

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»

На правах рукописи

СОРОКИН БОРИС АНДРЕЕВИЧ

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ШТАММОВ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ-ПРОДУЦЕНТОВ КАРОТИНОИДОВ И
ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

1.5.6. Биотехнология

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Кузьмин Денис Владимирович

Москва-2024

Содержание

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	14
1.1 Аквакультура и аквакультурные корма.....	14
1.2 Сложности производства кормов для аквакультуры.....	19
1.3 Микроводоросли в качестве пищевых и кормовых ингредиентов.....	21
1.4 Микроводоросли как источник белка.....	30
1.5 Микроводоросли как источник полиненасыщенных жирных кислот.....	33
1.6 Микроводоросли как источник каротиноидов.....	38
1.7 Методы выделения внутриклеточных продуктов микроводорослей.....	43
1.8 Системы масштабного культивирования микроводорослей.....	45
Глава 2. Материалы и методы.....	50
2.1 Молекулярная идентификация штаммов микроводорослей.....	50
2.1.1 Молекулярная идентификация штамма <i>Vischeria magna</i> SBV-108.....	50
2.1.2 Молекулярная идентификация штамма <i>Mallomonas furcata</i> SBV-13.....	51
2.2 Культивирование микроводорослей.....	52
2.3 Определение выхода сухой массы культуры и содержания нитратов и фосфатов в среде.....	54
2.4 Оценка жизнеспособности лиофилизата микроводорослей.....	55
2.5 Химический анализ биомассы микроводорослей.....	55
2.5.1 Определение содержания фукоксантина.....	55
2.5.2 Определение содержания эйкозапентаеновой кислоты и других жирных кислот.....	57
2.5.3 Определение содержания белка.....	58
2.5.4 Определение содержания жиров.....	58
2.5.5 Определение содержания углеводов.....	59
2.6 Приготовление тестовых кормов.....	59
2.7 Выращивание тилапии.....	60
2.8 Контроль параметров воды.....	61
2.9 Химический анализ кормов и рыбы.....	61
2.10 Оценка ростовых характеристик и показателей эффективности кормления..	62
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	65
3.1 Биотехнологическое исследование штамма <i>Vischeria magna</i> SBV-108.....	65
3.1.1 Описание штамма.....	65
3.1.2 Оценка жизнеспособности лиофилизата.....	67
3.1.3 Культивирование и химический анализ биомассы.....	68

3.1.4 Обсуждение.....	70
3.2 Биотехнологическое исследование штамма <i>Mallomonas furtiva</i> SBV-13.....	73
3.2.1 Описание штамма.....	73
3.2.2 Оценка жизнеспособности лиофилизата.....	76
3.2.3 Культивирование и химический анализ биомассы.....	77
3.2.4 Обсуждение.....	79
3.3 Исследование влияния включения биомассы <i>Vischeria magna</i> SBV-108 и <i>Mallomonas furtiva</i> SBV-13 в стартовый корм на ростовые характеристики и эффективность кормления мальков тилапии.....	82
3.3.1 Состав исследованных кормов.....	82
3.3.2 Ростовые характеристики рыб.....	83
3.3.3 Показатели эффективности кормления.....	85
3.3.4 Химический состав мяса мальков тилапии.....	87
3.3.5 Обсуждение.....	88
Заключение.....	92
Выводы.....	94
Список использованных сокращений.....	96
Список использованной литературы.....	97

