5 хв для руйнування клітин та виходу з них вмісту. Клітинні залишки відділяють центрифугуванням з 12 000 об/хв упродовж 20 хв за температури не вище 4 °С (Li et al., 2014). Супернатант застосовують у дослідженні ферментативної активності.

11.1. Дослідження антиоксидантної активності за здатністю до відновлення ДФПГ[•]

Метод оцінювання антиоксидантної активності з використанням 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразильного радикала (ДФПГ[•]) є одним із найбільш широко застосовуваних через його простоту, точність та комерційну доступність. ДФПГ[•] приєднує гідроген антиоксидантних молекул, внаслідок чого відновлюється до ДФПГ. Кількість ДФПГ[•] оцінюють спектрофотометрично, оскільки радикал пурпурного кольору і має максимальне значення поглинання при $\lambda = 517$ нм. Зниження інтенсивності поглинання за цих умов засвідчує антиоксидантну активність зразка, в результаті якої формується ДФПГ жовтого кольору. Інтенсивність сигналу ДФПГ[•] оберненозалежна від концентрації антиоксидантів і тривалості реакції. Тривалість відновлення ДФПГ[•] різними

антиоксидантами і кількість відновлених одним антиоксидантом ДФПГ[•] істотно відрізняються. В перші хвилини повністю реагують з ДФПГ[•] аскорбінова та ізоаскорбінова кислоти, тоді як токоферол через 30 хв інкубації. Кінетика реакції ДФПГ[•] з антиоксидантами не є лінійною, що завдає певних труднощів з визначенням EC₅₀ (Brand-Williamsetal, 1995; MacDonald-Wicksetal, 2006; Moon, Shibamoto, 2009).

Наважку (0,3 мг) рослинного матеріалу екстрагують 1 мл 50%-го метанолу (v/v). Екстракт використовують для створення серії зразків з різним його кількісним вмістом. ДФПГ[•] розчиняють у метанолі до концентрації 0,1 мМ одразу перед використанням, при цьому запобігають дії на нього світла. Проба для дослідження містить 0,45 мл 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 мл екстракту та 1 мл 0,1 мМ ДФПГ. Розчин інкубують у темряві продовж 30 хв за кімнатної температури, після чого вимірюють поглинання при $\lambda = 517$ нм. Контроль не містить екстракту, але інкубується як і зразок. Антиоксидантну активність зразка виражають у відсотках відновлених ДФПГ[•]:

$$\text{Відновлені ДФПГ}^{\bullet} = [(A_0 - A)/A_0] \cdot 100 \%,$$

де A_0 — поглинання контрольного зразка; A — поглинання дослідного зразка. Як стандарт можна використовувати широкий спектр антиоксидантів (аскорбінова кислота, α -токоферол та ін.) (Pillai et al., 2019).

11.2. Дослідження антиоксидантної активності за здатністю до відновлення катіонів заліза(III)

Антиоксидантний тест на залізовідновлювальну активність включає методи, в яких антиоксиданти є відновниками у редокс-залежній колориметричній реакції, що супроводжується відновленням Fe³⁺ до Fe²⁺.

Метод з використанням трипіридилтриазину (C₁₈H₁₂N₆), який базується на відновленні комплексів, утворених при взаємодії 2,4,6-трипіридил-*s*-триазину із FeCl₃ · 6H₂O, наявними у розчині антиоксидантами з наступним формуванням залізовмісних комплексів синього кольору. Метод має обмеження у застосуванні, оскільки ключова реакція відбувається за нефізіологічного значення pH (3,6). Повільно реагуючі, поліфенольні сполуки і тіолцим методом, як правило, не визначають (Benzie, Strain, 1996; Halvorsen et al., 2002; Sochor et al., 2010). Реагент готують із роз-

чинів: а) 300 мМ ацетатного буфера (рН 3,6); б) 10 мМ 2,4,6-трипіридил-*s*-триазину у 40 мМ НСІ; в) 20 мМ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Розчини змішують за пропорцією 10(а):1(б):1(в) (v/v/v) та нагрівають цей реагент до температури 37 °С (розчин може зберігатись при 4 °С у темряві до 7 діб). Спочатку оцінюють поглинання (A_0) реагенту без екстракту на $\lambda = 593$ нм. Екстракт додають до реагенту у відношенні 1:34 (v/v) та вимірюють поглинання розчину через 4 хв інкубації (А). За різницею у поглинанні розчинів A_0 та А ($\Delta A_{593\text{нм}}$) по відношенню до стандарту $\Delta A_{593\text{нм}}$ оцінюють антиоксидантну активність екстракту. Сіль $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ у діапазоні 100—1000 мкМ/л використовують як стандарт. Результат дослідження виражається у мілімолях еквівалентів заліза на 100 г маси речовини зразка (Benzie, Strain, 1996).

Метод з використанням *N,N'*-диметил-*p*-фенілендіаміну ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2$) (ДМФД) ґрунтується на здатності цієї сполуки перетворюватись на відносно стабільну і забарвлену катіонрадикальну форму (ДМФД $^{\cdot+}$) за наявності $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Антиоксиданти пропорційно своїй кількості знебарвлюють розчин з ДМФД $^{\cdot+}$, віддаючи атоми гідрогену на їх відновлення. Метод застосовують для аналізу гідрофільних антиоксидантних сполук (Fogliano et al., 1999; Sochor et al., 2010; Koksal et al., 2011).

Для аналізу готують розчин 100 мМ ДМФД (209 мг ДМФД у 10 мл дистилляту), який вносять у кількості 1 мл в 0,1 М ацетатний буфер (рН 5,25) об'ємом 100 мл. Для формування забарвленого ДМФД $^{\cdot+}$ до розчину доливають 0,2 мл 0,05 М розчину $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Поглинання приготуваної реакційної суміші без екстракту оцінюють при $\lambda = 505$ нм, таким чином фіксуючи максимальне значення. Екстракт об'ємом 50 мкл вводять у розчин та інкубують, перемішуючи за температури 25 °С продовж 10 хв, після чого знову вимірюють поглинання зразка. Ступінь знебарвлення розчину з екстрактом відображає його антиоксидантну активність. Як стандарт можна використовувати тролокс, який лінійно зменшує поглинання розчину в діапазоні концентрацій 0,2—11,0 мкг на пробу (Fogliano et al., 1999).

Метод з використанням гексаціаноферату(III)калію ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) базується на прямому відновленні антиоксидантами $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_3$ до $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$. В реакції з вільним Fe^{3+} $\text{Fe}[(\text{CN})_6]_2$ утворює комплекс $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, який має синій колір і пік поглинання при $\lambda = 700$ нм. Таким чином, чим більшим є погли-

нання розчину, тим більше його відновна здатність (Koksal et al., 2011; Khan et al., 2013; Gulcin, 2015).

Для аналізу готують 0,2 М натрій-фосфатний буфер (рН 6,6) і 1%-й розчин $K_3[Fe(CN)_6]$. По 1 мл кожного з розчинів вміщують у пробірку і додають 0,75 мл екстракту. Суміш інкубують продовж 20 хв за 50 °С до завершення реакції, після чого доливають 1 мл 10%-ї трихлороцтової кислоти. Зразки центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хв. Відбирають 1,8 мл супернатанту і змішують його з 1,8 мл дистилату та 0,25 мл 0,1%-го $FeCl_3$. Оптичне поглинання зразка вимірюють на $\lambda = 700$ нм проти контролю, в якому екстракт замінено на відповідний об'єм дистилату. Стандартом у досліді можна використовувати аскорбінову кислоту, тролокс, α -токоферол та ін. (Koksal et al., 2011; Khan et al., 2013).

11.3. Фосфомолібденовий метод визначення антиоксидантної активності

Метод оснований на здатності антиоксидантних молекул відновлювати Mo^{6+} до Mo^{5+} із наступним формуванням комплексу зеленого кольору фосфат/ Mo^{5+} за кислого рН. Метод застосовують для визначення загальної антиоксидантної активності екстрактів, які можна готувати з використанням різноманітних розчинників: води, метанолу, етанолу, гексану, диметилсульфоксиду (Prieto et al., 1999; Torey, 2010).

Для аналізу готують реагент, який містить 0,6 М сульфатної кислоти, 28 мМ фосфату натрію та 4 мМ молібдату амонію $((NH_4)_2MoO_4)$. Екстракт до реагенту додають у співвідношенні 1:10 (v/v), закривають пробірку та інкубують за 95 °С продовж 90 хв. Після інкубації зразки охолоджують до 25 °С і вимірюють поглинання розчинів на $\lambda = 695$ нм порівняно з контролем, що замість екстракту містить відповідний об'єм чистого розчинника та інкубувався як і дослідний зразок. Загальну антиоксидантну здатність екстракту можна виразити у мікрограмах еквівалентів α -токоферолу для жиророзчинних антиоксидантів, аскорбінової кислоти для водорозчинних або за формулою

$$\text{Загальна антиоксидантна активність} = [(A_0 - A)/A_0] \cdot 100 \%,$$

де A_0 — поглинання контрольного зразка; A — поглинання дослідного зразка (Prieto et al., 1999; Jan et al., 2013).

11.4. Визначення антиоксидантної активності з використанням АБТС

Відновлення антиоксидантами синтетичного хромофору у вигляді катіонрадикала АБТС⁺ до АБТС супроводжується знебарвленням реакційного розчину. Метод дає змогу визначати водорозчинні та жиророзчинні антиоксиданти: аскорбінову кислоту, токофероли, флавоноїди, антоціанідини, каротиноїди та ін. Як розчинник частіше використовують етанол або воду, а тролокс застосовують як стандарт.

АБТС⁺ отримують у реакційній суміші, яка містить 2,45 мМ K₂S₂O₈(O₂) у 7 мМ АБТС, після темної інкубації за кімнатної температури продовж 12—16 год (зберігати АБТС⁺ необхідно у темряві за кімнатної температури не більш як 2 доби або при 4 °С до 7 діб). Розчин АБТС розбавляють етанолом або фосфатно-сольовим буфером до значення поглинання розчину $0,7 \pm \pm 0,02$ при $\lambda = 734$ нм за температури 30 °С. До 1,9 мл розбавленого розчину АБТС⁺ добавляють 50 мкл екстракту та оцінюють поглинання проби через 6 хв після змішування за тієї самої температури. Відсотки відновлених катіонрадикалів розраховують за формулою

$$\text{Відновлені АБТС}^+ = [(A_0 - A)/A_0] \cdot 100 \%,$$

де A_0 — поглинання зразка до внесення екстракту; A — поглинання зразка після інкубації з екстрактом. Розчин тролоксу концентрацією 0—15 мкМ, приготований у етанолі або фосфатно-сольовому буферному розчині (рН 7,4), використовують як стандарт. Результат виражається у мікромолях тролоксу в 1 г маси сухої речовини рослинного матеріалу (Re et al., 1999; Li et al., 2008; Zheleva-Dimitrova et al., 2010).

11.5. Визначення загального вмісту фенолів

Метод Фоліна—Чокальтеу, який також називають методом еквівалентності до галової кислоти, використовують для колориметричного визначення фенольних і поліфенольних антиоксидантів. Реактив Фоліна—Чокальтеу містить комплекси фосфорномолібденової (H₃PMo₁₂O₄₀) та фосфорновольфрамової кислот (H₂PW₁₂O₄₀), які утворюють у лужному середовищі за наявності

антиоксидантів хромофори блакитного кольору: оксиди вольфраму (W_8O_{23}) і молібдену (Mo_8O_{23}). Метод не є специфічним для визначення лише фенолів, а й загальної антиоксидантної активності зразка і реагує з тіолами, вітамінами, нуклеотидною основою гуаніном і деякими іншими нітрогенвмісними сполуками (Singleton et al., 1999).

Метанольний екстракт (1 мг/мл) об'ємом 200 мкл змішують із 1 мл реактиву Фоліна—Чокальтеу, заздалегідь розбавленого дистиллятом у співвідношенні 1:10 (v/v). Через 4 хв до розчину доливають 800 мкл Na_2CO_3 (75 г/л). Інкубація зразків триває 2 год за кімнатної температури, після чого вимірюють поглинання розчину при $\lambda = 765$ нм. Галову кислоту використовують для побудови калібрувального графіка (0—500 мг/л). Концентрація фенольних сполук виражається у мікрограмах еквівалентів галової кислоти на 1 мг екстракту і може бути розрахована за відношенням взятого із калібрувального графіка еквіваленту концентрації галової кислоти (мкг) до маси сухої речовини екстракту (мг) (Li et al., 2008; Torg et al., 2010).

11.6. Ксантиноксидазне дослідження антиоксидантної активності

Ксантиноксидаза (ХО; ЕС 1.17.3.2) — молібденвмісна оксидоредуктаза, яка каталізує окиснення гіпоксантину в ксантин і ксантину — в сечову кислоту, при цьому акцептором електронів є O_2 . Каталітична реакція супроводжується утворенням супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$) та гідроген пероксиду (H_2O_2), знешкодження яких антиоксидантами інгібує активність ксантиноксидази.

Антиоксидантну активність екстракту визначають за ступенем інгібування ксантиноксидази і, як наслідок, зниженні кількості утвореної сечової кислоти. Готують розчин ксантину ($C_5H_4N_4O_2$) концентрацією 150 мМ у фосфатному буфері (рН 7,5). Ксантиноксидазу розчиняють у холодному 50 мМ калій-фосфатному буфері (рН 7,5) до концентрації 0,01 ум. од/мл. Пробу для аналізу готують змішуванням 1 мл екстракту, 2,9 мл фосфатного буфера (рН 7,5) та 2 мл розчину ксантину і витримують за температури 25 °С продовж 15 хв. Для ініціації реакції у суміш вносять 0,1 мл розчину ксантиноксидази і знов інкубують за тієї самої температури протягом 30 хв. Реакцію зупиняють

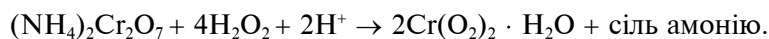
добавлянням 1 н НСІ та вимірюють поглинання розчину за $\lambda = 290$ нм. Алопуринол є неокиснюваним аналогом гіпоксантину, інгібітором ксантиноксидази, тому використовується як позитивний контроль. Для холостої проби розчин ензиму добавляють після внесення 1 н НСІ. Антиоксидантну активність розчину виражають у відсотку інгібованої ксантиноксидази, відповідно до формули

$$\text{Інгібування ксантиноксидази} = (A-B) - (B-G)/(B-G) \cdot 10 \%,$$

де А — вміст ензиму без екстракту; Б — контроль А без екстракту та ензиму; В — вміст екстракту з ензимом; Г — вміст екстракту без ензиму (Maccocci et al., 1994; Tory et al., 2010; Nessa, Khan, 2014).

11.7. Метод визначення антиоксидантної активності з використанням пероксиду хрому

Пероксид хрому (CrO_5) є сильним оксидантом темно-синього кольору і продуктом реакції



Кисле середовище для проведення реакції створюють кислотами H_2SO_4 та HClO_4 — формуються солі амонію сульфату та перхлорату відповідно. При змішуванні продуктів реакції з органічними розчинниками — ізоаміловим спиртом і пропіленкарбонатом — CrO_5 розчиняється в органічній фазі дифазного розчину, а водна фаза містить реагенти. Антиоксиданти, які вносять в органічну фазу, затримують формування синього CrO_5 . За ступенем інгібування забарвлення органічної фази роблять висновок про антиоксидантну активність екстракту (Sochor et al., 2010).

Проба для вимірювання містить 1,2 мл органічного розчинника, 0,4 мл 0,02 М амонію дихромату ($(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), 0,4 мл 0,025 М розчину H_2SO_4 і 0,02 мл екстракту. Довжину хвилі у спектрофотометрі встановлюють $\lambda = 569$ нм за умови використання ізоамілового спирту як органічного розчинника і $\lambda = 566$ нм для пропіленкарбонату. Вимірювання проводять за температури 37°C з інкубацією зразків упродовж 3 хв. Поглинання розчину проби оцінюють спочатку без H_2O_2 , перед другим вимірюванням у розчин вносять 0,02 мл 1,6 М H_2O_2 і злегка його перемішують (ΔA). Холоста проба (A_0) містить 0,02 мл органічного розчинника замість H_2O_2 . Як стандарт використовують 0,1 М розчин α -токофе-

ролу, який також добавляють об'ємом 0,02 мл ($A_{\text{ст}}$). Антиоксидантну активність екстракту оцінюють відносно розчину стандарту в молях на 1 л за формулою

$$[\alpha\text{-Токоферол}] \cdot (\Delta A_0 - \Delta A) / (\Delta A_0 - \Delta A_{\text{ст}}),$$

де $[\alpha\text{-токоферол}]$ — концентрація α -токоферолу (моль/л), що відповідає значенню поглинання проби $A_{\text{ст}}$; ΔA_0 — різниця у поглинанні холостої проби до та після внесення розчинника; ΔA — різниця у поглинанні проби з екстрактом до та після внесення H_2O_2 ; $\Delta A_{\text{ст}}$ — різниця у поглинанні проби зі стандартом до та після внесення H_2O_2 (Charalampidis et al., 2009).

11.8. Активність аскорбатпероксидази

Активність аскорбатпероксидази (APX; EC 1.11.1.11) вимірюється за зменшенням поглинання реакційної суміші при $\lambda = 290$ нм ($\epsilon = 2,80$ М/см), як описано Y. Nakano і K. Asada (1981). Реакційна суміш містить 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,0), 0,5 мМ аскорбату, 0,1 мМ H_2O_2 та 0,1 мМ NaEDTA. Реакцію розпочинають добавлянням екстракту (ензиму) або H_2O_2 до розчину і через 10–30 с реєструють зменшення його поглинання. Варто враховувати невелике, неферментативне окиснення аскорбату H_2O_2 .

11.9. Каталаза

Основною функцією каталази (CAT; EC 1.11.1.6) є розщеплення молекул H_2O_2 на H_2O та O_2 .

За методом H. Aebi (1984), активність каталази вимірюють по відновленню H_2O_2 ($\epsilon = 39,4$ мМ/см) при $\lambda = 240$ нм. Реакція починається з внесення 30 мМ розчину H_2O_2 в 50 мМ фосфатному буфері (рН 7,0) у екстракт з каталазою (2 мл) у кількості 1 мл. Проводити аналіз рекомендують за температури 20 °С, хоча реакція відбувається в діапазоні 0–37 °С. Мірою активності ензиму є різниця в поглинанні (ΔA_{240}) за одиницю часу. Для уникнення інактивації ензиму під час аналізу, зазвичай 30 с, або утворення бульбашок в кюветі через вивільнення O_2 треба використовувати порівняно низьку концентрацію H_2O_2 (10 мМ).