Введение

Актуальность темы

Аквакультура является самым быстрорастущим сектором пищевой промышленности, и начиная с 2014 года производит больше рыбы и морепродуктов, чем рыболовство. Ожидается, что к 2030 году аквакультура будет обеспечивать 2/3 мирового потребления рыбы и морепродуктов (Fish To 2030. Prospects for Fisheries and Aquaculture. URL: <https://hdl.handle.net/10986/17579>). Сохранение темпов роста аквакультуры невозможно без устойчивого производства комбикормов, которые используются для производства более 70 % продукции и составляют 50 % - 70 % от ее себестоимости (Ansari, F. A. et al. 2021). На сегодняшний день основой качественных кормов являются рыбная мука и рыбий жир, и аквакультура является крупнейшим потребителем данных ингредиентов, занимая более 70 % рынка (Fish To 2030. Prospects for Fisheries and Aquaculture. URL: <https://hdl.handle.net/10986/17579>). При этом природные ресурсы кормовой рыбы (сельди, анчоусов и т.д.) стремительно сокращаются ввиду чрезмерного вылова, что создает угрозу для экологии и продовольственной безопасности, а также ведет к удорожанию рыбной муки и рыбьего жира, особенно на фоне растущего спроса со стороны пищевой и фармацевтической промышленности (Sarker, P. K. et al. 2023), (FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. URL: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd0683en>). Данная ситуация привела к тому, что в последние годы производители аквакультурных кормов стали частично заменять рыбную муку и рыбий жир растительными ингредиентами (на основе сои, кукурузы, рапса и т.д.). Хотя данная стратегия является оправданной с экономической точки зрения, она ведет к снижению питательной ценности кормов за счет ряда факторов: несбалансированного аминокислотного профиля растительного белка (бедного метионином в случае сои, и лизином в случае кукурузы), низкого содержания незаменимых омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, а также наличия ряда антипитательных веществ в растительной биомассе (Sarker, P. K. et al. 2018), (Ansari, F. A. et al. 2021). Это ограничивает потенциал замещения рыбной

муки и рыбьего жира не только в кормах для высоко–трофических видов, таких как форель и лосось, но и для всеядных рыб, например, тиляпии (Sarker, P. K. et al. 2018). Особенно чувствительны к снижению качества ингредиентов стартовые корма, используемые на стадии подращивания личинок и молоди гидробионтов, которая во многом определяет эффективность всего аквакультурного производства (Lund, I. et al. 2018), (Samaee, S. M. et al. 2021). В связи с этим поиск альтернативных кормовых ингредиентов, обеспечивающих высокую производительность кормов и не эксплуатирующих природные ресурсы, является приоритетной задачей аквакультуры.

Микроводоросли являются основой пищевой цепи природных водоемов и служат естественным кормом для личинок и молоди огромного количества гидробионтов (Muller-Feuga, A. 2013). Кроме того, они являются первоисточником незаменимых омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в пищевой цепи, а также сбалансированным составом белка, включающим все незаменимые аминокислоты (Santigosa, E. et al. 2021), (Ansari, F. A. et al. 2021). В последнее время активно развиваются технологии масштабного культивирования микроводорослей с целью производства продуктов для пищевой, кормовой, косметической и фармацевтической индустрии.

Использование микроводорослей обладает рядом преимуществ по сравнению с высшими растениями: значительно более высокая скорость накопления биомассы, широчайший спектр производимых метаболитов, отсутствие необходимости в пахотных землях, возможность параллельной утилизации промышленных стоков, а также широкие возможности оптимизации выхода целевого продукта путем изменения условий культивирования (Rozenberg, J. M. et al. 2024), (Nagappan, S. et al. 2021), (Ansari, F. A. et al. 2021), (Tan, J. S. et al. 2020), (Maltsev, Y. et al. 2018), (Mamaeva, A. et al. 2018), (Petrushkina, M. et al. 2017).

Вышеперечисленные факторы делают микроводоросли одними из наиболее перспективных кандидатов для повышения качества аквакультурных кормов и снижения зависимости производства от рыбной муки и рыбьего жира, а также получения высокомаржинальных продуктов для пищевой, фармацевтической и

косметической промышленности (омега-3 жирные кислоты, каротиноиды). В связи с этим поиск и исследование новых высокопродуктивных штаммов микроводорослей с потенциалом промышленного применения является актуальной задачей современной биотехнологии микроорганизмов.

Степень разработанности

Активное биотехнологическое исследование микроводорослей началось во второй половине XX века, когда была показана способность данных микроорганизмов накапливать каротиноиды, а также значительные количества липидов с потенциалом применения в качестве сырья для производства биотоплива. Запущенная в 1978 г. в США программа, направленная на получения биотоплива из микроводорослей, дала значительный толчок разработке систем масштабного культивирования и переработки микроводорослей, а также технологий скрининга штаммов и управления их метаболизмом путем изменения условий выращивания. Хотя по итогам программы микроводоросли не смогли стать экономически-целесообразным сырьем для производства биотоплива, ее наработки были использованы для создания ряда производств на основе микроводорослей по всему миру. Сегодня микроводоросли используются для получения β -каротина, астаксантина, жирных кислот и биомассы. Биомасса микроводорослей применяется в пищевой промышленности для производства биологически активных добавок и белкового концентрата, а также в аквакультуре. В большинстве случаев микроводоросли применяются в аквакультуре в качестве живого корма для двустворчатых моллюсков и креветок, а также для обогащения зоопланктона (напр. артемий и коловраток) ценными питательными веществами перед его использованием для кормления личинок и молоди рыб (Lavens, P. et al. 1996), (Muller-Feuga, A. 2013). Их выращивание зачастую производится непосредственно на аквакультурном производстве в небольших масштабах, с использованием локальных штаммов и простейших технологий культивирования (Muller-Feuga, A. 2013). В последние годы растущий спрос на рыбную муку и рыбий жир вынудил производителей аквакультурных кормов искать новые ингредиенты для повышения

качества продукта и снижения зависимости от добычи кормовой рыбы (Sarker, P. K. 2023). В рамках этого тренда ряд научных групп исследовали включение биомассы микроводорослей в комбикорма для различных аквакультурно значимых видов рыб с целью оценки потенциала замещения рыбной муки и рыбьего жира, а также влияния таких добавок на эффективность кормления (Lu, J. et al. 2002), (Tadesse, Z. et al. 2003), (Abdel-Tawwab, M. et al. 2009), (Sarker, P. K. et al. 2016a), (Sprague, M. et al. 2016), (Raji, I. D. et al. 2020), (An, B. N. T. et al. 2020), (Annamalai, S. N. et al. 2021), (Ansari, F. A. et al. 2021), (Sorokin, B. A. et al. 2024).

Большинство авторов отмечает положительный эффект от добавления микроводорослей и перспективность их применения. Одной из ключевых проблем современной биотехнологии микроводорослей является крайне малое число штаммов, задействованных в промышленности: из более чем 4500 лабораторно культивируемых штаммов используется лишь несколько десятков (Sinetova, M. A. et al., 2020). Кроме того, большинство исследований исторически сфокусировано на морских штаммах, в то время как потенциал пресноводных (за исключением представителей Chlorophyta) остается практически нераскрытым (Khaw, Y. S. et al. 2022). Исследование новых штаммов микроводорослей (в особенности пресноводных) в большинстве случаев является исключительно описательным и не доходит до стадии оптимизации и масштабирования. Наша лаборатория сфокусирована на изучении пресноводных штаммов, а также оборудована единственным в России реактором с гибкими панелями (Lumian AGS260), который является одним из крупнейших фотобиореакторов в стране по рабочему объему (240 л). Это позволяет выполнять оценку масштабируемости культивирования микроводорослей и выявлять штаммы с наибольшим потенциалом промышленного применения.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования был поиск высокопроизводительных пресноводных штаммов микроводорослей-продуцентов фукоксантина и эйкозапентаеновой кислоты, способных быстро накапливать значительные