11.10. Активність супероксиддисмутази

Супероксиддисмутаза (СОД; SOD; EC 1.15.1.1) здійснює перетворення високореактивних $O_2^{\cdot -}$ на менш шкідливі H_2O_2 та O_2 . Метод визначення активності цього ензиму за С. Beauchamp і J. Fridovich (1971) оснований на відновленні безбарвної тетразолієвої солі супероксидними аніонрадикалами, при якому відбувається їх перетворення на забарвлені сполуки (формазани). Згідно з методом, як субстрат використовують *n*-нітротетразолій синій (НТС), який реагує з супероксидними аніонами за наявності метіоніну як донора електронів з наступним формуванням фармазану — комплексу синього кольору. Активність СОД у зразку визначається ступенем відновлення супероксидних аніонів, утворених за дії світла на рибофлавін, який добавляють до реакційної суміші. Отже, зменшення кількості $O_2^{\cdot -}$ за дії ензиму ослаблює забарвлення розчину, яке і відображає ферментативну активність.

Інкубаційне середовище для визначення активності СОД містить 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,8), 172 мкМ НТС, 210 мкМ *L*-метіоніну, 24 мкМ рибофлавіну, 0,1 % тритону X-100 і 500 мкл ферментного препарату. Загальний об'єм інкубаційного середовища становить 1 мл. Проби інкубують протягом 30 хв при освітленні флуоресцентними лампами. Постійний світловий режим є важливою умовою перебігу реакції, оскільки кількість

$O_2^{\cdot -}$, що утворюються при опроміненні рибофлавіну, може значно змінюватися при варіації освітленості (Beuer, Fridovich, 1987). Після інкубації вимірюють оптичну густину зразків на $\lambda = 560$ нм. Активність СОД виражають в умовних одиницях на 1 мг білка за 30 хв.

11.11. Глутатіонредуктаза

Глутатіонредуктаза (GR; EC 1.6.4.2) є флавопротеїном і каталізує НАДФН-залежне відновлення дисульфїду глутатіону до глутатіону. Ензим має важливе значення для підтримання рівня глутатіону — відновника в окисно-відновних процесах клітини. Принцип методу, описаного J. Carlberg і В. Mannervik (1985), полягає в спектрофотометричному визначенні ступеня окиснен-

ня НАДФН на $\lambda = 340$ нм ($\epsilon = 6,22$ мМ/см) при 30 °С. Реакційне середовище об'ємом 1 мл містить 1 мМ дисульфиду глутатіону, $0,1$ мМ НАДФН, $0,5$ мМ NaEDTA, $0,1$ М фосфатного буфера (рН $7,6$) та екстракт з ензимом. Реакція ініціюється внесенням ензиму в реакційну суміш. Активність глутатіонредуктази визначається як кількість ензиму, яка каталізує відновлення 1 мкМ НАДФН за 1 хв та виражається в одиницях на 1 мг білка.

11.12. Активність гваяколпероксидази

Активність гваяколпероксидази (GPOX; EC 1.11.1.7) відображає загальну пероксидазну активність. Як донор електронів використовують гваякол, а H_2O_2 є акцептором. Згідно з методикою, описаною С. Ліп і С. Као (1999), реакційна суміш містить 50 мМ фосфатного буфера (рН $5,8$), $7,2$ мМ гваяколу, $11,8$ мМ H_2O_2 , $0,1$ мл екстракту ензиму та має об'єм 3 мл. Реакція ініціюється внесенням H_2O_2 та аналізується спектрофотометрично зі зростанням поглинання утворюваного у суміші тетрагваяколу при $\lambda = 470$ нм ($\epsilon = 26,6$ мМ/см) за температури 25 °С. Активність гваяколпероксидази виражається у мікромолях утвореного тетрагваяколу за 1 хв.

11.13. Рівень пероксидного окиснення ліпідів

Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) є окисною деградацією ліпідів, переважно під дією вільних радикалів. Ушкодженню найбільше підлягають ПЖК через наявність особливо реактивних атомів водню між сусідніми подвійними зв'язками (C=C). Нестійкі первинні продукти ПОЛ швидко руйнуються з утворенням вторинних продуктів, серед яких є малоновий діальдегід (МДА). Аналіз сполук, які вступають у реакцію з тіобарбітуровою кислотою (ТБКАС) (англ. TBARS — thiobarbituric acid reactive substances) є найвідомішим способом кількісного визначення МДА. Аналіз ґрунтується на здатності МДА та деяких інших продуктів ПОЛ вступати в реакцію з ТБКАС (2-тіоксодигідропіримідин-4,6(1H,5H)-діон) та утворювати флуоресцентний продукт червоного кольору. Рівень ПОЛ характеризується накопиченням молекул МДА, хоча і не є єдиним джерелом формування цих молекул, бо і МДА не єдиний продукт ПОЛ. Дані великого обсягу наукової літератури щодо МДА, реактивності ТБКАС та

окисній деградації ліпідів засвідчують, що визначення МДА та аналіз ТБКАС можуть дати лише обмежену та, певним чином, емпіричну оцінку складного процесу ПОЛ. Таким чином, для отримання точнішого результату метод ТБКАС рекомендують доповнювати іншими аналізами ПОЛ.

Аналіз ТБКАС проводять з використанням 0,25%-го розчину ТБК у 10%-й трихлороцтовій кислоті. Розчином екстрагують гомогенізований рослинний матеріал, після чого екстракт спочатку тримають за температури 95 °С протягом 30 хв, а потім швидко охолоджують на льодяній бані. Охолоджений екстракт центрифугують за 10 000 об/хв 10 хв та вимірюють поглинання супернатанту при $\lambda = 532$ нм ($\epsilon = 155$ мМ/см). Неспецифічну мутність коректують вирахуванням значень оптичної густини при 600 нм. Рівень ПОЛ виражають у мікромолях на 1 г рослинної речовини.

Отже, на сьогодні не існує методу, який би надавав інформацію про стан і взаємодію складних систем, в яких утворюються та вступають у реакції антиоксиданти, як і терміну, який би визначав антиоксидантні властивості сполуки. Не існує універсального методу визначення антиоксидантної активності, але кожен метод має свої особливості, через що часто навіть порівнювати результати, отримані різними методами, об'єктивно неможливо. З урахуванням власних цілей та можливостей для оцінювання антиоксидантної активності дослідники використовують готовий метод, модифікують існуючий, створюють новий або вибирають комплекс різних методів.

СПИСОК ПРИЙНЯТИХ СКОРОЧЕНЬ

АБТС	— 2,2'-азиноди(3-етилбензтіазолін-6-сульфонієвої кислоти) діамонієва сіль
АБТС [·]	— радикал 2,2'-азиноди(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти)
АДФ	— аденозиндифосфат
АТФ	— аденозинтрифосфат
АФК	— активні форми кисню
ВЖК	— вільні жирні кислоти
Г-блоки	— блоки α - <i>L</i> -гулуранату у складі альгінатів
ГДФ	— геранілгеранілдіфосфат
ГДФ	— гуанозиндифосфат
ГМП	— ГДФ-манозапірофосфорилаза
ГТФ	— гуанозинтрифосфат
ГФПД	— 4-гідроксифенілпіруватдіоксигеназа
ГФТ	— гомогентизинова фітилтрансфераза
ДГК	— докозагексанова кислота
ДМАПФ	— диметилалілпірофосфат
ДМБХ	— 2,3-диметил-5-фітил-1,4-бензохінон
ДМФД	— N,N'-диметил- <i>n</i> -фенілендіамін
ДМФД [·]	— N,N'-диметил- <i>n</i> -фенілендіаміновий радикал
ДНК	— дезоксирибонуклеїнова кислота
ДФПГ	— 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил
ДФПГ [·]	— 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразильний радикал
ЕПК	— ейкозапентаєва кислота
ЕПР	— електронний парамагнітний резонанс
ЕПС	— екзополісахариди
ІО	— інтернаціональна одиниця
ІПП	— ізопентенілпірофосфат
кДНК	— комплементарна ДНК
ККМ	— карбонконцентрувальний механізм
К _м	— константа Міхаеліса
М-блоки	— блоки β - <i>D</i> -мануранату у складі альгінатів

MBA	— ацетат/мевалонатний шлях утворення блоків C ₅ каротиноїдів
МГГБ	— 2-метил-6-геранілгераніл бензохінон
МЕФ	— метилеритритол-4-фосфатний шлях утворення блоків C ₅ каротиноїдів
мРНК	— матрична рибонуклеїнова кислота
МФБХ	— 2-метил-6-фітил-1,4-бензохінон
НАД ⁺	— нікотинамідаденіндинуклеотид окиснений
НАДН	— нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФН	— нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат
НАД(Ф)Н	— нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений, або нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат відновлений
ПДК	— піруватдекарбоксилаза
ПНЖК	— поліненасичені жирні кислоти
ПФЛ	— піруват-форміат ліаза
ПФО	— піруватферидоксиноксидоредуктаза
ПФР	— піруватферидоксинредуктаза
Пх	— пул пластохінонів
С4	— шлях фотосинтезу
СЗК	— світлозбиральний комплекс
ТАГ	— триацилгліцероли
ТЦ	— токоферолциклаза
УДФ	— урацилдіфосфат
УФ	— ультрафіолетовий
Фд	— феридоксин
ФдР	— феридоксинредуктаза
ФДФ	— фітилдіфосфат
ФМІ	— фосфоманоноізомераза
ФМН	— флавін мононуклеотид
Ф _н	— неорганічний залишок фосфорної кислоти (PO ₄ ²⁻)
ФС	— фотосистема
ФС I	— перша фотосистема
ФС II	— друга фотосистема
ФФ	— пірофосфат-аніон
ЦТЕ	— циклічне транспортування електронів
АОХ	— альтернативна оксидаза мітохондрій
СоА	— кофермент А
DCMU	— (3,4-дихлорфеніл)-1,1-диметилсечовина, синтетичний гербіцид, інгібітор фотосинтезу
ENDOR	— електронний ядерний подвійний резонанс
FAME	— метильні етери жирних кислот, основна складова біодизелю
FTIR	— інфрачервона спектроскопія Фур'є
F _v /F _M	— максимальний квантовий вихід фотосистеми II
GFP	— green fluorescent protein, протеїн маркерного гена

Список прийнятих скорочень

HPPD	— <i>p</i> -гідроксифенілпіруватдіоксигеназа
HPPH	— 1,1-дифеніл-2-пікрил-гідразил
Mb	— мегабайт
Nda2	— НАД(Ф)Н дегідрогеназа другого типу
<i>OsyTMT</i>	— γ -токоферолметилтрансфераза у <i>Oryza sativa</i>
PFV	— вольтметрія протеїнових плівок
PTOX	— термінальна пластохінооксидаза хлоропластів
ROS	— реакційні сполуки кисню
RUBISCO	— рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилаза/оксигеназа
$V_{\text{макс}}$	— максимальна швидкість реакції, яка спостерігається тоді, коли фермент повністю насичений субстратом
$\alpha(\beta, \gamma, \delta)$ -Т	— $\alpha(\beta, \gamma, \delta)$ -токоферол
α -ТТБ	— α -токоферолтранспортувальний білок
γ -ТМТ	— γ -токоферолметилтрансфераза

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

До розділу 1

Barsanti L., Gualtieri P. *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.

Benemann J. Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies*. 2013. Vol. 6. P. 5869—5886.

Bilad M., Arafat H., Vankelecom I. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: a review. *Biotechnology Advances*. 2014. Vol. 32, N 7. P. 1283—1300.

Bohutskyi P., Liu K., Nasr L. et al. Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 99, N 14. P. 6139—6154.

Borowitzka M.A. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*. 1997. Vol. 9. P. 393—401.

Bull J.J., Collins S. Algae for biofuel: will the evolution of weeds limit the enterprise. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*. 2012. Vol. 66, N 9. P. 2983—2987.

Carrere H., Antonopoulou G., Affes R. et al. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: from lab-scale research to full-scale application. *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 199. P. 386—397.

Carvalho A.P., Meireles L.A., Malcata F.X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*. 2006. Vol. 22, N 6. P. 1490—1506.

Chen C.Y., Yeh K.L., Aisyah R. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology*. 2011. Vol. 102, N 1. P. 71—81.

Chen F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*. 1996. Vol. 14, N 11. P. 421—426.

Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. 2008. Vol. 26, N 3. P. 126—131.

Cock J.M., Sterck L., Rouzé P. et al. The ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*. 2010. Vol. 465. P. 617—621.

Concas A., Pisu M., Co G. Microalgal cell disruption through Fenton reaction: experiments, modeling and remarks on its effect on the extracted lipids composition. *Chemical Engineering Transactions*. 2015. Vol. 43. P. 367—372.

- Croze O.A., Sardina G., Ahmed M. et al. Dispersion of swimming algae in laminar and turbulent channel flows: consequences for photobioreactors. *Journal of the Royal Society*. 2013. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1041>
- Cui Y., Qin S., Jiang P. Chloroplast transformation of *Platymonas* (*Tetraselmis*) *subcordiformis* with the bar gene as selectable marker. *PloS One*. 2014. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098607>
- De Pauw N., Persoone G. Micro-algae for aquaculture, microalgal biotechnology. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1988. P. 197–221.
- Depraetere O., Pierre G., Deschoenmaecker F. et al. Harvesting carbohydrate-rich *Arthrospira platensis* by spontaneous settling. *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 180 P. 16–21.
- Durrieu C., Guedri H., Fremion F. et al. Unicellular algae used as biosensors for chemical detection in Mediterranean lagoon and coastal waters. *Research in Microbiology*. 2011. Vol. 162, N 9. P. 908–914.
- Enzing C., Ploeg M., Barbosa M., Sijtsma L. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. Luxembourg: Joint Research Centre, 2014. P. 82.
- Fitzgerald C., Gallagher E., Tasdemir D., Hayes M. Heart health peptides from macroalgae and their potential use in functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. Vol. 59. P. 6829–6836.
- Fleurence J. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science and Technology*. 1999. Vol. 10. P. 25–28.
- Ganuzza E., Anderson A.J., Ratledge C. High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system. *Biotechnology Letters*. 2008. Vol. 30. P. 1559–1564.
- Gim G.H., Kim J.K., Kim H.S. et al. Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2014. Vol. 37, N 2. P. 99–106.
- Gunerken E., D'Hondt E., Eppink M.H.M. et al. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33, N 2. P. 243–260.
- Hallmann A. Algae Biotechnology — Green Cell-Factories on the Rise. *Current Biotechnology*. 2015. Vol. 5. URL: <http://doi.org/10.2174/2211550105666151107001338>
- He J., Chen J.P. A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresource Technology*. 2014. Vol. 160. P. 67–78.
- Joannes C., Sipaut C.S., Dayou J. et al. Microalgae using electric field treatment method for microalgae lipid extraction. *Materials Science and Engineering*. 2015. Vol. 78. URL: <http://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/78/1/012034>.
- Ju E., Taek H., Mun K. et al. Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 199. P. 311–318.
- Kim Y.H., Choi Y.K., Park J. et al. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 109. P. 312–315.
- Kumar K.S., Dahms H.U., Won E.J. et al. Microalgae — A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015. Vol. 113. P. 329–352.
- Lam M.K., Lee K.T. Bioethanol Production from Microalgae. Handbook of Marine Microalgae. Amsterdam: Elsevier, 2015. 604 p. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00012-1>.

- Li Y., Cui J., Zhang G. et al. Optimization study on the hydrogen peroxide pretreatment and production of bioethanol from seaweed *Ulva prolifera* biomass. *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 214. P. 144–149.
- Lorente E., Farriol X., Salvado J. Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. *Fuel Processing Technology*. 2015. Vol. 131. P. 93–98.
- Lorenz R.T., Cysewski G.R. Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnology*. 2000. Vol. 18, N 4. P. 160–167.
- Medipally S., Yusoff F., Banerjee S. et al. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015. URL: <http://doi.org/10.1155/2015/519513>.
- Misra R., Guldhe A., Singh P. et al. Evaluation of operating conditions for sustainable harvesting of microalgal biomass applying electrochemical method using non-sacrificial electrodes. *Bioresource Technology*. 2015. Vol. 176. P. 1–7.
- Moheimani N.R., McHenry M.P., de Boer K., Bahri P. Biomass and biofuels from microalgae: advances in engineering and biology. New York: Springer, 2015. 373 p.
- Monkonsit S., Powtongsook S., Pavasant P. Comparison between airlift photobioreactor and bubble column for *Skeletonema costatum* cultivation. *Engineering Journal*. 2011. Vol. 15, N 4. P. 53–64.
- Oh H.M., Lee S.J., Park M.H. et al. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. *Biotechnology Letters*. 2001. Vol. 23. P. 1229–1234.
- Pahl S.L., Lee A.K., Kalaitzidis T. et al. Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass. *Algae for Biofuels and Energy*. Dordrecht: Springer, 2013. P. 165–185.
- Posten C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*. 2009. Vol. 9, N 3. P. 165–177.
- Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004. Vol. 65, N 6. P. 635–648.
- Roselet F., Burkert J., Abreu P. Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: bench scale optimization and pilot scale reproducibility. *Biomass Bioenergy*. 2016. Vol. 87. P. 55–60.
- Silva P.A.F.S., Costa M.C., Lopez A.C. et al. Comparison of pretreatment methods for total lipids extraction. *Renewable Energy*. 2014. Vol. 63. P. 762–766.
- Sivonen K., Jones G. Cyanobacterial toxins. Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management. Sufflok: St Edmundsbury Press, London, 1999. P. 41–111.
- Skulberg O.M. Microalgae as a source of bioactive molecules — experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology*. 2000. Vol. 12, P. 341–348.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. et al. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006. Vol. 101, N 2. P. 87–96.
- Travaini R., Martín-Juárez J., Lorenzo-Hernando A. et al. Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 199. P. 2–12.

Vandamme D., Foubert I., Muylaert K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*. 2013. Vol. 31, N 4. P. 233—239.

Wang S., Stiles A., Guo C. et al. Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Engineering in Life Sciences*. 2014. Vol. 14, N 6. P. 550—559.

Xie J., Zhang Y., Li Y., Wang Y. Mixotrophic cultivation of *Platymonas subcordiformis*. *Journal of Applied Phycology*. 2001. Vol. 13, N 4. P. 343—347.

Zhang T. Dynamics of fluid and light intensity in mechanically stirred photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. 2013. Vol. 168, N 1. P. 107—116.

Zhou W., Min M., Li Y. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 110. P. 448—455.

Zuorro A., Miglietta S., Familiari G. et al. Enhanced lipid recovery from *Nannochloropsis* microalgae by treatment with optimized cell wall degrading enzyme mixtures. *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 212. P. 35—41.

До розділу 2

Золотарева Е.К., Шнюкова Е.И., Подорванов В.В. Микроводоросли как продуценты водорода. *Альгология*. 2010. Т. 20, № 2. С. 224—249.