количества данных соединений при полупромышленном культивировании в объеме более 100 л, а также изучение их потенциала в качестве ингредиентов стартовых аквакультурных кормов. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести описание и исследование состава биомассы штамма *Mallomonas furtiva* SBV-13 с целью определения его потенциала в качестве продуцента каротиноида фукоксантина;
2. Определить параметры производительности *M. furtiva* SBV-13 по биомассе и фукоксантину в условиях полупромышленного культивирования в панельном фотобioreакторе в объеме 120 л;
3. Провести описание и исследование состава биомассы штамма *Vischeria magna* SBV-108 с целью определения его потенциала в качестве продуцента омега-3 эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК);
4. Определить параметры производительности *V. magna* SBV-108 по биомассе и ЭПК в условиях полупромышленного культивирования в панельном фотобioreакторе в объеме 120 л;
5. Изготовить прототип стартового корма с включением сухой биомассы микроводорослей *M. furtiva* SBV-13 и *V. magna* SBV-108 в различных соотношениях и провести испытание корма на мальке красной тиляпии (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*);
6. Определить влияние включения биомассы *M. furtiva* SBV-13 и *V. magna* SBV-108 на ростовые характеристики рыб и эффективность кормления.

Новизна и практическая значимость работы

Новизна работы заключается в том, что впервые были охарактеризованы и исследованы пресноводные штаммы микроводорослей *Mallomonas furtiva* SBV-13 и *Vischeria magna* SBV-108, и показана их способность накапливать значительные количества фукоксантина и эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), соответственно, в количествах, являющихся одними из самых высоких среди описанных в литературе. Кроме того, впервые было исследовано влияние включения биомассы данных

микроводорослей в стартовый аквакультурный корм на ростовые характеристики рыб и эффективность кормления.

Штамм *M. furtiva* SBV-13 показал продуктивность по фукоксантину 6,1 мг/л/день при культивировании в полупромышленном реакторе объемом 120 л, что является одной из самых высоких величин для описанных в литературе штаммов, выращиваемых в сходных условиях, и наиболее высокой среди всех описанных пресноводных и почвенных штаммов. Штамм *V. magna* SBV-108 показал продуктивность по ЭПК 17,4 мг/л/день при культивировании в полупромышленном реакторе объемом 120 л, что является максимальной для описанных в литературе морских и пресноводных штаммов при фотоавтотрофном выращивании. Кроме того, включение биомассы данного штамма в стартовый корм в количестве 10 % привело к улучшению всех исследованных характеристик корма не менее чем на 20 %. Это делает штаммы *M. furtiva* SBV-13 и *V. magna* SBV-108 перспективными кандидатами для промышленного получения фукоксантина и ЭПК, а также для производства кормовых ингредиентов для аквакультуры.

Методология и методы исследований

Экспериментальная работа выполнена с использованием классических и современных методов: культуры клеток на жидких питательных средах с применением лабораторных шейкеров-инкубаторов и полупромышленного панельного фотобиореактора; молекулярной идентификации штаммов на основе секвенирования фрагментов рДНК малой субъединицы (SSU rDNA), фрагментов ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, а также маркера *gbcL* хлоропластной ДНК; анализа химического состава биомассы с помощью ВЭЖХ-МС а также ряда химических методов; выращивания мальков красной тилапии *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus* в аквариумах. Подробно методология и методы исследования изложены в соответствующем разделе.

Положения, выносимые на защиту

1. Пресноводные штаммы микроводорослей не уступают морским по способности накапливать фукоксантин и эйкозапентаеновую кислоту при фотоавтотрофном культивировании в объеме более 100 л.

2. Оригинальный штамм микроводоросли *Mallomonas furtiva* SBV-13, способный накапливать 25,9 мг/г фукоксантина в сухой массе при объемной продуктивности 6,1 мг/л/день, является перспективным продуцентом для промышленного получения данного соединения.

3. Оригинальный штамм микроводоросли *Vischeria magna* SBV-108, способный накапливать 46,1 мг/г эйкозапентаеновой кислоты при объемной продуктивности 17,4 мг/л/день, является перспективным продуцентом для промышленного получения данного соединения.

4. Добавление в стартовый аквакультурный корм биомассы *V. magna* SBV-108 приводит к улучшению всех значимых параметров эффективности кормления более чем на 20 %, что делает данный штамм перспективным для применения в качестве кормового ингредиента.

Личный вклад автора

Личный вклад автора включает работу с литературными источниками; разработку методологии проведения исследований; проведение экспериментов; анализ и интерпретацию данных; подготовку отчетов и научных публикаций по результатам исследований. Эксперименты по выращиванию красной тилипии выполнялись на базе кафедры Аквакультуры и водных биоресурсов ФГБУ ВО Астраханского государственного технического университета (АГТУ) (г. Астрахань).

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты исследований доложены на всероссийских и международных научно-практических конференциях:

- XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 08–11 февраля 2016 года);

- Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (г. Москва, 15–17 марта 2016 года);
- The 6th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (г. Сан-Диего (США), 26–29 июня 2016 года);
- IV международная конференция для технологических предпринимателей Startup Village 2016 (г. Москва, 02–03 июня 2016 года);
- XI молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (г. Москва, 01–02 ноября 2016 года);
- XXIX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 07–10 февраля 2017 года);
- 19-я Российская агропромышленная выставка «Золотая осень» (г. Москва, 04–07 октября 2017 года);
- XXX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 12–15 февраля 2018 года);
- 4th Future Agro Challenge Global Agripreneurs Summit (г. Стамбул (Турция), 14-17 апреля 2018);
- Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 23–25 мая 2018 года).

Публикации

По результатам, полученным в диссертационной работе, опубликовано 5 публикаций в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, Российского индекса научного цитирования, а также индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. **Sorokin, B.**, Gusev, E., Namsaraev, Z., Emelianova, A., Patova, E., Novakovskaya, I., Vinokurov, V. and Kuzmin, D. Effect of microalgae feed

supplementation on growth performance and feeding efficiency of tilapia fry // Journal of Applied Phycology. – 2024. – P. 1–14;

2. Rozenberg, J. M., **Sorokin, B. A.**, Mukhambetova, A. N., Emelianova, A. A., Kuzmin, V. V., Belogurova-Ovchinnikova, O. Y., Kuzmin, D. V. Recent advances and fundamentals of microalgae cultivation technology // Biotechnology Journal. – 2024. – Vol. 19(3). – P. 2300725;

3. Mamaeva, A., Namsaraev, Z., Maltsev, Y., Gusev, E., Kulikovskiy, M., Petrushkina, M., Filimonova, A., **Sorokin, B.**, Zotko, N., Vinokurov, V., Kopitsyn, D., Petrova D., Novikov A., Kuzmin D. Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in *Bracteacoccus bullatus* cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations // Journal of Applied Phycology. – 2018. – Vol. 30. – P. 2237–2246;

4. Maltsev, Y., Gusev, E., Maltseva, I., Kulikovskiy, M., Namsaraev, Z., Petrushkina, M., Filimonova, A., **Sorokin, B.**, Golubeva, A., Butaeva, G., Khrushchev, A., Zotko, N., Kuzmin, D. Description of a new species of soil algae, *Parietochloris grandis* sp. nov., and study of its fatty acid profiles under different culturing conditions // Algal research. – 2018. – Vol. 33. – P. 358–368;

5. Petrushkina, M., Gusev, E., **Sorokin, B.**, Zotko, N., Mamaeva, A., Filimonova, A., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Yampolsky, I., Guglya, E., Vinokurov, V., Namsaraev, Z., Kuzmin, D. Fucoxanthin production by heterokont microalgae // Algal Research. – 2017. – Vol. 24. – P. 387–393.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.б.н. Кузьмину Денису Владимировичу, за неоценимую всестороннюю помощь и поддержку в течение всего научного пути, к.б.н. Гусеву Евгению Сергеевичу и к.б.н. Намсараеву Зоригто Баировичу за квалифицированную консультационную и методологическую поддержку, а также всем коллегами и соавторам из Физтех-школы биологической и медицинской физики МФТИ, кафедры Физической и коллоидной химии РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина и кафедры Аквакультуры и