Abdel-Basset R., Bader K.P. Effects of stress conditions and calcium on the light-induced hydrogen gas exchange in *Oscillatoria chalybea*. *Journal of Plant Physiol.* 1999. Vol. 155. P. 86—92.

Abo-Hashesh M., Wang R., Hallenbeck P.C. Metabolic engineering in dark fermentative hydrogen production; theory and practice. *Bioresource Technology*. 2011. Vol. 110. P. 1—9.

Abo-Hashesh M., Hallenbeck P.C. Fermentative hydrogen production. Microbial technologies in advanced biofuels production. New York: Springer, 2012. P. 77—92.

Attridge E.M., Rowell P. Growth, heterocyst differentiation and nitrogenase activity in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Anabaena cylindrica* in response to molybdenum and vanadium. *New Phytologist*. 1997. Vol. 135. P. 517—526.

Bandyopadhyay A., Stöckel J., Min H.T. High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions. 2010. URL: <https://www.nature.com/articles/ncomms1139>

Bandyopadhyay A., Elvitigala T., Welsh E. et al. Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria. 2011. URL: <https://mbio.asm.org/content/2/5/e00214-11.long>

Belkin S., Padan E. Hydrogen metabolism in the facultative anoxygenic cyanobacteria (blue-green algae) *Oscillatoria limnetica* and *Aphanothece halophytica*. *Archives of Microbiology*. 1978. Vol. 116. P. 109—111.

Benemann J.R., Weare N.M. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science*. 1974. Vol. 184. P. 174—175.

Bernat G., Waschewski N., Rogner M. Towards efficient hydrogen production: the impact of antenna size and external factors on electron transport dynamics in *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynthesis Research*. 2009. Vol. 99. P. 205—216.

- Boison G., Steingen C., Stal L.J., Bothe H. The rice field cyanobacteria *Anabaena azotica* and *Anabaena* sp. CH1 express vanadium-dependent nitrogenase. *Archives of Microbiology*. 2006. Vol. 186. P. 367–376.
- Bothe H., Schmitz O., Yates M.G., Newton W.E. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010. Vol. 74. P. 529–551.
- Burrows E.H., Chaplen F.W.R., Ely R.L. Optimization of media nutrient composition for increased photofermentative hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC6803. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008. Vol. 33. P. 6092–6099.
- Camsund D., Devine E., Holmqvist M. et al. A HupS-GFP fusion demonstrates a heterocyst-specific location of the uptake hydrogenase in *Nostoc punctiforme*. *FEMS Microbiology Letters*. 2011. Vol. 316. P. 152–159.
- Carrieri D., Ananyev G., Costas A.M.G. Renewable hydrogen production by cyanobacteria: nickel requirements for optimal hydrogenase activity. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008. Vol. 33. P. 2014–2022.
- Christopher K., Dimitrios R. A review on exergy comparison of hydrogen production methods from renewable energy sources. *Energy and Environmental Science*. 2012. Vol. 5. P. 6640–6651.
- Das D., Veziroglu T.N. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2008. Vol. 33. P. 6046–6057.
- Ducat D.C., Way J.C., Silver P.A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnology*. 2011. Vol. 29. P. 95–103.
- Eisbrenner G., Bothe H. Modes of electron transfer from molecular hydrogen in *Anabaena cylindrica*. *Archives Microbiology*. 1979. Vol. 123. P. 37–45.
- Germer F., Zebger I., Saggi M. et al. Overexpression, isolation, and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284. P. 36462–36472.
- Ghosh D., Hallenbeck P.C. Advanced bioethanol production. Microbial technologies in advanced biofuels production. New York: Springer, 2012. P. 165–181.
- Goldemberg J. Environmental and ecological dimensions of biofuels. 2008. URL: https://www.esa.org/biofuels/presentations/Goldemberg_BiofuelsPresentation.pdf
- Hall D.O., Markov S.A., Watanabe Y., Rao K.K. The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynthesis Research*. 1995. Vol. 46. P. 159–167.
- Hallenbeck P.C. Microbial paths to renewable hydrogen production. *Biofuels*. 2011. Vol. 2. P. 285–302.
- Hallenbeck P.C. Fundamentals of dark hydrogen fermentations; multiple pathways and enzymes. State of the art and progress in production of biohydrogen. Oak Park: Bentham Sci. Publ., 2012. P. 94–111.
- Hess W.R. Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*. 2011. Vol. 14. P. 608–614.
- Hu Y.L., Lee C.C., Ribbe H.W. Vanadium nitrogenase: a two-hit wonder? *Dalton Transactions*. 2012. Vol. 41. P. 1118–1127.
- Ihara M., Nishihara H., Yoon K.S. et al. Light-driven hydrogen production by a hybrid complex of a [NiFe]-hydrogenase and the cyanobacterial photosystem I. *Photochemistry and Photobiology*. 2006. Vol. 82. P. 676–682.

- IPCC guidelines for national greenhouse gas inventories. Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme; eds H.S. Eggleston, L. Buendia, K. Miwa et al. IGES, Japan. 2006. URL: https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/pdf/0_Overview/V0_1_Overview.pdf
- Joerger R.D., Bishop P.E. Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *CRC Critical Reviews in Microbiology*. 1988. Vol. 14. P. 1–14.
- Jong W. Sustainable hydrogen production by thermochemical biomass processing. *Hydrogen Fuel: Production, Transport, and Storage*. 2008. URL: [https://DOI: 10.1201/9781420045772.ch6](https://doi.org/10.1201/9781420045772.ch6)
- Kapdan I.K., Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. Vol. 38. P. 569–582.
- Kelly M., Postgate J.R., Richards R.L. Reduction of cyanide and isocyanide by nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. *Biochemical Journal*. 1967. Vol. 102. P. 1–3.
- Kentemich T., Danneberg G., Hundeshagen B., Bothe H. Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 1988. Vol. 51. P. 19–24.
- Khetkorn W., Baebprasert W., Lindblad P., Incharoensakdi A. Redirection the electron flow towards the nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase by using specific inhibitors results in enhanced H₂-production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012. *Bioresource Technology*. 2012. Vol. 118. P. 265–271.
- Khetkorn W., Rastogi R., Incharoensakdi A. et al. Microalgal hydrogen production — A review. *Bioresource Technology*. 2017. URL: [https://10.1016/j.biortech.2017.07.085](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.085).
- Kumar K., Mella-Herrera R.A., Golden J.W. Cyanobacterial heterocysts. Harbor Perspectives in Biology. *Cold Spring*. 2010. URL: [https://DOI:10.1101/cshperspect.a000315](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000315)
- Laczko I. Appearance of a reversible hydrogenase activity in *Anabaena cylindrica* grown in high light. *Physiologia Plantarum*. 1986. Vol. 67. P. 634–637.
- Lancaster K.M. X-ray emission spectroscopy evidences a central carbon in the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Science*. 2011. Vol. 334. P. 974–977.
- Latysheva N., Junker V.V., Palmer W.J. et al. The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Bioinformatics*. 2012. Vol. 28. P. 603–608.
- Li C.L., Fang H.H.P. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2007. Vol. 37. P. 1–39.
- Lipman T. An overview of hydrogen production and storage systems with renewable hydrogen case studies. Energy Efficiency and Renewable Energy Fuel Cell Technologies Program. 2011. URL: <https://www.cesa.org/assets/2011-Files/Hydrogen-and-Fuel-Cells/CESA-Lipman-H2-prod-storage-050311.pdf>
- Lopez-Igual R., Flores E., Herrero A. Inactivation of a heterocyst-specific invertase indicates a principal role of sucrose catabolism in heterocysts of *Anabaena* sp. *Journal of Bacteriology*. 2010. Vol. 192. P. 5526–5533.
- Luo Y.H., Mitsui A. Sulfide as electron source for H₂-photoproduction in the cyanobacterium *Synechococcus* sp., strain Miami BG 043511, under stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 1996. Vol. 35. P. 203–207.

- Madamwar D., Garg N., Shah V. Cyanobacterial hydrogen production. *World Journal of Microbiological Biotechnology*. 2000. Vol. 16. P. 757–767.
- Mariscal V., Flores F. Multicellularity in a heterocyst-forming cyanobacterium: pathways for intercellular communication. Recent advances in phototrophic prokaryotes. New York: Springer, 2010. P. 125–135.
- Markets and Markets. Hydrogen Generation Market-by Merchant and Captive Type, Distributed and Centralized Generation, Application and Technology-Trends and Global Forecasts (2011–2016). 2011. URL:<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/hydrogen-generation-market-494.html>.
- Marques A.E., Barbosa A.T., Jotta J. et al. Biohydrogen production by *Anabaena* sp PCC 7120 wild-type and mutants under different conditions: light, nickel, propane, carbon dioxide and nitrogen. *Biomass Bioenergy*. 2011. Vol. 35. P. 4426–4434.
- Masukawa H., Mochimaru M., Sakurai H. Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 58. P. 618–624.
- Masukawa H., Inoue K., Sakurai H. Effects of disruption of homocitrate synthase genes on *Nostoc* sp. strain PCC 7120 photobiological hydrogen production and nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 73. P. 7562–7570.
- Masukawa H., Kitashima M., Inoue K. Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and water. *AMBIO*. 2012. Vol. 41. P. 169–173.
- Masukawa H., Zhang X., Yamazaki E. et al. Survey of the distribution of different types of nitrogenases and hydrogenases in heterocyst-forming cyanobacteria. *Marine Biotechnology*. 2009. Vol. 11. P. 397–409.
- McIntosh C.L., Germer F., Schulz R. The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. *Journal of the American Chemical Society*. 2011. Vol. 133. P. 11308–11319.
- McNeely K., Xu Y., Bennette N. et al. Redirecting reductant flux into hydrogen production via metabolic engineering of fermentative carbon metabolism in a cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 76. P. 5032–5038.
- Mikheeva L.E., Schmitz O., Shestakov S.V., Bothe H. Mutants of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* altered in hydrogenase activities. *Zeitschrift für Naturforschung*. 1995. Vol. 50c. S. 505–510.
- Min H.T., Sherman L.A. Hydrogen production by the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 under conditions of continuous light. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010. Vol. 76. P. 4293–4301.
- Nouni M.R. Hydrogen energy and fuel cell technology: Recent developments and future prospects in India. *Renewable Energy-Akshay Urja*. 2012. Vol. 5, N 5. P. 10–14.
- Pfreundt U., Stal L.J., Voss B., Hess W.R. Nitrogen fixation in a unicellular chlorophyll d-containing cyanobacterium. *ISME Journal*. 2012. Vol. 6. P. 1367–1377.
- Postgate J. Biological nitrogen fixation, A Meroow monograph. Watford: Meroow Publ., 1972. 61 p.

- Rashid N., Song W., Park J. et al. Characteristics of hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* through cycles of photosynthesis and anaerobic incubation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2009. Vol. 15. P. 498—503.
- Reddy P.M., Spiller H., Albracht S.L., Shanmugam K.T. Photodissimilation of fructose to H₂ and CO₂ by a dinitrogen-fixing cyanobacterium. *Anabaena variabilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996. Vol. 62. P. 1220—1226.
- Sanchez-Barcaldo P., Hayes P.K., Blank C.E. Morphological and habitat evolution in the cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology*. 2005. Vol. 3. P. 145—165.
- Schmitz O., Boison G., Hilscher R. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *European Journal of Biochemistry*. 1995. Vol. 233. P. 266—276.
- Schrautemeier B., Neveling U., Schmitz S. Distinct and differentially regulated Mo-dependent nitrogen-fixing systems evolved for heterocysts and vegetative cells of *Anabaena variabilis* ATCC 29413: characterization of the *fdX1/2* gene regions as part of the *nif1/2* gene clusters. *Molecular Microbiology*. 1995. Vol. 18. P. 357—359.
- Schut G.J., Adams M.W.W. The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. *Journal of Bacteriology*. 2009. Vol. 191. P. 4451—4457.
- Shi T., Falkowski P.G. Genome evolution in cyanobacteria. The stable core and the variable shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105. P. 2510—2515.
- Skizim N.J., Ananyev G.M., Krishnan A., Dismukes G.C. Metabolic pathways for photobiological hydrogen production by nitrogenase- and hydrogenase-containing unicellular cyanobacteria *Cyanothece*. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287. P. 2777—2786.
- Spatzal T., Aksoyoglu M., Zhang L. et al. Evidence for interstitial carbon in nitrogenase FeMo cofactor. *Science*. 2011. Vol. 334. P. 940.
- Stewart W.D.P., Lex M. Nitrogenase activity in the blue-green alga *Plectonema boryanum*. *Archives of Microbiology*. 1970. Vol. 73. P. 250—260.
- Stwertka A. A Guide to the Elements. Oxford: Oxford Univ. Press, 1996. P. 16—21.
- Summers M.L., Wallis J.G., Campbell E.L., Meeks J.C. Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen-fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC-29133. *Journal of Bacteriology*. 1995. Vol. 177. P. 6184—6194.
- Tamagnini P., Leitão E., Oxelfelt F. Uptake hydrogenase in cyanobacteria: novel input from non-heterocystous strains. *Biochemical Society Transactions*. 2005. Vol. 33. P. 67—68.
- Thiel T., Lyons E.M., Erker J., Ernst A. A second nitrogenase in vegetative cells of a heterocyst-forming cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995. Vol. 92. P. 9358—9362.
- Tsygankov A.A., Fedorov A.S., Kosourov S.N., Rao K.K. Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002. Vol. 80. P. 777—783.

- Wiig J.A., Hu Y., Lee C.C., Ribbe M. Radical SAM-dependent carbon insertion into the nitrogenase M-cluster. *Science*. 2012. Vol. 337. P. 1672–1675.
- Winkler M., Kuhlert S., Hippler M., Happe T. Characterization of the key step for light-driven hydrogen evolution in green algae. *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284. P. 36620–36627.
- Yeager C.M., Milliken C.E., Bagwell C.E. Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous cyanobacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2011. Vol. 36. P. 7487–7499.
- Yoon J.H., Hae Shin J., Kim M-S. Evaluation of conversion efficiency of light to hydrogen energy by *Anabaena variabilis*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2006. Vol. 31. P. 721–727.
- Yoshino F., Ikeda H., Masukawa H., Sakurai H. High photobiological hydrogen production activity of a *Nostoc* sp. PCC 7422 uptake hydrogenase-deficient mutant with high nitrogenase activity. *Marine Biotechnology*. 2007. Vol. 9. P. 101–111.

До розділу 3

- Armstrong F.A., Albracht S.P. [NiFe]-hydrogenases: spectroscopic and electrochemical definition of reactions and intermediates. *Philosophical Transactions of The Royal Society A Mathematical Physical and Engineering Sciences*. 2005. Vol. 363. P. 937–954.
- Armstrong F.A., Belsey N.A., Cracknell J.A. et al. Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology. *Chemical Society Reviews*. 2009. Vol. 38. P. 36–51.
- Atta M., Meyer J. Characterization of the gene encoding the [Fe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochimica et biophysica acta*. 2000. Vol. 1476. P. 368–371.
- Baffert C., Bertini L., Lautier T. et al. CO disrupts the reduced H-Cluster of FeFe hydrogenase. A combined DFT and protein film voltammetry study. *Journal of the American Chemical Society*. 2011. Vol. 133. P. 2096–2099.
- Balk J., Schaedler T.A. Iron cofactor assembly in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2014. Vol. 65. P. 125–153.
- Berggren G., Adamska A., Lambert C. et al. Biomimetic assembly and activation of FeFe-hydrogenases. *Nature*. 2013. Vol. 499, N 7456. P. 66–69.
- Betz J.N., Boswell N.W., Fugate C.J. et al. [FeFe]-hydrogenase maturation: insights into the role HydE plays in dithiomethylamine biosynthesis. *Biochemistry*. 2015. Vol. 54, N 9. P. 1807–1818.
- Böck A., King P.W., Blokesch M., Posewitz M.C. Maturation of hydrogenases. *Advances in Microbial Physiology*. 2006. Vol. 51. P. 1–71.
- Cammack R., Fernandez V.M., Schneider K. Activation and active sites of nickel-containing hydrogenases. *Biochimie*. 1986. Vol. 68. P. 85–91.
- Carepo M., Tierney D.L., Brondino C.D. et al. ¹⁷O ENDOR detection of a solvent-derived Ni-(OH(x))-Fe bridge that is lost upon activation of the hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Journal of the American Chemical Society*. 2002. Vol. 124. P. 281–286.
- Castruita M., Casero D., Karpowicz S.J. et al. Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. *Plant Cell*. 2011. Vol. 23, N 4. P. 1273–1292.

- Chlamydomonas: Biotechnology and Biomedicine; ed. M. Hippler. Springer, 2017. P. 217.
- Cornish A.J., Gaertner K., Yang H. et al. Mechanism of proton transfer in [FeFe]-hydrogenase from *Clostridium pasteurianum*. *Journal of Biological Chemistry*. 2011. Vol. 286, N 44. P. 38341—38347.
- Corr M.J., Murphy J.A. Evolution in the understanding of [Fe]-hydrogenase. *Chemical Society Reviews*. 2011. Vol. 40. P. 2279—2292.
- DeLacey A.L., Fernández V.M., Rousset M., Cammack R. Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies. *Chemical Reviews*. 2007. Vol. 107. P. 4304—4330.
- Esselborn J., Lambert C., Adamska-Venkatesh A. et al. Spontaneous activation of FeFe-hydrogenases by an inorganic 2Fe active site mimic. *Nature Chemical Biology*. 2013. Vol. 9, N 10. P. 607—609.
- Florin L., Tsokoglou A., Happe T. A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276. P. 6125—6132.
- Forestier M., King P., Zhang L. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *European Journal of Biochemistry*. 2003. Vol. 270. P. 2750—2758.
- Happe T., Kaminski A. Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*. 2002. Vol. 269. P. 1022—1032.
- Happe T., Naber J.D. Isolation, characterization, and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*. 1993. Vol. 214. P. 475—481.
- Hemshemeier A., Fouchard S., Cournac L. et al. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta*. 2008. Vol. 227. P. 397—407.
- Hiromoto T., Ataka K., Pilak O. et al. The crystal structure of C176A mutated [Fe]-hydrogenase suggests an acyl-iron ligation in the active site iron complex. *FEBS Letters*. 2009. Vol. 583. P. 585—590.
- Hong G., Pachter R. Inhibition of biocatalysis in [FeFe] hydrogenase by oxygen: molecular dynamics and density functional theory calculations. *ACS Chemical Biology*. 2012. Vol. 7. P. 1268—1275.
- Horner D.S., Heil B., Happe T., Embley T.M. Iron hydrogenases—ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002. Vol. 27. P. 148—153.
- Kamp C., Silakov A., Winkler M. et al. Isolation and first EPR characterization of the [FeFe]-hydrogenases from green algae. *Biochimica et biophysica acta*. 2008. Vol. 1777. P. 410—416.
- Kropat J., Tottey S., Birkenbihl R.P. et al. A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. Vol. 102, N 51. P. 18730—18735.
- Lamle S.E., Albracht S.P., Armstrong F.A. The mechanism of activation of a [NiFe]-hydrogenase by electrons, hydrogen, and carbon monoxide. *Journal of the American Chemical Society*. 2005. Vol. 127. P. 6595—6604.