водных биоресурсов АГТУ за помощь в проведении экспериментов и подготовке публикационных материалов.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Аквакультура и аквакультурные корма

Аквакультура является самым быстрорастущим сектором пищевой промышленности, показывающим стабильный прирост производства на 8 % в год в течение последних 30 лет. Аквакультура производит более половины всей потребляемой рыбы, в то время как производительность рыболовства за последние годы вышла на плато в 90 млн тонн в год в связи с истощением природных ресурсов, снижением квот на вылов дикой рыбы и эффекта Эль-Ниньо (Sarker, P. K. 2023), (Nagarpan, S. et al. 2021). Сегодня глобальное рыболовство сохраняет позиции в основном за счет добычи морской рыбы, в то время как аквакультура доминирует в производстве всех остальных гидробионтов (The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. URL: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd0683en>) (Рисунок 1).

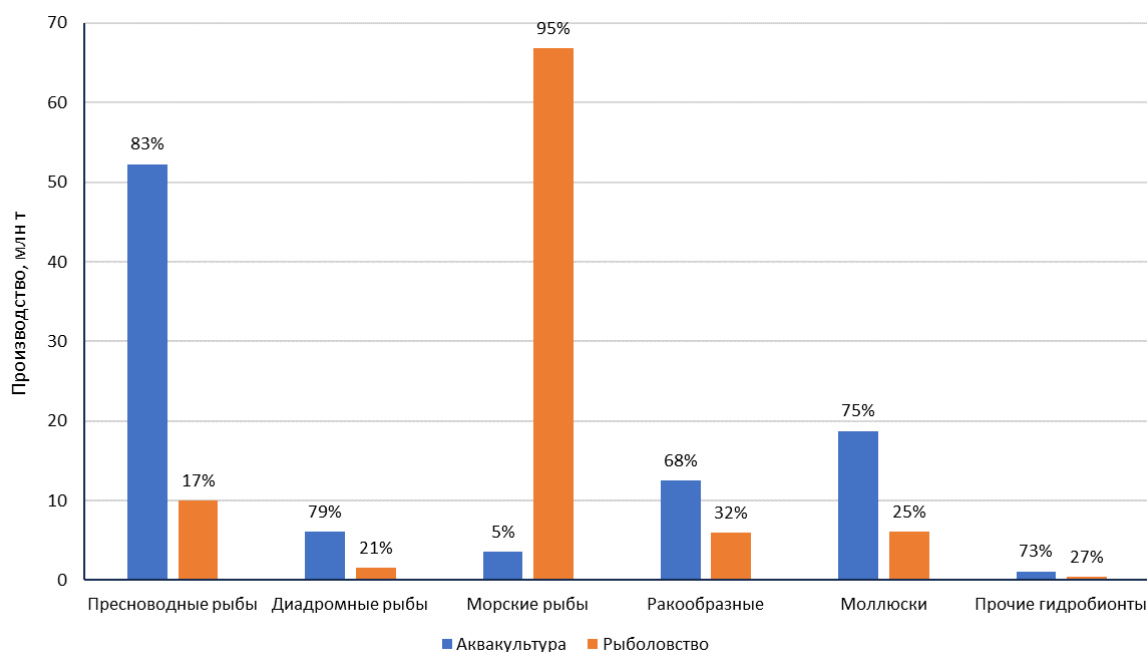


Рисунок 1 – Доля аквакультуры в производстве различных гидробионтов.

Наиболее распространенными аквакультурными видами на мировом рынке являются белоногая креветка (*Litopenaeus vannamei*), устрицы, белый амур (*Stenopharyngodon idella*), тиляпия (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* и их гибрид) и белый толстолобик (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Рисунок 2).