- Léger C., Dementin S., Bertrand P. et al. Inhibition and aerobic inactivation kinetics of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase studied by protein film voltammetry. *Journal of the American Chemical Society*. 2004. Vol. 126. P. 12162–12172.
- Lenz O., Ludwig M., Schubert T. et al. H₂ conversion in the presence of O₂ as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *ChemPhysChem*. 2010. Vol. 11. P. 1107–1119.
- Leroux F., Dementin S., Burlat B. et al. Experimental approaches to kinetics of gas diffusion in hydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105. P. 11188–11193.
- Liebgott P.P., Leroux F., Burlat B. et al. Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase. *Nature Chemical Biology*. 2010. Vol. 6. P. 63–70.
- Liu Z.P., Hu P. A density functional theory study on the active center of Fe-only hydrogenase: characterization and electronic structure of the redox states. *Journal of the American Chemical Society*. 2002. Vol. 124. P. 5175–5182.
- Lubitz W., Reijerse E., van Gastel M. [NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques. *Chemical Reviews*. 2007. Vol. 107. P. 4331–4365.
- Lyon E.J., Shima S., Buurman G. et al. UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry*. 2004. Vol. 271. P. 195–204.
- Matias P.M., Soares C.M., Saraiva L.M. et al. [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome *c₃*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2001. Vol. 6. P. 63–81.
- Meuser J.E., D'Adamo S., Jinkerson R.E. et al. Genetic disruption of both *Chlamydomonas reinhardtii* [FeFe]-hydrogenases: insight into the role of HYDA2 in H₂ production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012. Vol. 417. P. 704–709.
- Morra S., Giraud A., Di Nardo G. et al. Site saturation mutagenesis demonstrates a central role for cysteine 298 as proton donor to the catalytic site in CaHydA [FeFe]-Hydrogenase. *Plos One*. 2012. URL: [https://DOI:10.1371/journal.pone.0048400](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048400)
- Mulder D.W., Boyd E.S., Sarma R. et al. Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA^{DEFG}. *Nature*. 2010. Vol. 465, N 7295. P. 248–251.
- Mus F., Dubini A., Seibert M. et al. Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282. P. 25475–25486.
- Nicolet Y., Piras C., Legrand P. et al. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*. 1999. Vol. 7. P. 13–23.
- Nicolet Y., Lemon B.J., Fontecilla-Camps J.C., Peters J.W. A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. *Trends in Biochemical Sciences*. 2000. Vol. 25. P. 138–143.

- Nicolet Y., Fontecilla-Camps J.C. Structure-function relationships in [FeFe]-hydrogenase active site maturation. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287. P. 13532—13540.
- Ogata H., Kellers P., Lubitz W. The crystal structure of the [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Allochromatium vinosum*: characterization of the oxidized enzyme Ni-a state. *Journal of Molecular Biology*. 2010. Vol. 420. P. 428—444.
- Paila Y.D., Richardson L.G.L., Schnell D.J. New insights into the mechanism of chloroplast protein import and its integration with protein quality control, organelle biogenesis and development. *Journal of Molecular Biology*. 2015. Vol. 427, N 5. P. 1038—1060.
- Pandelia M.E., Ogata H., Lubitz W. Intermediates in the catalytic cycle of [NiFe] hydrogenase: functional spectroscopy of the active site. *ChemPhysChem*. 2010. Vol. 11. P. 1127—1140.
- Pape M., Lambert C., Happe T., Hemschemeier A. Differential expression of the *Chlamydomonas* [FeFe]-hydrogenase-encoding *HYDA1* gene is regulated by the copper response regulator 1. *Plant Physiology*. 2012. Vol. 159, N 4. P. 1700—1712.
- Peters J.W., Lanzilotta W.N., Lemon B.J., Seefeldt L.C. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*. 1998. Vol. 282. P. 1853—1858.
- Peters J.W., Schut G.J., Boyd E.S. et al. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochimica et biophysica acta*. 2015. Vol. 1853, N 6. P. 1350—1369.
- Pierik A.J., Roseboom W., Happe R.P. et al. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, biology's way to activate H₂. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. Vol. 274. P. 3331—3337.
- Posewitz M.C., Smolinski S.L., Kanakagiri S. et al. Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*. 2004. Vol. 16. P. 2151—2163.
- Shepard E.M., McGlynn S.E., Bueling A.L. et al. Synthesis of the 2Fe sub-cluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. Vol. 107, N 23. P. 10448—10453.
- Shima S. Structure of [Fe]-hydrogenase and the convergent evolution of the active site of hydrogenases. *Seikagaku*. 2008. Vol. 80. P. 846—849.
- Silakov A., Wenk B., Reijerse E. et al. Spin distribution of the H-cluster in the H(ox)-CO state of the [FeFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*: HYSCORE and ENDOR study of (14)N and (13)C nuclear interactions. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2009. Vol. 14. P. 301—313.
- Stripp S.T., Goldet G., Brandmayr C. et al. How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. Vol. 106. P. 17331—17336.
- Teixeira V.H., Baptista A.M., Soares C.M. Pathways of H₂ toward the active site of [NiFe]-hydrogenase. *Biophysical Journal*. 2006. Vol. 91. P. 2035—2045.

- Terashima M., Specht M., Naumann B., Hippler M. Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas reinhardtii* by quantitative proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2010. Vol. 9, N 7. P. 1514–1532.
- Topin J., Rousset M., Antonczak S., Golebiowski J. Kinetics and thermodynamics of gas diffusion in a NiFe hydrogenase. *Proteins*. 2012. Vol. 80. P. 677–682.
- Vignais P.M., Billoud B., Meyer J. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2001. Vol. 25. P. 455–501.
- Vignais P.M., Billoud B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chemical Reviews*. 2007. Vol. 107. P. 4206–4272.
- Vincent K.A., Parkin A., Armstrong F.A. Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chemical Reviews*. 2007. Vol. 107. P. 4366–4413.
- Volbeda A., Montet Y., Vernède X. et al. High resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002. Vol. 27. P. 1449–1461.
- Volbeda A., Amara P., Darnault C. et al. X-ray crystallographic and computational studies of the O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. Vol. 109. P. 5305–5310.
- Zirngibl C., Van Dongen W., Schworer B. et al. H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry*. 1992. Vol. 208. P. 511–520.

До розділу 4

- Allen J.F., Bennet J., Steinback K.E., Arntzen C.J. Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*. 1981. Vol. 291. P. 25–29.
- Alric J., Lavergne J., Rappaport F. Redox and ATP control of photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* (I) aerobic conditions. *Biochimica et biophysica acta*. 2010. Vol. 1797. P. 44–51.
- Antal T.K., Krendeleva T.E., Laurinavichene T.V. et al. The dependence of algal H₂ production on photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2003. Vol. 1607. P. 153–160.
- Antal T.K., Krendeleva T.E., Rubin A.B. The photochemical activity of photosystem II in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells depends on the redox state of the quinone pool during the transition to anaerobiosis. *Biofizika*. 2004. Vol. 49. P. 499–505.
- Antal T.K., Volgusheva A.A., Kukarskih G.P. et al. Effects of sulfur limitation on the PS II functioning in *Chlamydomonas reinhardtii* as probed by the chlorophyll a fluorescence. *Physiology Plantarum*. 2006. Vol. 128. P. 360–367.
- Antal T.K., Krendeleva T.E., Tyystjarvi E. Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production. *Photosynthesis Research*. 2015. Vol. 125. P. 357–381.

- Aro E.M., Andersson B. Regulation of Photosynthesis. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2001. 382 p.
- Beckmann J., Lehr F., Finazzi G. et al. Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*. 2009. Vol. 142. P. 70–77.
- Bennoun P. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982. Vol. 79. P. 4352–4356.
- Boehm M., Alahuhta M., Mulder D.W. et al. Crystal structure and biochemical characterization of *Chlamydomonas* FDX2 reveal two residues that, when mutated, partially confer FDX2 the redox potential and catalytic properties of FDX1. *Photosynthesis Research*. 2015. Vol. 128. P. 45–57.
- Burgess S.J., Taha H., Yeoman J.A. et al. Identification of the elusive pyruvate reductase of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 2016. Vol. 57. P. 82–94.
- Carol P., Stevenson D., Bisanz C. et al. Mutations in the Arabidopsis gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *The Plant Cell*. 1999. Vol. 11. P. 57–68.
- Catalanotti C., Dubini A., Subramanian V. et al. Altered fermentative metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* mutants lacking pyruvate formate lyase and both pyruvate formate lyase and alcohol dehydrogenase. *The Plant Cell*. 2012. Vol. 24. P. 692–707.
- DalCorso G., Pesaresi P., Masiero S. et al. A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell*. 2008. Vol. 132. P. 273–285.
- Dent R.M., Haglund C.M., Chin B.L. et al. Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2005. Vol. 137. P. 545–556.
- Depege N., Bellafiore S., Rochaix J-D. Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*. 2003. Vol. 299. P. 1572–1575.
- Desplats C., Mus F., Cuine S. et al. Characterization of Nda2, a plastoquinone-reducing type II NAD(P)H dehydrogenase in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284. P. 4148–4157.
- Doebbe A., Rupprecht J., Beckmann J. et al. Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological H₂ production. *Journal of Biotechnology*. 2007. Vol. 131. P. 27–33.
- Duanmu D., Casero D., Dent R.M. et al. Retrograde bilin signaling enables *Chlamydomonas* greening and phototrophic survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. Vol. 110. P. 3621–3626.
- Faraloni C., Torzillo G. Phenotypic characterization and hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* Q_b-binding D1-protein mutants under sulfur starvation: changes in chl fluorescence and pigment composition: changes in chl fluorescence and pigment composition. *Journal of Phycology*. 2010. Vol. 46. P. 788–799.

- Faraloni C., Torzillo G. Xanthophyll cycle induction by anaerobiosis conditions under low light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 2013. Vol. 25. P. 1457–1471.
- Feilke K., Streb P., Gabriel C. et al. Effect of *Chlamydomonas* plastid terminal oxidase 1 expressed in tobacco on photosynthetic electron transfer. *The Plant Journal*. 2015. Vol. 85. P. 219–228.
- Finazzi G., Rappaport F., Furia A., Fleischmann M. Involvement of state transition in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Reports*. 2002. Vol. 3. P. 280–285.
- Gfeller R.P., Gibbs M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: 1. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiology*. 1984. Vol. 75. P. 212–218.
- Gibbs M., Gfeller R.P., Chen C. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. 3. Photoassimilation of acetate. *Plant Physiology*. 1986. Vol. 82. P. 160–166.
- Godaux D., Bailleul B., Berne N., Cardol P. Induction of photosynthetic carbon fixation in anoxia relies on hydrogenase activity and PGRL1-mediated cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2015. URL: <https://doi.org/10.1104/pp.15.00105>
- Grewe S., Ballottari M., Alcocer M. et al. Light-Harvesting Complex Protein LHCBM9 Is Critical for Photosystem II Activity and Hydrogen Production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*. 2014. Vol. 26. P. 1598–1611.
- Hemschemeier A. Photo-bleaching of *Chlamydomonas reinhardtii* after dark-anoxic incubation. *Plant Signaling and Behavior*. 2013. Vol. 8, N 11. P. e27263. URL: <https://doi.org/10.4161/psb.27263>
- Hemschemeier A., Fouchard S., Cournac L. et al. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta*. 2008. Vol. 227. P. 397–407.
- Hertle A.P., Blunder T., Wunder T. et al. PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Molecular Cell*. 2013. Vol. 49. P. 511–523.
- Hochmal A.K., Schulze S., Trompelt K., Hippler M. Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2015. Vol. 1847. P. 993–1003.
- Houille-Vernes L., Rappaport F., Wollman F-A. et al. Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. Vol. 108. P. 20820–20825.
- Jans F., Mignolet E., Houyoux P.-A. et al. A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008. Vol. 105. P. 20546–20551.
- Johnson X., Alric J. Interaction between starch breakdown, acetate assimilation, and photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287. P. 26445–26452.
- Johnson X., Steinbeck J., Dent R.M. et al. Proton Gradient Regulation 5-Mediated Cyclic Electron Flow under ATP- or Redox-Limited Conditions: A Study

- of ATPase *pgr5* and *rbcL pgr5* Mutants in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2014. Vol. 165. P. 438–452.
- Josse E.M., Alcaraz J.P., Laboure A.M., Kuntz M. In vitro characterization of a plastid terminal oxidase (PTOX). *European Journal of Biochemistry*. 2003. Vol. 270. P. 3787–3794.
- Katsuda T., Ooshima H., Azuma M., Kato J. New detection method for hydrogen gas for screening hydrogen-producing microorganisms using water-soluble wilkinson's catalyst derivative. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006. Vol. 102. P. 220–226.
- Kolber Z., Zehr J., Falkowski P. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in Photosystem II. *Plant Physiology*. 1988. Vol. 88. P. 923–929.
- Kosourov S., Tsygankov A., Seibert M., Ghirardi M.L. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002. Vol. 78. P. 731–740.
- Kosourov S., Patrusheva E., Ghirardi M.L. et al. A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Journal of Biotechnology*. 2007. Vol. 128. P. 776–787.
- Kosourov S.N., Batyrova K.A., Petushkova E.P. et al. Maximizing the hydrogen photoproduction yields in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures: The effect of the H₂ partial pressure. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012. Vol. 37. P. 8850–8858.
- Krieger-Liszak A., Feilke K. The dual role of the plastid terminal oxidase PTOX: between a protective and a pro-oxidant function. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 6. P. 2015–2017.
- Kruse O., Rupprecht J., Bader K.P. et al. Improved photobiological H₂ production in engineered green algal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. Vol. 280. P. 34170–34176.
- Lennon A.M., Prommeenate P., Nixon P.J. Location, expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids. *Planta*. 2003. Vol. 218. P. 254–260.
- Lin H.D., Liu B.H., Kuo T.T. et al. Knockdown of PsbO leads to induction of HydA and production of photobiological H₂ in the green alga *Chlorella* sp. DT. *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 143. P. 154–162.
- Lucker B., Kramer D.M. Regulation of cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii* under fluctuating carbon availability. *Photosynthesis Research*. 2013. URL: <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9932-0>
- Magneschi L., Catalanotti C., Subramanian V. et al. A mutant in the ADH1 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* elicits metabolic restructuring during anaerobiosis. *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. P. 1293–1305.
- Melis A., Zhang L., Forestier M. et al. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2000. Vol. 122. P. 127–136.
- Melis A. Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta*. 2007. Vol. 226. P. 1075–1086.
- Meyer Z., Tittingdorf J.M.W., Rexroth S. et al. The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected

- ted by the metabolic state. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*. 2004. Vol. 1659. P. 92–99.
- Mignolet E., Lecler R., Ghysels B. et al. Function of the chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase Nda2 for H₂ photoproduction in sulphur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 162. P. 81–88.
- Munekage Y., Hojo M., Meurer J. et al. PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in Arabidopsis. *Cell*. 2002. Vol. 110. P. 361–371.
- Mus F., Cournac L., Cardellini V. et al. Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et biophysica acta*. 2005. Vol. 1708. P. 322–332.
- Nawrocki W.J., Tourasse N.J., Taly A. et al. The plastid terminal oxidase: its elusive function points to multiple contributions to plastid physiology. *Annual Review of Plant Biology*. 2014. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114744>
- Noone S., Ratcliff K., Davis R. et al. Expression of a clostridial [FeFe]-hydrogenase in *Chlamydomonas reinhardtii* prolongs photo-production of hydrogen from water splitting. *Algal Research*. 2017. Vol. 22. P. 116–121.
- Noth J., Krawietz D., Hemschemeier A., Happe T. Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase is coupled to light-independent hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288. P. 4368–4377.
- Oey M., Ross I.L., Stephens E. et al. RNAi Knock-Down of LHCBM1, 2 and 3 Increases Photosynthetic H₂ Production Efficiency of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One*. 2013. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061375>
- Oey M., Sawyer A.L., Ross I.L., Hankamer B. Challenges and opportunities for hydrogen production from microalgae. *Plant Biotechnology Journal*. 2016. Vol. 14. P. 1487–1499.
- Oh Y.-K., Raj S.M., Jung G.Y., Park S. Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. *Bioresource Technology*. 2011. Vol. 102. P. 8357–8367.
- Peden E.A., Boehm M., Mulder D.W. et al. Identification of global ferredoxin interaction networks in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*. 2013. Vol. 288. P. 35192–35209.
- Peltier G., Aro E.M., Shikanai T. NDH-1 and NDH-2 plastoquinone reductases in oxygenic photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 2016. Vol. 67. P. 6.1–6.26.
- Philipps G., Krawietz D., Hemschemeier A., Happe T. A pyruvate formate lyase-deficient *Chlamydomonas reinhardtii* strain provides evidence for a link between fermentation and hydrogen production in green algae. *The Plant Journal*. 2011. Vol. 66. P. 330–340.
- Pinto T.S., Malcata F.X., Arrabaça J.D. et al. Rubisco mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* enhance photosynthetic hydrogen production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97. P. 5635–5643.
- Posewitz M.C., Smolinski S.L., Kanakagiri S. et al. Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. 2004. Vol. 16. P. 2151–2163.

- Rühle T., Hemschemeier A., Melis A., Happe T. A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains. *BMC Plant Biology*. 2008. Vol. 107. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-107>
- Saroussi S.I., Wittkopp T.M., Grossman A.R. The type II NADPH dehydrogenase facilitates cyclic electron flow, energy dependent quenching and chlororespiratory metabolism during acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation. *Plant Physiology*. 2016. URL: <https://doi.org/10.1104/pp.15.02014>
- Scoma A., Giannelli L., Faraloni C., Torzillo G. Outdoor H₂ production in a 50-l tubular photobioreactor by means of a sulfur-deprived culture of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*. 2012a. Vol. 157. P. 620–627.
- Scoma A., Krawietz D., Faraloni C. et al. Sustained H₂ production in a *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. *Journal of Biotechnology*. 2012b. Vol. 157. P. 613–619.
- Steinbeck J., Nikolova D., Weingarten R. et al. Deletion of Proton Gradient Regulation 5 (PGR5) and PGR5-Like 1 (PGRL1) proteins promote sustainable light-driven hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* due to increased PSII activity under sulfur deprivation. *Frontiers in Plant Science*. 2015. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00892>
- Sun M., Chen H., Yang J. et al. Enhanced H₂ photo-production by downregulation of ferredoxin-NADP⁺ reductase (FNR) in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2013. Vol. 38. P. 16029–16037.
- Takahashi H., Clowes S., Wollman F.-A. et al. Cyclic electron flow is redox-controlled but independent of state transition. *Nature Communications*. 2013. URL: <https://doi.org/10.1038/ncomms2954>
- Terashima M., Specht M., Hippler M. The chloroplast proteome: a survey from the *Chlamydomonas reinhardtii* perspective with a focus on distinctive features. *Current Genetics*. 2011. Vol. 57. P. 151–168.
- Terauchi A.M., Lu S.-F., Zaffagnini M. et al. Pattern of expression and substrate specificity of chloroplast ferredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284. P. 25867–25878.
- Tolletier D., Ghysels B., Alric J. et al. Control of Hydrogen Photoproduction by the Proton Gradient Generated by Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*. 2011. Vol. 23. P. 2619–2630.
- Torzillo G., Scoma A., Faraloni C. et al. Increased hydrogen photoproduction by means of a sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. 2009. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.093>
- Trouillard M., Shahbazi M., Moyet L. Kinetic properties and physiological role of the plastoquinone terminal oxidase (PTOX) in a vascular plant. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*. 2012. Vol. 1817. P. 2140–2148.
- Volgusheva A., Styring S., Mamedov F. Increased photosystem II stability promotes H₂ production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. Vol. 110, N 18. P. 7223–7228.
- Wagner V., Ullmann K., Mollwo A. et al. The phosphoproteome of a *Chlamydomonas reinhardtii* eyespot fraction includes key proteins of the light signaling pathway. *Plant Physiology*. 2007. Vol. P. 146772–146788.

- Wei L., Derrien B., Gautier A. et al. Nitric oxide-triggered remodeling of chloroplast bioenergetics and thylakoid proteins upon nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*. 2014. Vol. 26. P. 353–372.
- White S., Anandraj A., Trois C. NADPH Fluorescence as an indicator of hydrogen production in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. 2013. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jhydene.2013.11.016>
- Whitney L.A., Loreti E., Alpi A., Perata P. Alcohol dehydrogenase and hydrogenase transcript fluctuations during a day-night cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*: the role of anoxia. *New Phytology*. 2011. Vol. 190. P. 488–498.
- Wykoff D.D., Davies J.P., Melis A., Grossman A. The effects of phosphorus and sulfur deprivation on photosynthetic electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 1998. Vol. 117. P. 129–139.
- Yang W., Wittkopp T.M., Li X. et al. Critical role of *Chlamydomonas reinhardtii* ferredoxin-5 in maintaining membrane structure and dark metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015. Vol. 112. P. 14978–14983.
- Yu Q., Feilke K., Krieger-Liszka A., Beyer P. Functional and molecular characterization of plastid terminal oxidase from rice (*Oryza sativa*). *Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics*. 2014. Vol. 1837. P. 1284–1292.
- Zhang L., Melis A. Probing green algal hydrogen production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*. 2002. Vol. 357. P. 1499–14509.
- Zhang Z., Shrager J., Jain M. et al. Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression. *Eukaryotic Cell*. 2004. Vol. 3. P. 1331–1348.
- Zones J.M., Blaby I.K., Merchant S.S., Umen J.G. High-resolution profiling of a synchronized diurnal transcriptome from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals continuous cell and metabolic differentiation. *The Plant Cell*. 2015. Vol. 27. P. 2743–2769.

До розділу 5

- Золотарьова О., Шнюкова Є. Куди прямує біопаливна індустрія? *Вісник НАН України*. 2010. № 4. С. 10–20.
- Золотарьова О.К., Шнюкова Є.І., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. Перспективи використання мікрроводоростей у біотехнології. Київ: Альтерпрес, 2008. 243 с.
- Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф., Золотарьова О.К. Цукри як ключова ланка в регуляції метаболізму фотосинтезуючих клітин. *Український ботанічний журнал*. 2001. Т. 58, № 3. С. 121–127.
- Соловченко А.Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах. *Физиология растений*. 2012. Т. 59. С. 192–202.
- Степанов С.С., Золотарьова О.К. Метаболічний шлях метанолу у рослин. *Український біохімічний журнал*. 2011. Т. 83, № 4. С. 5–15.
- Austin J.R., Frost E., Vada A. et al. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell*. 2006. Vol. 18. P. 1693–1703.

- Ball S., Marianne T., Dirick L. et al. *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta*. 1991. Vol. 185, N 1. P. 17–26.
- Brehelin C., Kessler F., van Wijk K.J. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science*. 2007. Vol. 12. P. 260–266.
- Brett M., Muller N.D. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*. 1997. Vol. 38, N 3. P. 483–499.
- Brown L.M., Zeiler K.G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Conversion and Management*. 1993. Vol. 34. P. 1005–1013.
- Cakmak T., Angun P., Ozkan A.D. et al. Nitrogen and sulfur deprivation differentiate lipid accumulation targets of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioengineered bugs*. 2012. Vol. 3. P. 343–346.
- Cardozo K.H.M., Guaratini T., Barros M.P. et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology*. 2007. Vol. 146. P. 60–78.
- Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 2007. Vol. 25. P. 294–306.
- Deng X.D., Li Y.J., Fei X.W. Microalgae: A promising feedstock for biodiesel. *African journal of Microbiology Research*. 2009. Vol. 3. P. 1008–1014.
- Deng X., Fei X., Li Y. The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *Biotechnology Advances*. 2011. Vol. 5. P. 260–270.
- Docampo R., Ulrich P., Moreno S.N.J. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2010. Vol. 365. P. 775–784.
- Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A. et al. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*. 2005. Vol. 46. P. 839–862.
- Fan J., Yan C., Andre C. et al. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiology*. 2012. Vol. 53, N 8. P. 1380–1390.
- Fan Y., Chapkin R. Importance of dietary α -linolenic acid in human health and nutrition. *Journal of Nutrition*. 1998. Vol. 128. P. 1411–1414.
- Froissard M., D'andre'a S., Boulard C., Chardot T. Heterologous expression of AtClo1, a plant oil body protein, induces lipid accumulation in yeast. *FEMS Yeast Research*. 2009. Vol. 9. P. 428–438.
- Fujimoto T., Ohsaki Y. Cytoplasmic lipid droplets. Rediscovery of an old structure as a unique platform. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006. Vol. 1086. P. 104–115.
- Goodson C., Roth R., Wang Z.T., Goodenough U. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryotic Cell*. 2011. Vol. 10, N 12. P. 1592–1606.
- Grossman A.R. *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: genetics to genomics. *Current Opinion in Plant Biology*. 2000. Vol. 3. P. 132–137.
- Guschina I.A., Harwood J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*. 2006. Vol. 45. P. 160–186.
- Guschina I.A., Harwood J.L. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Dordrecht; Heidelberg; London; New York: Springer-Verlag, 2009. P. 1–24.

- Hansen J., Shade D., Harris C. et al. Docosahexaenoic acid plus arachidonic acid enhance preterm infant growth. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 1997. Vol. 57. 196 p.
- Harwood J.L., Jones A.L. Lipid metabolism in algae. *Advances in Botanical Research*. 1989. Vol. 16. P. 1–53.
- Harwood J.L., Scrimgeour C.M. Fatty acid and lipid structure. The Lipid Handbook; eds F.D. Gunstone, A.J. Dijkstra. Boca Raton: Taylor and Francis Group, CRC Press. 2007. P. 1–36.
- Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E. et al. Microalgal triacylglycerols as feed-stocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*. 2008. Vol. 54. P. 621–639.
- Kessler F., Vidi P.A. Plastoglobule lipid bodies: their functions in chloroplasts and their potential for applications. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*. 2007. Vol. 107. P. 153–172.
- Kim S., Kim H., Ko D. et al. Rapid induction of lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by Brefeldin A. *Plos One*. 2013. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081978>
- Kreimer G. The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more. *Current Genetics*. 2009. Vol. 55. P. 19–43.
- Kruse O., Rupprecht J., Mussgnug J.H. et al. Photosynthesis: A blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2005. Vol. 4, N 12. P. 957–970.
- Li Y., Han D., Hu G. et al. Chlamydomonas starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyperaccumulates triacylglycerol. *Metabolic Engineering*. 2010. Vol. 12. P. 387–391.
- Li-Beisson Y., Beisson F., Riekhof W. Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*. 2015. Vol. 82. P. 504–522.
- Liu B.S., Benning C. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013. Vol. 24. P. 300–309.
- Marshall W.F. Basal bodies: Platforms for building cilia. *Current Topics in Developmental Biology*. 2008. Vol. 85. P. 1–22.
- Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O. et al. The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 2007. Vol. 318. P. 245–250.
- Miller R., Wu G., Deshpande R.R. et al. Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiology*. 2010. Vol. 154, N 4. P. 1737–1752.
- Min S.K., Yoon G.H., Joo J.H. et al. Mechanosensitive physiology of *Chlamydomonas reinhardtii* under direct membrane distortion. *Scientific Reports*. 2014. Vol. 4. P. 4675. URL: <https://doi.org/10.1038/srep04675>
- Moellering E.R., Benning C. RNA interference silencing of a major lipid droplet protein affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*. 2010. Vol. 9, N 1. P. 97–106.
- Msanne J., Konda Xu.D., Casas-Mollano A.R. et al. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically

- grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry*. 2012. Vol. 75. P. 50–59.
- Murphy D.J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants, and microorganisms. *Progress in Lipid Research*. 2001. Vol. 40. P. 325–438.
- Mutanda T., Ramesh D., Karthikeyan S. et al. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*. 2011. Vol. 102. P. 57–70.
- Mykhaylenko N.F., Syvash O.O., Tupik N.D., Zolotareva O.K. Exogenous hexoses cause quantitative changes of pigment and glycerolipid composition in filamentous cyanobacteria. *Photosynthetica*. 2004. Vol. 42, N 1. P. 105–110.
- Ohad I., Siekevitz P., Palade G.E. Biogenesis of chloroplast membranes. 1. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii*). *Journal of Cell Biology*. 1967. Vol. 35. P. 521–552.
- Oswald W.J., Golueke C.G. Biological transformation of solar energy. *Advances in Applied Microbiology*. 1960. Vol. 11. P. 223–242.
- Park J.B.K., Craggs R.J., Shilton A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*. 2011. Vol. 102. P. 35–42.
- Pittman J.K., Dean A.P., Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*. 2011. Vol. 102. P. 17–25.
- Poxleitner M., Rogers S.W., Samuels A.L. et al. A role for caleosin in egradation of oil-body storage lipid during seed germination. *Plant Journal*. 2006. Vol. 47. P. 917–933.
- Ramanan R., Kim B.H., Cho D.H. et al. Lipid droplet synthesis is limited by acetate availability in starchless mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*. 2013. Vol. 587, N 4. P. 370–377.
- Rochaix J.D. *Chlamydomonas*, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes. *FEBS Letters*. 2002. Vol. 529, N 1. P. 34–38.
- Sager R., Palade G.E. Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. The normal green cell. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1957. Vol. 3. P. 463–488.
- Schmidt M., Gessner G., Luff M. et al. Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *The Plant Cell*. 2006. Vol. 18, N 8. P. 1908–1930.
- Shank K.J., Su P., Brglez I. et al. Induction of lipid metabolic enzymes during the endoplasmic reticulum stress response in plants. *Plant Physiology*. 2001. Vol. 126. P. 267–277.
- Sharma K.K., Schuhman H., Schenk P.M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*. 2012. Vol. 5, N 5. P. 1532–1553.
- Siaut M., Cuine S., Cagnon C. et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*. 2011. Vol. 11. P. 7–22.
- Siloto M.P., Findlay K., Lopez-Villalobos A. et al. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 1961. Vol. 18. P. 1961–1964.

- Singh A., Nigam P.S., Murphy J.D. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresource Technology*. 2011. Vol. 102. P. 26–34.
- Small D. A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1968. Vol. 45. P. 108–119.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. The effect of methanol on photosynthetic activity and productivity *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (Chlorophyta). *International Journal on Algae*. 2011. Vol. 21, N 2. P. 178–190.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 2015. Vol. 27, N 4. P. 1509–1516.
- Tauchi-Sato K., Ozeki S., Houjou T. et al. The surface of lipid droplets is a phospholipid mono-layer with a unique fatty acid composition. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277. P. 44507–44512.
- Thiele C., Spandi J. Cell biology of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008. Vol. 20. P. 378–386.
- Thompson G. Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et biophysica acta*. 1996. Vol. 1302. P. 17–45.
- Walther T.C., Farese R.V. The life of lipid droplets. *Biochimica et biophysica acta*. 2009. Vol. 1791. P. 459–466.
- Wang Z.T., Ullrich N., Joo S. et al. Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*. 2009. Vol. 8. P. 1856–1868.
- Wasw N., Black P., Stanley B., DiRusso C. Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling. *Journal of Proteome Research*. 2014. Vol. 13. P. 1373–1396.
- Work V.H., Radakovits R., Jinkerson R.E. et al. Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eukaryot Cell*. 2010. Vol. 9. P. 1251–1261.
- Zabawinska C., Van den Koornhuysse N.D., Hulst C. et al. Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Bacteriology*. 2001. Vol. 183, N 3. P. 1069–1077.
- Zolotareva E.K., Shniukova E.I., Podorvanov V.V. Microalgae as hydrogen producers. *International Journal on Algae*. 2010. Vol. 12, N 3. P. 199–220.

До розділу 6

- Шнюкова Е.И., Золотарева Е.К. Экзополисахариды диатомовых водорослей (*Bacillariophyta*). *Альгология*. 2015. Т. 25, № 1. С. 1–20.
- Шнюкова Е.И., Золотарева Е.К. Экологическая роль экзополисахаридов (*Bacillariophyta*). *Альгология*. 2017. Т. 27, № 1. С. 22–44.
- Abdullahi A.S., Underwood G.J. C., Gretz M.R. Extracellular matrix assembly in diatoms (*Bacillariophyceae*). 5. Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Phycology*. 2006. Vol. 42. P. 363–378.

- Adams J.M., Gallagher J.A., Donnison I.S. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *Journal of Applied Phycology*. 2009. Vol. 21, N 5. P. 569.
- Al Abdallah Q., Nixon B.T., Fortwendel J.R. The enzymatic conversion of major algal and cyanobacterial carbohydrates to bioethanol. *Frontiers in Energy Research*. 2016. Vol. 4. P. 36. doi: 10.3389/fenrg.2016.00036
- Ale M.T., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*. 2011. Vol. 9. P. 2106–2130.
- Ale M.T., Meyer A.S. Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Advances*. 2013. Vol. 3. P. 8131–8141.
- Aquino R.S., Landeira-Fernandez A.M., Valente A.P. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology*. 2005. Vol. 15. P. 11–20.
- Arata P.X., Alberghina J., Confalonieri V. et al. Sulfated polysaccharides in the freshwater green macroalga *Cladophora surera* not linked to salinity adaptation. *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. Art. 1927. doi:10.3389/fpls.2017.01927
- Arlov Ø. Heparin analogs created by sulfation of alginates using a chemoenzymatic strategy: Trondheim, Norway: Norwegian Univ. of Sci. and Technol., 2012. 74 p.
- Barsanti L., Vismara R., Passarelli V., Gualtieri P. Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSI mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*. 2001. Vol. 13. P. 59–65.
- Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V. et al. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. *Natural Product Reports*. 2011. Vol. 28. P. 457–466.
- Baumer D., Preisfeld A., Ruppel H.G. Isolation and characterization of paramylon synthase from *Euglena gracilis* (EUGLENOPHYCEAE). *Journal of Phycology*. 2001. Vol. 37. P. 38–46.
- Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydrate Research*. 2006. Vol. 341. P. 238–245.
- Bilan M.I., Vinogradova E.V., Shashkov A.S., Usov A.I. Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Carbohydrate Research*. 2007. Vol. 342. P. 586–596.
- Brownlee C. Role of the extracellular matrix in cell-cell signalling: paracrine paradigms. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002. Vol. 5. P. 396–401.
- Gacesa P. Alginates. *Carbohydrate Polymers*. 1988. Vol. 8. P. 161–182.
- Chang L., Sui Z., Fu F. et al. Relationship between gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase and agar yield in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*. 2014. Vol. 26, N 6. P. 2435–2441.
- Collén J., Cornish M.L., Craigie J. et al. *Chondrus crispus* — a present and historical model organism for red seaweeds. *Advances in Botanical Research*. 2014. Vol. 71. P. 53–89.

- Da Silva Vaz B., Botelho Moreira J., Greque de Moraes M., Vieira Costa J.A. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. *Current Opinion in Food Science*. 2016. Vol. 7. P. 73–77.
- De Farias Silva C.E., Sforza E., Bertuccio A. Stability of carbohydrate production in continuous microalgal cultivation under nitrogen limitation: effect of irradiation regime and intensity on *Tetradesmus obliquus*. *Journal of Applied Phycology*. 2018. Vol. 30, N 1. P. 261–270.
- De Jesús Paniagua-Michel J., Olmos-Soto J., Morales-Guerrero E.R. Algal and microbial exopolysaccharides: new insights as biosurfactants and bioemulsifiers. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2014. Vol. 73. P. 221–257.
- Deniaud-Bouët E., Kervarec N., Michel G. et al. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Annals of Botany*. 2014. Vol. 114. P. 1203–1216.
- Deniaud-Bouët E., Hardouin K., Potin P. et al. A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydrate Polymers*. 2017. Vol. 175. P. 395–408.
- Domozych D.S., Ciancia M., Fangel J.U. et al. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Frontiers in Plant Science*. 2012. Vol. 3. P. 82. doi:10.3389/fpls.2012.00082.
- Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Schorr-Galindo S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 87, N 2. P. 951–962.
- Doyle J.W., Roth T.P., Smith R.M. et al. Effects of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research. A*. 1996. Vol. 32. P. 561–568.
- Draget K.I., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. et al. Alginates from Algae. Polysaccharide and polyamides in the food industry; eds A. Streibüchel, A. Rhee. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany. 2005. P. 1–30. doi:10.1002/3527600035.bpol6008
- Eroglu E., Melis A. Photobiological hydrogen production: recent advances and state of the art. *Bioresour Technol*. 2011. Vol. 102. P. 8403–8413.
- Ficko-Blean E., Herve C., Michel G. Sweet and sour sugar from the sea: the biosynthesis and remodeling of sulfated cell wall polysaccharides from marine. *Perspectives in Phycology*. 2015. Vol. 2. P. 51–64.
- Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*. 1998. Vol. 281, N 5374. P. 237–240.
- Florez N., Gonzalez-Munoz M.J., Ribeiro D. et al. Algae Polysaccharides' chemical characterization and their role in the inflammatory process. *Current Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 24. P. 149–175.
- Gügi B., Le Costaouec T., Burel C. et al. Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13. P. 5993–6018.
- Guibet M., Boulenguer P., Mazoyer J. et al. Composition and distribution of carrabiose moieties in hybrid κ - ι -carrageenans using carrageenases. *Biomacromolecules*. 2007. Vol. 9. P. 408–415.
- Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewar H.E. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*. 2011. Vol. 9, N 2. P. 196–223.

- Haferkamp I., Deschamps P., Ast M. et al. Molecular and Biochemical Analysis of Periplastidial Starch Metabolism in the Cryptophyte *Guillardia Theta*. *Eukaryotic Cell*. 2006. Vol. 5, N 6. P. 964—971.
- Harris E.H. The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. San Diego: Academic, 1989. P. 222—225.
- Holdt S., Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*. 2011. Vol. 23. P. 543—597.
- Kiss J.Z., Vasconcelos A.C., Triemer R.E. The intramembranous particle profile of the paramylon membrane during paramylon synthesis in EUGLENA (EUGLENOPHYCEAE). *Journal of Phycology*. 1988. Vol. 24, N 2. P. 152—157.
- Lahaye M., Robic A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*. 2007. Vol. 8. P. 1765—1774.
- Lechat H., Amat M., Mazoyer J. et al. Cell wall composition of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) partitioned by wet sieving. *Journal of Applied Phycology*. 1997. Vol. 9, N 6. P. 565—573.
- Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012. Vol. 37. P. 106—126.
- Lee W.K., Lim Y.Y., Leow A.T.C. et al. Biosynthesis of agar in red seaweeds. A review. *Carbohydrate Polymers*. 2017. Vol. 164. P. 23—30.
- Mabeau S., Kloareg B., Joseleau J-P. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry*. 1990. Vol. 29. P. 2441—2445.
- Maeda H., Yamamoto R., Hirao K., Tochikubo O. Effects of agar (kanten) diet on obese patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2005. Vol. 7. P. 40—46.
- McCandless E.L., Craigie J.S. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Annual Review of Plant Physiology*. 1979. Vol. 30. P. 41—53.
- Michel G., Tonon T., Scornet D. et al. Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *The New Phytologist*. 2010. Vol. 188. P. 67—81.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk A.V., Zolotareva E.K. Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. Vol. 52, N 2. P. 216—221.
- Mokrosnop V.M. Production of Storage Polysaccharide Paramylon in Microalga *Euglena gracilis* Klebs (Euglena, Euglenophyceae). *International Journal on Algae*. 2018. Vol. 20, N 2. P. 153—166.
- Pal R., Choudhury A.K. Phytoplanktons and Primary Productivity. An Introduction to Phytoplanktons: Diversity and Ecology. New Delhi: Springer, 2014. P. 55—57.
- Pankiewicz R., Leska B., Messyasz B. et al. First isolation of polysaccharideic ulvans from the cell walls of fresh water algae. *Algal Research*. 2015. Vol. 19. P. 348—354.
- Paradossi G., Cavalieri F., Chiessi E. A conformational study on the algal polysaccharide ulvan. *Macromolecules*. 2002. Vol. 35. P. 6404—6411.
- Patel S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *Biotechnology*. 2012. Vol. 2. P. 171—185.

- Pomin V.H., Mourão P.A.S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*. 2008. Vol. 18, N 12. P. 1016–1027.
- Usov P.A.S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*. 2008. Vol. 18. P. 1016–1027.
- Qi H., Sun Y. Antioxidant activity of high sulfate content derivative of ulvans in hyperlipidemic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015. Vol. 76. P. 326–329.
- Ral J.P., Colleoni C., Wattebled F. et al. Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2006. Vol. 142, N 1. P. 305–317.
- Robic A., Gaillard C., Sassi J.-F. Ultrastructure of ulvan: a polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers*. 2009. Vol. 91. P. 652–664.
- Rocha de Souza M.C., Marques C.T., Guerra Dore C.M. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 2007. Vol. 19. P. 153–160.
- Ruocco N., Costantini S., Guariniello S., Costantini M. Polysaccharides from the marine environment with pharmacological, cosmeceutical and nutraceutical potential. *Molecules*. 2016. Vol. 21. P. 551. doi:10.3390/molecules21050551
- Shnyukova E.I., Zolotareva E.K. Diatom exopolysaccharides: A review. *International Journal on Algae*. 2015. Vol. 17, N 1. P. 50–67.
- Shnyukova E.I., Zolotareva E.K. Ecological Role of Exopolysaccharides of Bacillariophyta: A Review. *International Journal on Algae*. 2017. Vol. 19, N 1. P. 5–24.
- Singh S., Kate B.N., Banerjee U.C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2005. Vol. 25. P. 73–95.
- Skriptsova A., Shevchenko N., Zvyagintseva T., Imbs T. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidans from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology*. 2010. Vol. 22. P. 79–86.
- Skriptsova A.V. Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russian Journal Marine Biology*. 2015. Vol. 41. P. 145–156.
- Smith A.M., Denyer K., Martin C. The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1997. Vol. 48. P. 67–87.
- Smith D.J., Underwood G.J.C. The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology*. 2000. Vol. 36. P. 321–333.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 2015. Vol. 27. P. 1509–1516.
- Ueno M., Hiroki T., Takeshita S. et al. Comparative study on antioxidative and macrophage-stimulating activities of polyguluronic acid (PG) and polymannuronic acid (PM) prepared from alginate. *Carbohydrate Research*. 2012. Vol. 352. P. 88–93.
- Underwood G.J., Boulcott M., Raines C.A., Waldron K. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in

- composition, and pathways of production. *Journal of Phycology*. 2004. Vol. 40, N 2. P. 293—304.
- Urbani R., Magaletti E., Sist P., Cicero A.M. Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: effect of P-depletion and growth status. *The Science of the Total Environment*. 2005. Vol. 353. P. 300—306.
- Usov A.I. Polysaccharides of the red algae. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 2011. Vol. 65. P. 115—217.
- Usov A.I., Bilan M.I. Fucoidans — sulfated polysaccharides of brown algae. *Russian Chemical Reviews*. 2009. Vol. 78. P. 785—799.
- Van De Velde F., Knutsen S.H., Usov A.I. et al. H-1 and C-13 high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*. 2002. Vol. 13. P. 73—92.
- Venkatesan J., Lowe B., Anil S. et al. Seaweed polysaccharides and their potential biomedical applications. *Starch*. 2015. Vol. 67. P. 381—390.
- Viola R., Nyvall P., Pedersén M. The unique features of starch metabolism in red algae. *Proceedings of the Royal Society B: biological sciences*. 2001. Vol. 268. P. 1417—1422.
- Wang Y., Chert Y., Lavin C., Gretz M.R. Extracellular matrix assembly in diatoms (*Bacillariophyceae*). 4. Ultrastructure of *Achnanthes longipes* and *Cymbella cistula* as revealed by high-pressure freezing/freeze substitution and cryo-field emission scanning electron microscopy. *Journal of Phycology*. 2000. Vol. 3. P. 367—378.
- Wells M.L., Potin P., Craigie J.S. et al. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*. 2017. Vol. 29. P. 949—982.
- Yaich H., Garna H., Besbes S. et al. Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulvalactuca* of Tunisia coast. *Food Hydrocolloids*. 2014. Vol. 40. P. 53—63.
- Xiao R., Zheng Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*. 2016. Vol. 34. P. 1225—1244.
- Zhu Z., Zhang Q., Chen L. et al. Higher specificity of the activity of low molecular weight fucoidan for thrombin-induced platelet aggregation. *Thrombosis Research*. 2010. Vol. 125. P. 419—426.
- Zabawinski C., Van Den K.N., D'Hulst C. et al. Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Bacteriology*. 2001. Vol. 183. P. 1069—1077.
- Zolotareva E.K., Shnyukova E.I., Podorvanov V.V. Microalgae as hydrogen producers. *International Journal on Algae*. 2010. Vol. 12. P. 199—220.

До розділу 7

Золотарьова О.К., Шнюкова Є.І., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. Перспективи використання мікрроводоростей у біотехнології. Київ: Альтерпрес, 2008. 234 с.

- Мокросноп В.М., Поліщук О.В., Золотарьова О.К. Вплив етанолу на дихання і фотосинтез *Euglena gracilis*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2015а. Т. 27, № 3. С. 49—56.
- Мокросноп В.М., Поліщук О.В., Золотарьова О.К. Функціональний стан фотосинтетичного апарату клітин *Euglena gracilis* при міксотрофному культивуванні. *Доповіди НАН України*. 2015б. № 10. С. 77—84.
- Шнюкова Е.И., Золотарева Е.К. Экзополисахариды диатомовых водорослей (*Bacillariophyta*). *Альгология*. 2015. Т. 25, № 1. С. 1—20.
- Шнюкова Е.И., Золотарева Е.К. Экологическая роль экзополисахаридов (*Bacillariophyta*). *Альгология*. 2017. Т. 27, № 1. С. 22—44.
- Ahmadinejad N., Dagan T., Martin W. Genome history in the symbiotic hybrid *Euglena gracilis*. *Gene*. 2007. Vol. 402, N 1. P. 35—39.
- Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V. et al. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. *Natural Product Reports*. 2011. Vol. 28. P. 457—466.
- Barsanti L., Vismara R., Passarelli V., Gualtieri P. Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSI mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*. 2001. Vol. 13. P. 59—65.
- Bashir K.M.I., Choi J.S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: the past, present, and future. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. Vol. 18, N 9. P. 1906.
- Baumer D., Preisfeld A., Ruppel H.G. Isolation and characterization of paramylon synthase from *Euglena gracilis* (*Euglenophyceae*). *Journal of Phycology*. 2001. Vol. 37. P. 38—46.
- Briand J., Calvayrac R. Paramylon synthesis in heterotrophic and photoheterotrophic *Euglena* (*Euglenophyceae*). *Journal of Phycology*. 1980. Vol. 16, N 2. P. 234—239.
- Briand J., Calvayrac R., Laval-Martin D., Farineau J. Evolution of carboxylating enzymes involved in paramylon synthesis in heterotrophically grown *Euglena gracilis*. *Planta*. 1981. Vol. 151. P. 168—175.
- Calvayrac R., Laval-Martin D., Briand J., Farineau J. Paramylon synthesis by *Euglena gracilis* photoheterotrophically grown under low O₂ pressure. *Planta*. 1981. Vol. 153. P. 6—13.
- Cheirsilp B., Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology*. 2012. Vol. 110. P. 510—516.
- Coleman L.W., Rosen B.H., Schwartzbach S.D. Environmental control of carbohydrate and lipid in *Euglena*. *Plant and Cell Physiology*. 1988а. Vol. 29, N 3. P. 423—432.
- Coleman L.W., Rosen B.H., Schwartzbach S.D. Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *Plant and Cell Physiology*. 1988b. Vol. 29, N 3. P. 423—432.
- Cook J.R. Adaptations in growth and division in *Euglena* effected by energy supply. *The Journal of Protozoology*. 1963. Vol. 10. P. 436—444.
- Cook J.R. Influence of light on acetate utilization in green *Euglena*. *Plant and Cell Physiology*. 1965. Vol. 6. P. 301—307.
- Freimund S., Sauter M., Kappeli O., Dutler H. A new non-degrading isolation process for 1,3-beta-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*. 2003. Vol. 54. P. 159—171.

- Garlaschi F.M., Garlaschi A.M., Lombardi A., Forti G. Effect of ethanol on the metabolism of *Euglena gracilis*. *Plant Science Letters*. 1974. Vol. 2. P. 29–39.
- Grimm P., Risse J.M., Cholewa D. et al. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *Journal of Biotechnology*. 2015. Vol. 215. P. 72–79.
- Hutner S.H., Zahalsky A.C., Aaronson S. et al. Culture media for *Euglena gracilis*. *Methods in Cell Physiology*. 1966. Vol. 2. P. 217–228.
- Ivusic F., Santek B. Optimization of complex medium composition for heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* and paramylon production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2015. Vol. 38, N 6. P. 1103–1112.
- Kiss J.Z., Vasconcelos A.C., Triemer R.E. Paramylon synthesis and chloroplast structure associated with nutrient levels in *Euglena* (*Euglenophyceae*). *Journal of Phycology*. 1986. Vol. 22. P. 327–333.
- Kiss J.Z., Vasconcelos C.A., Triemer R.E. The intramembrane particle profile of the paramylon membrane during paramylon synthesis in *Euglena* (*Euglenophyceae*). *Journal of Phycology*. 1988. Vol. 24. P. 152–157.
- Marechal L.R., Goldemberg S.H. Uridine diphosphate glucose-beta-1,3-glucan beta-3-glucosyltransferase from *Euglena gracilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 1964. Vol. 239, N 10. P. 3163–3167.
- Marzullo G., Danforth W.F. Composition of ethanol-insoluble assimilatory products of oxidative assimilation of acetate by *Euglena gracilis*. *Journal of General Microbiology*. 1964. Vol. 34. P. 21–29.
- Michel G., Tonon T., Scornet D. et al. Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytologist*. 2010. Vol. 188, N 1. P. 67–81.
- Mokrosnop V.M., Zolotareva E.K. Microalgae as tocopherol producers. *Biotechnology acta*. 2014. Vol. 7, N 2. P. 26–33.
- Mokrosnop V.M. Dynamics of chlorophyll and paramylon accumulation in *Euglena gracilis* cells at mixotrophic cultivation. *Studia Biologica*. 2016. Vol. 10, N 3. P. 141–148.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk A.V., Zolotareva E.K. Accumulation of β -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and Mixotrophic Culture Conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. Vol. 52, N 2. P. 216–221.
- Mykhaylenko N.F., Syvash O.O., Tupik N.D., Zolotareva O.K. Exogenous hexoses cause quantitative changes of pigment and glycerolipid composition in filamentous cyanobacteria. *Photosynthetica*. 2004. Vol. 42, N 1. P. 105–110.
- Nicolas P., Freyssinet G., Nigon V. Effect of light on glucose utilization by *Euglena gracilis*. *Plant Physiology*. 1980. Vol. 65. P. 631–634.
- O'Neill E.C., Trick M., Hill L. et al. The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Molecular BioSystems*. 2015. Vol. 11. P. 2808–2820.
- Ogbonna J.C., Ichige E., Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 58. P. 532–538.

- Rezic T., Filipovic J., Santek B. Photo-mixotrophic cultivation of algae *Euglena gracilis* for lipid production. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2013. Vol. 78. P. 65—69.
- Rodriguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernandez G., Moreno-Sanchez R. Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *Journal of Applied Microbiology*. 2010. Vol. 109. P. 2160—2172.
- Sanrek B., Felski M., Friehs K. et al. Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on potato liquor. *Engineering in Life Sciences*. 2010. Vol. 10, N 2. P. 165—170.
- Sanrek B., Felski M., Friehs K. et al. Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic medium. *Engineering in Life Sciences*. 2009. Vol. 9, N 1. P. 23—28.
- Shokri H., Asadi F., Khosravi A.R. Isolation of beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Natural Product Research*. 2008. Vol. 22, N 5. P. 414—421.
- Sivash A.A., Los S.I., Fomishina R.N., Zolotareva E.K. Regulatory role of glucose in metabolism of certain *Cyanophyta* representatives. *International Journal on Algae*. 2004. Vol. 6, N 1. P. 50—60.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. Methanol metabolism in plants. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2011. Vol. 83, N 4. P. 5—15.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 2015. Vol. 27, N 4. P. 1509—1516.
- Takeda T., Nakano Y., Takahashi M. et al. Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Euglena gracilis*. *Phytochemistry*. 2015. Vol. 116. P. 21—27.
- Takeyama H., Kanamaru A., Yoshino Y. et al. Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnology and Bioengineering*. 1997. Vol. 53. P. 185—190.
- Yamane Y., Utsunomiya T., Watanabe M., Sasaki K. Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics. *Biotechnology Letters*. 2001. Vol. 23. P. 1223—1228.
- Yoval-Sanchez B., Jasso-Chavez R., Lira-Silva E. et al. Novel mitochondria alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2011. Vol. 43. P. 519—530.

До розділу 8

- Abbasi A. Functional analysis of tocopherol biosynthesis in plants. AUS Tehran: JRJ, 2007. 171 p.
- Abd El-Baky H., Farouk K., El-Baz G.S., El-Baroty G.S. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2004. Vol. 6, N 1. P. 49—57.
- Afiukwa C., Ogbonna J. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*. *African Journal of Biotechnology*. 2007. Vol. 6, N 22. P. 2612—2615.

- Backasch N., Schulz-Friedrich R., Appel J. Influences on tocopherol biosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Plant Physiology*. 2005. Vol. 162, N 7. P. 758—766.
- Blokhina O. Anoxia and oxidative stress: lipid peroxidation, antioxidant status and mitochondrial functions in plants: academic dissertation. Helsinki: Univ. of Helsinki, 2000. P. 79.
- Carballo-Cardenas E., Tuan P., Janssen M., Wijffels R. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*. 2003. N 20. P. 139—147.
- Chaudhary N., Khurana P. Cloning, functional characterisation and transgenic manipulation of vitamin E biosynthesis genes of wheat. *Functional Plant Biology*. 2013. Vol. 40. P. 1129—1136.
- De Roeck-Holtzhauer Y., Quere I., Claire C. Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga. *Journal of Applied Phycology*. 1991. Vol. 3, N 3. P. 259—264.
- DellaPenna D., Barry P. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Physiology*. 2006. Vol. 57. P. 711—738.
- Durmaz Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by marine microalgae *Nanochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture*. 2007. N 272. P. 717—722.
- Espinoza A., San Martín A., López-Climent M. et al. Engineered drought-induced biosynthesis of α -tocopherol alleviates stress-induced leaf damage in tobacco. *Journal of Plant Physiology*. 2013. Vol. 170. P. 1285—1294.
- Farré G., Sudhakar D., Naqvi S. et al. Transgenic rice grains expressing a heterologous phydroxyphenylpyruvate dioxygenase shift tocopherol synthesis from the γ to the α isoform without increasing absolute tocopherol levels. *Transgenic Research*. 2012. Vol. 21. P. 1093—1097.
- Friedrich W. Vitamins. Berlin: Walter de Gruyter, 1988. 1058 p.
- Fujita T., Aoyagi H., Ogbonna J., Tanaka H. Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008. Vol. 79, N 3. P. 371—378.
- Furuya T., Yoshikawa T., Kimura T., Kaneko H. Production of tocopherols by cell culture of safflower. *Phytochemistry*. 1987. Vol. 26. P. 2741—2747.
- Häubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijs P. Abiotic stress modifies the synthesis of alpha-tocopherol and beta-carotene in phytoplankton species. *Journal of Phycology*. 2014. Vol. 50, N 4. P. 753—759.
- Henry V., Qungang Q. Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. Vol. 68. P. 436—444.
- Herrero C., Abalde J., Fábregas J. β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*. 1991. Vol. 38, N 2—3. P. 121—125.
- Inoue S., Ejima K., Iwai E. et al. Protection by α -tocopherol of the repair of photosystem II during photoinhibition in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et biophysica acta*. 2011. Vol. 1807. P. 236—241.
- Jiang J., Jia H., Feng G. et al. Overexpression of *Medicago sativa* TMT elevates the α -tocopherol content in *Arabidopsis* seeds, alfalfa leaves, and delays dark-induced leaf senescence. *Plant Science*. 2016. Vol. 249. P. 93—104.

- Jin S., Daniell H. Expression of γ -tocopherol methyltransferase in chloroplasts in massive proliferation of the inner envelope membrane and decreases susceptibility to salt and metal-induced oxidative stresses by reducing reactive oxygen species. *Plant Biotechnology Journal*. 2014. Vol. 12. P. 1274–1285.
- Kayal W., Keller G., Debayles C. et al. Regulation of tocopherol biosynthesis through transcriptional control of tocopherol cyclase during cold hardening in *Eucalyptus gunnii*. *Physiologia Plantarum*. 2006. Vol. 126. P. 212–223.
- Kusmic C., Barsacchi R., Barsanti L. et al. *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant WZSL. *Journal of Applied Phycology*. 1998. Vol. 10, N 6. P. 555–559.
- Li Y., Wang Z., Sun X., Tang K. The current opinions on the functions of tocopherol based on the genetic manipulation of tocopherol biosynthesis in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2008. Vol. 50, N 9. P. 1057–1069.
- Lushchak V., Semchuk N. Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta physiologiae plantarum*. 2012. Vol. 34, N 5. P. 1607–1628.
- Mendiola J.A., García-Martínez D., Rupérez F.J. et al. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2008. Vol. 43, N 3. P. 484–489.
- Mudimu O., Koopmann I.K., Rybalka N. et al. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α -tocopherol production. *Journal of Applied Phycology*. 2017. Vol. 29, N 6. P. 2867–2875.
- Munne-Bosch S. α -Tocopherol: a multifaceted molecule in plants. *Vitamins and Hormones*. 2007. Vol. 76. P. 375–392.
- Ogbonna J.C., Tomiyama S., Tanaka H. Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. *Journal of Applied Phycology*. 1998. Vol. 10. P. 67–74.
- Ogbonna J., Ichige E., Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena Gracilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 58. P. 532–538.
- Ogbonna J. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009. Vol. 84. P. 217–225.
- Ouyang S.Q., He S.J., Liu P. et al. The role of tocopherol cyclase in salt stress tolerance of rice (*Oryza sativa*). *Science China Life Sciences*. 2011. Vol. 54. P. 181–188.
- Preedy V., Watson R. The encyclopedia of vitamin E. London: CABI Publ., 2007. 945 p.
- Rippert P., Scimemi C., Dubald M., Matringe M. Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology*. 2004. Vol. 134. P. 92–100.
- Rocheford T., Wong J., Egesel C., Lambert R. Enhancement of vitamin E levels in corn. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002. Vol. 21, N 3. P. 191–198.
- Rodríguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernández G., Moreno-Sánchez R. Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *Journal of Applied Microbiology*. 2010. Vol. 109. P. 2160–2172.

- Sattler S., Cahoon E., Coughlan S., Della Penna D. Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiology*. 2003. Vol. 132. P. 2184–2195.
- Sattler S., Gilliland L., Magallanes-Lundback M. et al. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*. 2004. Vol. 16. P. 1419–1432.
- Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008. Vol. 21, N 2. P. 152–161.
- Shintani D., Della Penna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*. 1998. Vol. 282. P. 2098–2100.
- Sivakumar G., Jeong K., Lay J.O. Biomass and RRR- α -tocopherol production in *Stichococcus bacillaris* strain siva2011 in a balloon bioreactor. *Microbial Cell Factories*. 2014. Vol. 13, N 1. P. 79.
- Takeyama H., Kanamaru A., Yoshino Y. et al. Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnology and Bioengineering*. 1997. Vol. 53. P. 185–190.
- Tani Y., Osuka S. α -Tocopherol production by an analog-resistant strain of *Euglena gracilis* Z. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1989. Vol. 53. P. 2313–2318.
- Tani Y., Tsumura H. Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1989. Vol. 53, N 2. P. 305–312.
- Trebst A., Depka B., Hollander-Czytko H. A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*. 2002. Vol. 516. P. 156–160.
- Van Eenennaam A., Lincoln K., Durrett T. et al. Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. *The Plant Cell*. 2003. Vol. 15. P. 3007–3019.
- Vinutha T., Maheswari C., Bansal N. et al. Expression analysis of γ -tocopherol methyl transferase genes and α -tocopherol content in developing seeds of soybean. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015. Vol. 52. P. 267–273.
- Vandamme E. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1992. Vol. 53, N 4. P. 313–327.
- Vismara R., Vestri S., Kusmic C. et al. Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 2003. Vol. 15. P. 75–80.
- Wang X.O., Yoon M.Y., He Q. et al. Natural variations in OsyTMT contribute to diversity of the α -tocopherol content in rice. *Molecular Genetics and Genomics*. 2015. Vol. 290, N 6. P. 2121–2135.
- Yuan P., Cui S., Liu Y. et al. Metabolic engineering for the production of fat-soluble vitamins: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. Vol. 104, N 3. P. 935–951.
- Zhirong L., Keasling J., Niyogi K. Overlapping photoprotective of vitamin E and carotenoids in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*. 2012. Vol. 158. P. 313–323.

До розділу 9

- Ben-Amotz A. Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 1996. Vol. 32. P. 272–275.
- Borowitzka M.A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1988. P. 153–196.
- Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function; ed. C. Stange. Switzerland: Springer, 2016. P. 3–33.
- Cazzonelli C.I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*. 2011. Vol. 38. P. 833–847.
- Del Campo J.A., Moreno J., Rodriguez H. Carotenoid content of chlorophycean microalgae. Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*. 2000. Vol. 76. P. 51–59.
- Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et biophysica acta*. 1990. Vol. 1020. P. 1–24.
- Dolphin W.D. Photoinduced carotenogenesis in chlorotic *Euglena*. *Plant Physiology*. 1970. Vol. 46, N 5. P. 685–691.
- Eonseon J., Polle J.E.W., Lee H.K. et al. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003. Vol. 13, N 2. P. 165–174.
- Faraloni C., Torzillo G. Synthesis of antioxidant carotenoids in microalgae in response to physiological stress. Carotenoids. Rijeka, Croatia: In Tech, 2017. P. 143–157.
- Faraloni C., Torzillo G. Xanthophyll cycle induction by anaerobic conditions under low light in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 2013. Vol. 25. P. 1457–1471.
- Gong M., Bassi A. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments. *Biotechnology Advances*. 2016. Vol. 34, N 8. P. 1396–1412.
- Henriquez V., Escobar C., Galarza J., Gimpel J. Carotenoids in microalgae. Carotenoids in Nature. Switzerland, 2016. Vol. 79. P. 219–237.
- Kato S. Identification and functional analysis of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (*crtE*) and phytoene synthase gene (*crtB*) for carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*. *BMC Plant Biology*. 2016. Vol. 16, N 4. doi: 10.1186/s12870-015-0698-8.
- Leon R., Couso I., Fernandez E. Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*. 2007. Vol. 130. P. 143–152.
- Liang C., Zhai Y., Xu D. et al. Correlation between lipid and carotenoid synthesis and photosynthetic capacity in *Haematococcus pluvialis*. *Grasas y Aceites*. 2015. Vol. 66, N 2. P. e077.
- Niyogi K.K., Björkman O., Grossman A. The role of specific xanthophylls in photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. Vol. 94. P. 14162–14167.
- Paniagua-Michel J., Olmos-Soto J., Ruiz M.A. Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae. Microbial carotenoids from bacteria and microalgae. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2012. P. 1–12.

- Rabbani S., Beyer P., von Lintig J. Induced β -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella Bardawil*. *Plant Physiology*. 1998. Vol. 116. P. 1239–1248.
- Rajesh K., Rohit M.V., Mohan S.V. Microalgae-Based Carotenoids Production. *Algal Green Chemistry*. Elsevier. 2017. P. 139–147.
- Ramos A., Polle J., Tran D., Cushman J. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: Genetic advances and future perspectives. *Algae*. 2011. Vol. 26, N 1. P. 3–20.
- Salguero A., Leon R., Mariotti A. UV-A mediated induction of carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* with retention of cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. Vol. 66. P. 506–511.
- Serive B., Nicolau E., Bérard J.B. Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *PLoS One*. 2017. Vol. 12, N 2. P. e0171872. doi: 10.1371/journal.pone.0171872.

До розділу 10

- Золотарьова О.К., Подорванов В.В., Дубина Д.В. Поліфенольні сполуки макрофітів та їхнє екологічне значення. *Український ботанічний журнал*. 2017. Vol. 74, N 4. P. 373–384.
- Золотарьова О.К., Шнюкова Є.І., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. Перспективи використання мікрободоростей у біотехнології. Київ: Альтерпрес, 2008. 234 с.
- Титлянов Э.А., Титлянова Т.В., Белоус О.С. Полезные вещества морских красных водорослей (*Rhodophyta*): химическая структура и содержание. *Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра*. 2011. Vol. 165. P. 305–319.
- Шнюкова Е.И., Золотарева Е.К. Экзополисахариды *Bacillariophyta*. Обзор. *Альгология*. 2015. Т. 25, № 1. P. 3–20.
- Шнюкова Е.И., Золотарева Е.К. Экологическая роль экзополисахаридов *Bacillariophyta*. Обзор. *Альгология*. 2017. Т. 27, № 1. P. 22–44.
- Abd El-Baky H., Farouk K., El-Baz G.S., El-Baroty G.S. Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga *Spirulina maxima*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2008. Vol. 2, N 10. P. 292–300.
- Amsler C.D., Fairhead V.A. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research*. 2005. Vol. 43. P. 1–91.
- Azizullah A., Murad W., Adnan M. et al. Gravitactic orientation of *Euglena gracilis* — a sensitive endpoint for ecotoxicological assessment of water pollutants. *Frontiers in Environmental Science*. 2013. Vol. 1. P. 1–4.
- Babić O., Kovač D., Rašeta M. et al. Evaluation of antioxidant activity and phenolic profile of filamentous terrestrial cyanobacterial strains isolated from forest ecosystem. *Journal of Applied Phycology*. 2016. Vol. 28, N 4. P. 2333–2342.
- Birch A.J., Donovan F.W., Moewus F. Biogenesis of flavonoids in *Chlamydomonas Eugametos*. *Nature*. 1953. N 172. P. 902–904.
- Bowler C., Allen A.E., Badger J.H. et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*. 2008. N 456. P. 239–244.

- Cervantes-Garcia D., Troncoso-Rojas R., Sanchez-Estrada A. et al. Production of phenolics and flavonoids compounds in *Euglena gracilis* under copper stress. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2013. Vol. 7. P. 93–100.
- Cervantes-Garcia D., Troncoso-Rojas R., Sanchez-Estrada A. et al. Effects of cadmium on total phenolic compounds and flavonoids in *Euglena gracilis*. Efectos de cadmio en compuestos fenolicos totales y flavonoides de *Euglena gracilis*. *Gayana*. 2016. Vol. 80, N 1. P. 1–5.
- Chakraborty K., Joseph D., Praveen N.K. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: *Rhodophyta*) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Food Science and Technology*. 2015. Vol. 52, N 4. P. 1924–1935.
- Cirulis J.T., Scott J.A., Ross G.M. Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2013. Vol. 91, N 1. P. 15–21.
- Cock J.M., Sterck L., Rouze P. et al. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*. 2010. N 465. P. 617–621.
- Colla L.M., Furlong E.B., Costa J.A.V. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2007. Vol. 50, N 1. P. 161–167.
- De Jesus Raposo M.F., de Morais R.M.S.C., de Morais A.M.M.B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*. 2013. Vol. 93, N 15. P. 479–486.
- De Morais M.G., Vaz B.D.S., de Morais E.G., Costa J.A.V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed Research International*. 2015. Vol. 74. P. 498–506.
- De Souza T.D., Prietto L., de Souza M.M., Furlong E.B. Profile, antioxidant potential, and applicability of phenolic compounds extracted from *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*. 2015. Vol. 14, N 41. P. 2903–2909.
- Duan X.J., Li X.M., Wang B.G. Highly brominated mono- and bis-phenols from the marine red alga *Symphyocladia latiuscula* with radical-scavenging activity. *Journal of Natural Products*. 2007. Vol. 70. P. 1210–1213.
- Duval B., Shetty K., Thomas W.H. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology*. 1999. Vol. 11, N 6. P. 559–566.
- Ferrer J.L., Austin M.B., Stewart C., Noe J.P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2008. Vol. 46. P. 356–370.
- Flodin C., Whitfield F.B. Biosynthesis of bromophenols in marine algae. *Water Science and Technology*. 1999. Vol. 40. P. 53–58.
- Freile-Pelegrín Y., Robledo D. Bioactive phenolic compounds from algae. Bioactive compounds from marine foods. Plant and animal sources. New Jersey: John Wiley and Sons Ltd., 2014. P. 113–129.
- Goiris K., Muylaert K., Voorspoels S. et al. Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycology*. 2014. Vol. 50, N 3. P. 483–492.
- Gómez I., Huovinen P. Induction of *Phlorotannins* During uv exposure mitigates inhibition of photosynthesis and DNA damage in the kelp *Lessonia nigrescens*. *Photochemistry and Photobiology*. 2010. Vol. 86, N 5. P. 1056–1063.

- González A.G., Santana-Casiano J.M. Effect of organic exudates of *Phaeodactylum tricornutum* on the Fe (II) oxidation rate constant. *Ciencias Marinas*. 2012. Vol. 38, N 1. P. 245–261.
- Imani S., Rezaei-Zarchi S., Hashemi M. et al. Hg, Cd and Pb heavy metal bioremediation by *Dunaliella* alga. *Journal of Medicinal Plant Research*. 2011. Vol. 5, N 13. P. 2775–2780.
- Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*. 2000. Vol. 113. P. 287–299.
- Jayshree A., Jayashree S., Thangaraju N. *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: effective antioxidant, antibacterial and anticancer mediators. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016. Vol. 78, N 5. P. 575–581.
- Kim S.M., Kang S.W., Jeon J.S. et al. Determination of major phlorotannins in *Eisenia bicyclis* using hydrophilic interaction chromatography: Seasonal variation and extraction characteristics. *Food Chemistry*. 2013. Vol. 138. P. 2399–2406.
- Klejduš B., Lojková L., Plaza M. et al. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound – assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217, N 51. P. 7956–7965.
- Koivikko R., Loponen J., Honkanen T., Jormalainen V. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*. 2005. Vol. 31, N 1. P. 195–212.
- Koivikko R., Loponen J., Pihlaja K., Jormalainen V. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Phytochemical Analysis*. 2007. Vol. 18. P. 326–332.
- Koukal B., Rossé P., Reinhardt A. et al. Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Chlorophyceae*) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. *Water Research*. 2007. Vol. 41, N 1. P. 63–70.
- Kováčik J., Klejduš B., Bačkor M. Physiological Responses of *Scenedesmus quadricauda* (*Chlorophyceae*) to UV-A and UV-C Light. *Photochemistry and Photobiology*. 2010. Vol. 86, N 3. P. 612–616.
- Levy J.L., Angel B.M., Stauber J.L. et al. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. *Aquatic Toxicology*. 2008. Vol. 89, N 2. P. 82–93.
- Li H., Cheng K., Wong C. et al. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. 2011. Vol. 102. P. 771–776.
- Liu M., Hansen P.E., Lin X. Bromophenols in Marine Algae and Their Bioactivities. *Marine Drugs*. 2011. Vol. 9, N 7. P. 1273–1292.
- López A., Rico M., Rivero A., de Tangil M.S. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*. 2011. Vol. 125, N 3. P. 1104–1109.
- López A., Rico M., Santana-Casiano J.M. et al. Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. Vol. 22, N 19. P. 14820–14828.
- Lu Y., Wang J., Yu Y. et al. Changes in the physiology and gene expression of *Microcystis aeruginosa* under EGCG stress. *Chemosphere*. 2014. Vol. 117. P. 164–169.
- Markham K.R., Porter L.J. Flavonoids in the green algae (*Chlorophyta*). *Phytochemistry*. 1969. Vol. 8, N 9. P. 1777–1781.

- May P., Wienkoop S., Kempa S. et al. Metabolomics- and proteomics-assisted genome annotation and analysis of the draft metabolic network of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*. 2008. Vol. 179. P. 157–166.
- Meslet-Cladière L., Delage L., Leroux C.J.J. et al. Structure/function analysis of a type III polyketide synthase in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* reveals a biochemical pathway in phlorotannin monomer biosynthesis. *The Plant Cell*. 2013. Vol. 25, N 8. P. 3089–3103.
- Michel G., Tonon T., Scornet D. et al. Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: Insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytologist*. 2010. Vol. 188. P. 67–81.
- Miranda M.S., Cintra R.G., Barros S.B.M., Mancini-Filho J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998. Vol. 31, N 8. P. 1075–1079.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk A.V., Zolotareva E.K. Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. Vol. 52, N 2. P. 216–221.
- Mouradov A., Spangenberg G. Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in Plant Science*. 2014. Vol. 5. 620 p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00620>
- Muzafarov E.N., Ivanov B.N., Mal'yan A.N., Zolotareva E.K. Dependence of flavonol functions on their chemical structure in chloroplast energy reactions. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 1986. Bd. 181, N 6. S. 381–390.
- Muzafarov E.N., Zolotareva E.K. Uncoupling effect of hydroxycinnamic acid derivatives on pea chloroplasts. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 1989. Bd. 184, N 5–6. S. 363–369.
- Mykhaylenko N.F., Syvash O.O., Tupik N.D., Zolotareva O.K. Exogenous hexoses cause quantitative changes of pigment and glycerolipid composition in filamentous cyanobacteria. *Photosynthetica*. 2004. Vol. 42, N 1. P. 105–110.
- Nagayama K., Shibata T., Fujimoto K. et al. Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae. *Aquaculture*. 2003. Vol. 218. P. 601–611.
- Ngaki M.N., Louie G.V., Philippe R.N. et al. Evolution of the chalcone-isomerase fold from fatty-acid binding to stereospecific catalysis. *Nature*. 2012. Vol. 485. P. 530–544.
- Onofrejová L., Vašíčková J., Klejdus B. et al. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010. Vol. 51, N 2. P. 464–470.
- Pourcel L., Routaboul J.M., Cheynier V. et al. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*. 2007. Vol. 12, N 1. P. 29–36.
- Rauscher M.D. The evolution of flavonoids and their genes. *The Science of flavonoids*. New York: Springer, 2006. P. 175–211.
- Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 1997. Vol. 2, N 4. P. 152–159.
- Rico M., López A., Santana-Casiano J.M. et al. Variability of the phenolic profile in *Phaeodactylum tricorutum* diatom growing under copper and iron stress. *Limnology and Oceanography*. 2013. Vol. 58. P. 144–152.

- Rodriguez-Zavala J.S., Garcia-Garcia J.D., Ortiz-Cruz M.A., Moreno-Sanchez R. Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *Journal of Environmental Science and Health. A*. 2007. Vol. 42, N 10. P. 1365—1378.
- Rose A.L., Waite T.D. Predicting iron speciation in coastal waters from the kinetics of sunlight-mediated iron redox cycling. *Aquatic Science*. 2003. Vol. 65, N 4. P. 375—383.
- Safar H., Van Wagenen J., Møller P., Jacobsen C. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13, N 12. P. 7339—7356.
- Santana-Casiano J.M., González-Dávila M., González A.G. et al. Characterization of phenolic exudates from *Phaeodactylum tricornerutum* and their effects on the chemistry of Fe(II)—Fe(III). *Marine Chemistry*. 2014. Vol. 158. P. 10—16.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*. 2015. Vol. 27, N 4. P. 1509—1516.
- Sukhorukov B.I., Montrel M.M., Opanasenko V.K., Zolotareva E.K. The Interaction of DNA with Protons of the Medium by the Buffer Capacity Method. *Molecular Biology*. 1983. Vol. 17, N 5. P. 822—830.
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R.O.N., Miller G.A.D. ROS and redox signal-ling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*. 2012. Vol. 35, N 2. P. 259—270.
- Swanson A.K., Druehl L.D. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Botany*. 2002. Vol. 73, N 3. P. 241—253.
- Takahama U., Oniki T. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plant Research*. 2000. Vol. 113, N 3. P. 301—309.
- Wang C., Zhang S.H., Wang P.F. et al. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*. 2009. Vol. 75. P. 1468—1476.
- Wang J., Li Q., Li M.M. et al. Competitive adsorption of heavy metal by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sulfate reducing bacteria. *Bioresource Technology*. 2014. Vol. 163. P. 374—376.
- Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002. Vol. 5, N 3. P. 218—223.
- Winters C., Guéguen C., Noble A. Equilibrium and kinetic studies of Cu(II) and Ni(II) sorption on living *Euglena gracilis*. *Journal of Applied Phycology*. 2017. Vol. 29, N 3. P. 1391—1398.
- Worms I., Simon D.F., Hassler C.S., Wilkinson K.J. Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Biochimie*. 2006. Vol. 88, N 11. P. 1721—1731.
- Yoshie-Stark Y., Hsieh Y.P., Suzuki T. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds of Japan. *Journal of the Tokyo College of Fisheries*. 2003. Vol. 89. P. 1—6.

До розділу 11

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. United States, Cambridge: Acad. Press, 1984. Vol. 105. P. 121—126.

- Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1971. Vol. 44, N 1. P. 276—287.
- Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of «antioxidant power»: The Frap assay. *Analytical Biochemistry*. 1996. Vol. 239. P. 70—76.
- Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*. 1987. Vol. 161, N 2. P. 559—566.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C.L. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995. Vol. 28, N 1. P. 25—30.
- Carlberg I., Mannersik B. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. 1985. Vol. 113. P. 485—490.
- Charalampidis P.S., Veltsistas P., Karkabounas S., Evangelou A. Blue CrO₅ assay: A novel spectrophotometric method for the evaluation of the antioxidant and oxidant capacity of various biological substances. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009. Vol. 44. P. 4162—4168.
- Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999. Vol. 47, N 3. P. 1035—1040.
- Gülçin İ. Fe⁽³⁺⁾-Fe⁽²⁺⁾ transformation method: an important antioxidant assay. *Advanced Protocols in Oxidative Stress III, Methods in Molecular Biology*. 2015. Vol. 1208. New York: Springer Science+Business Media. P. 233—246.
- Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C. et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*. 2002. Vol. 132, N 3. P. 461—471.
- Jan S., Khan M.R., Rashid U., Bokhari J. Assessment of antioxidant potential, total phenolic and flavonoids of different solvent fractions of *Monothea buxifolia* fruit. *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2013. Vol. 4, N 5. P. 246—254.
- Khan M.A., Rahman A.A., Islam S. et al. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMP Research Notes*. 2013. Vol. 6, N 1. P. 24.
- Koksal E., Bursal E., Dikici E. et al. Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. Vol. 5, N 2. P. 217—222.
- Li H.B., Wong C.C., Cheng K.W., Chen F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*. 2008. Vol. 41, N 3. P. 385—390.
- Li M., Gao X., Wu B. et al. Microalga *Euglena* as a bioindicator for testing genotoxic potentials of organic pollutants in Taihu Lake, China. *Ecotoxicology*. 2014. Vol. 23. P. 633—640.
- Lin C.C., Kao C.H. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil*. 1999. Vol. 216. P. 147—153.
- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006. Vol. 86, N 13. P. 2046—2056.
- Marcocci L., Packer L., Droy-Lefaix M.T. et al. Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract EGB 761. *Methods in Enzymology*. 1994. Vol. 234. P. 462—476.

- Moon J.K., Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. Vol. 57, N 5. P. 1655—1666.
- Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*. 1981. Vol. 22. P. 867—880.
- Nessa F., Khan S.A. Evaluation of antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of different extracts of leaves of *Citrullus colocynthis*. *Pharmacognosy Research*. 2014. Vol. 6, N 3. P. 218—226.
- Pillai M.K., Santi L.J., Magama S. DOOH radical scavenging activity of extracts from *Phamnus prinoides*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2019. Vol. 13, N 15. P. 329—334.
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 1999. Vol. 269, N 2. P. 337—341.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. Vol. 26, N 9—10. P. 1231—1237.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 1999. Vol. 299. P. 152—178.
- Sochor J., Ryvolova M., Krystofova O. et al. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages. *Molecules*. 2010. Vol. 15, N 12. P. 8618—8640.
- Tory A., Sasidharan S., Yoga Latha L. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of methanol extracts of *Ixora coccinea*. *Pharmaceutical Biology*. 2010. Vol. 48, N 10. P. 1119—1123.
- Wu F., Zhang G., Dominy P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany*. 2003. Vol. N 1. P. 67—78.
- Zheleva-Dimitrova D., Nedialkov P., Kitanov G. Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria. *Pharmacognosy magazine*. 2010. Vol. 6, N 22. P. 74—78.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	5
Р О З Д І Л 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДРОСТЕЙ ТА ЇХ ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ	7
1.1. Прокаріотичні водорості	8
1.2. Еукаріотичні водорості	9
1.3. Значення водоростей для біотехнології	14
1.4. Промислове культивування водоростей	23
1.5. Збір біомаси водоростей	26
1.6. Руйнування клітинної оболонки мікрководоростей	29
1.7. Генна інженерія водоростей	33
Р О З Д І Л 2. ОТРИМАННЯ БІОВІДНЮ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОВОДРОСТЕЙ	39
2.1. Способи отримання та значення водню для промисловості	39
2.2. Темнова ферментація, що супроводжується утворенням водню	42
2.3. Фотосинтетичні організми-продуценти водню	45
2.4. Характеристика ензимів, здатних продукувати водень у ціанобак- терій	48
Р О З Д І Л 3. РІЗНОМАНІТНІСТЬ ГІДРОГЕНАЗ	55
3.1. [Fe]-Гідрогенази	57
3.2. [FeFe]-Гідрогенази	57
3.3. [NiFe]-Гідрогенази	59
3.4. [FeFe]-Гідрогенази <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	61
Р О З Д І Л 4. ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ВОДНЮ З ВИКОРИСТАННЯМ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	64
4.1. Дефіцит сірки	64
4.2. Анаеробний метаболізм	69
4.3. Хлоропластне дихання	71
4.4. Циклічне транспортування електронів	73
4.5. Пул феридоксину	74
4.6. Використання генної інженерії в технології отримання водню	77

РОЗДІЛ 5. НАКОПИЧЕННЯ НЕЙТРАЛЬНИХ ЛІПІДІВ	
<i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	83
5.1. Значення запасних ліпідів мікрводоростей для біотехнології	84
5.2. Структурна характеристика ліпідних включень	87
5.3. Біохімічний склад ліпідних включень <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	89
5.4. Способи індукції акумуляції ліпідів клітинами <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	90
5.5. Шляхи підвищення ефективності накопичення ліпідів <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	94
РОЗДІЛ 6. РІЗНОМАНІТНІСТЬ ПОЛІСАХАРИДІВ ВОДРОСТЕЙ:	
СТРУКТУРА, СИНТЕЗ І ХАРАКТЕРИСТИКИ	98
6.1. Запасні полісахариди водоростей	98
6.2. Будова клітинних стінок морських водоростей	101
6.3. Біологічні функції полісахаридів клітинних стінок макроводоростей	102
6.4. Полісахариди бурих водоростей (фукоїдани, альгінати)	104
6.5. Полісахариди червоних водоростей	106
6.6. Полісахариди зелених водоростей	108
6.7. Особливості та застосування сульфатованих полісахаридів	109
6.8. Екзополісахариди	112
РОЗДІЛ 7. ПРОДУКУВАННЯ ЗАПАСНОГО ПОЛІСАХАРИДУ	
ПАРАМІЛОНУ МІКРОВОДОРІСТЮ <i>EUGLENA GRACILIS</i>	115
7.1. Синтез парамілону в клітинах <i>Euglena gracilis</i>	116
7.2. <i>Euglena gracilis</i> як продуцент парамілону	117
7.3. Динаміка накопичення β -1,3-глюкану за різних способів живлення культури <i>Euglena gracilis</i>	118
7.4. Оптимізація умов культивування <i>Euglena gracilis</i> для збільшення виходу парамілону	120
7.5. Накопичення парамілону за утилізації екзогенного етанолу в процесі міксотрофного культивування <i>Euglena gracilis</i>	123
7.6. Перспективи використання парамілону <i>Euglena gracilis</i> у фармакології та ветеринарії	125
РОЗДІЛ 8. ПРОДУКУВАННЯ ВІТАМІНУ Е ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИМИ	
ЕУКАРІОТАМИ	127
8.1. Хімічна структура вітаміну Е та його синтез	129
8.2. Функції токохроманолів у клітинах рослин	131
8.3. Вміст і локалізація токохроманолів у рослинах	135
8.4. Рослини як продуценти вітаміну Е	137
8.5. Мікробіологічне продукування токоферолів	143
РОЗДІЛ 9. КАРОТИНОЇДИ ВОДРОСТЕЙ	155
9.1. Синтез каротиноїдів	156
9.2. Фактори стимуляції синтезу каротиноїдів	158
9.3. Функції каротиноїдів	160

9.4. Застосування каротиноїдів	161
РОЗДІЛ 10. ПОЛІФЕНОЛЬНІ СПОЛУКИ МАКРОСКОПІЧНИХ І МІКРОСКОПІЧНИХ ВОДОРОСТЕЙ	162
10.1. Поліфенольні сполуки макроводоростей	163
10.2. Поліфенольні сполуки мікроводоростей	167
10.3. Роль поліфенолів у захисті мікроводоростей від токсичного впли- ву важких металів	173
РОЗДІЛ 11. МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ	183
11.1. Дослідження антиоксидантної активності за здатністю до віднов- лення ДФПГ*	184
11.2. Дослідження антиоксидантної активності за здатністю до віднов- лення катіонів заліза(III)	185
11.3. Фосфомолібденовий метод визначення антиоксидантної актив- ності	187
11.4. Визначення антиоксидантної активності з використанням АБТС	188
11.5. Визначення загального вмісту фенолів	188
11.6. Ксантинооксидазне дослідження антиоксидантної активності	189
11.7. Метод визначення антиоксидантної активності з використанням пероксиду хрому	190
11.8. Активність аскорбатпероксидази	191
11.9. Каталаза	191
11.10. Активність супероксиддисмутази	192
11.11. Глутатіонредуктаза	192
11.12. Активність гваяколпероксидази	193
11.13. Рівень пероксидного окиснення ліпідів	193
СПИСОК ПРИЙНЯТИХ СКОРОЧЕНЬ	195
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	198

CONTENTS

PREFACE	5
C H A P T E R 1. GENERAL DESCRIPTION OF ALGAE AND THEIR SIGNIFICANCE FOR BIOTECHNOLOGY	7
1.1. Prokaryotic algae	8
1.2. Eukaryotic algae	9
1.3. Ussing of algae in biotechnology	14
1.4. Industrial cultivation of algae	23
1.5. Collection of algae biomass	26
1.6. Algal cell wall disruption	29
1.7. Genetic engineering of algae	33
C H A P T E R 2. BIOHYDROGEN WITH USING MICROALGAE	39
2.1. Methods of obtaining and value of Hydrogen for industry	39
2.2. Dark fermentation accompanied by the formation of Hydrogen	42
2.3. Photosynthetic organisms producers of Hydrogen	45
2.4. Characteristics of enzymes capable of producing Hydrogen in cyanobacteria	48
C H A P T E R 3. DIVERSITY OF HYDROGENASES	55
3.1. [Fe]-Hydrogenases	57
3.2. [FeFe]-Hydrogenases	57
3.3. [NiFe]-Hydrogenases	59
3.4. [FeFe]-Hydrogenases of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	61
C H A P T E R 4. TECHNOLOGY OF OBTAINING HYDROGEN WITH USING OF <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	64
4.1. Sulfur deprivation	64
4.2. Anaerobic metabolism	69
4.3. Chlororespiration	71
4.4. Cyclic flow of electrons	73
4.5. Feridoxin pool	74
4.6. The use of genetic engineering in the technology of obtaining hydrogen	77
C H A P T E R 5. ACCUMULATION OF NEUTRAL LIPIDS OF <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	83
5.1. The value of storing lipids of microalgae for biotechnology	84

5.2. Structural characterization of lipid inclusions	87
5.3. Biochemical composition of lipid inclusions of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	89
5.4. Methods of induction of lipid accumulation by <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cells	90
5.5. Ways to increase the efficiency of lipid accumulation of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	94
C H A P T E R 6. VARIETY OF ALGAE POLYSACCHARIDES: STRUCTURE, SYNTHESIS AND CHARACTERISTICS	98
6.1. Algal storage polysaccharides	98
6.2. The structure of the cell walls of seaweed	101
6.3. Biological functions of polysaccharides of cell walls of macroalgae	102
6.4. Polysaccharides of brown algae	104
6.5. Polysaccharides of red algae	106
6.6. Polysaccharides of green algae	108
6.7. Features and applications of sulfated polysaccharides	109
6.8. Exopolysaccharides	112
C H A P T E R 7. PRODUCTION OF STORAGE POLYSACCHARIDE PARAMYLON IN MICROALGA <i>EUGLENA GRACILIS</i>	115
7.1. Synthesis of paramylon in <i>Euglena gracilis</i> cells	116
7.2. <i>Euglena gracilis</i> as a producer of paramylon	117
7.3. Dynamics of β -1,3-glucan accumulation in the culture of <i>Euglena gracilis</i> under different ways of nutrition	118
7.4. Optimization of cultivation conditions of <i>Euglena gracilis</i> to increase the yield of paramylon	120
7.5. Accumulation of paramylon with utilization of exogenous ethanol in the myxotrophic culture of <i>Euglena gracilis</i>	123
7.6. The prospects of using paramylon of <i>Euglena gracilis</i> in pharmacology and veterinary	125
C H A P T E R 8. PRODUCTION OF VITAMIN E BY PHOTOSYNTHESIZING EUKARYOTES	127
8.1. Chemical structure of vitamin E and its synthesis	129
8.2. Functions of tocopherols in plant cells	131
8.3. Content and localization of tocopherols in plants	135
8.4. Plants as producers of vitamin E	137
8.5. Microbiological production of tocopherols	143
C H A P T E R 9. CAROTENOIDS OF ALGAE	155
9.1. Synthesis of carotenoids	156
9.2. Factors of stimulating the synthesis of carotenoids	158
9.3. Functions of carotenoids	160
9.4. The use of carotenoids	161

Contents

C H A P T E R 10. POLYPHENOL COMPOUNDS OF MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC ALGAE	162
10.1. Polyphenolic compounds of macroalgae	163
10.2. Polyphenolic compounds of microalgae	167
10.3. The role of polyphenols in the protection of microalgae from the toxic effects of heavy metals	173
C H A P T E R 11. METHODS FOR DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY	183
11.1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay	184
11.2. Ferric reducing antioxidant power assay	185
11.3. Phosphomolybdate assay	187
11.4. 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) radical scavenging assay	188
11.5. Total phenolic content assay	188
11.6. Xanthine oxidase assay	189
11.7. Chromium(VI) peroxide assay	190
11.8. Ascorbate peroxidase assay	191
11.9. Catalase assay	191
11.10. Superoxide dismutase assay	192
11.11. Glutathione reductase assay	192
11.12. Guaiacol peroxidase assay	193
11.13. Lipid peroxidation assay	193
LIST OF ABBREVIATIONS	195
REFERENCES	198

Наукове видання

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ім. М.Г. ХОЛОДНОГО

СТЕПАНОВ Сергій Степанович
МОКРОСНОП Вікторія Михайлівна

**МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ
ТА ЦІННІ РЕЧОВИНИ
ВОДОРОСТЕЙ**

Київ, Науково-виробниче підприємство
«Видавництво “Наукова думка” НАН України», 2021

Художнє оформлення *Н.Ф. Білоусова*
Художній редактор *І.П. Савицька*
Технічний редактор *Т.С. Березяк*
Коректор *Л.Г. Бузіашвілі*
Оператор *О.О. Пономаренко*
Комп'ютерна верстка *Т.О. Ценцеус*

Підп. до друку 25.06.2021. Формат 60×90/16. Папір офс. № 1.
Гарн. Таймс. Друк офс. Ум. друк. арк. 16,0. Обл.-вид. арк. 15,0.
Тираж 100 прим. Зам. № ДФ-1093

Оригінал-макет виготовлено
у НВП «Видавництво “Наукова думка” НАН України»
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців, виготівників
і розповсюджувачів видавничої продукції
ДК № 2440 від 15.03.2006 р.
01601 Київ 1, вул. Терещенківська, 3

ПП «Видавництво “Фенікс”»
03680 Київ 680, вул. Шутова, 13б
Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
серія ДК № 271 від 07.12.2000 р.

Молоді
Вчені

**МЕТАБОЛІЧНІ
ПРОЦЕСИ
ТА ЦІННІ
РЕЧОВИНИ
ВОДОРОСТЕЙ**