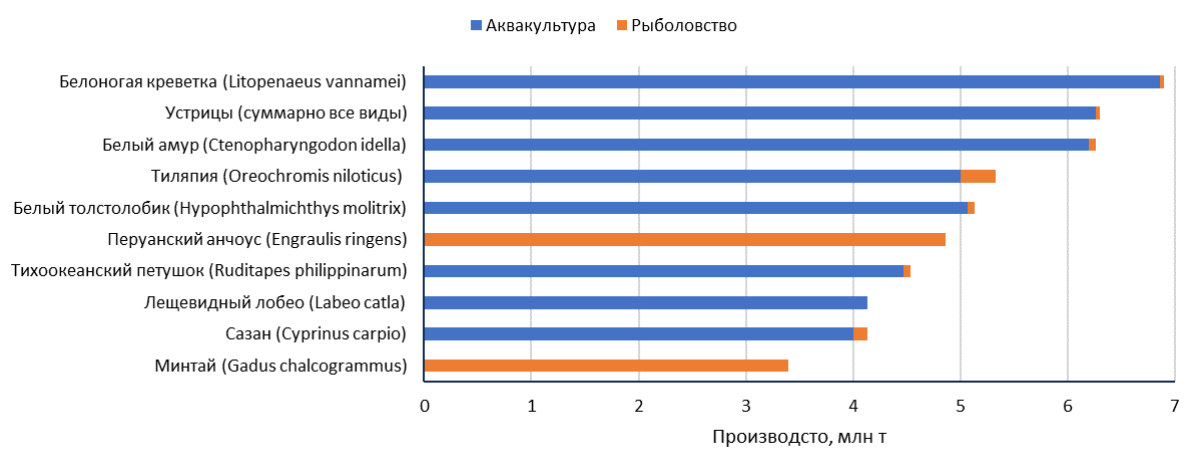


Рисунок 2 – Структура производства 10 наиболее используемых видов.

Мировое производство аквакультуры в 2023 году составило около 95,8 млн тонн, с прогнозом роста до 109 млн тонн к 2030 году (Sarker, P. K. 2023). Россия занимает 2 место в Европе по объему аквакультурного производства (400 тыс. т), однако все еще существенно отстает как от лидеров рынка – Китая (52 млн т), Индии (10 млн т) и Индонезии (5,4 млн т) (Таблица 1), так и от объемов собственного рыболовства (5 млн т). При этом отрасль показывает стабильный рост 5 % в год за последние несколько лет, и согласно прогнозам аналитиков, сохранит его в будущем (Рисунок 3).

Таблица 1 – Мировое аквакультурное производство по регионам.

Регионы и страны	2000	2005	2010	2015	2020	2022	Доля на рынке региона в 2022, %
	Объем производства, тыс. т						
Африка	400	646	1289	1788	2266	2317	100
Египет	340	540	920	1175	1592	1552	67,0

Нигерия	26	56	201	317	262	259	11,2
Гана	5	1	10	45	64	113	5,7
Остальные	29	49	159	252	349	372	16,1
Америки	1423	2177	2515	3820	4443	4958	100
Чили	392	724	701	1046	1486	1509	30,4
Эквадор	61	139	273	427	775	1123	22,6
Бразилия	172	258	411	578	630	738	14,9
Остальные	798	1057	1130	1230	1553	1589	32,0
Азия	28442	39190	51223	64682	77513	83399	100
Китай	21522	28121	35513	43748	49620	52884	63,4
Индия	1943	2967	3786	5341	8636	10230	12,3
Индонезия	789	1197	2305	4342	5227	5414	6,5
Остальные	4170	6904	9629	11250	14032	14872	17,8
Европа	2053	2144	2533	2956	3271	3503	100
Норвегия	491	662	1020	1381	1490	1648	47,0
Россия	74	115	120	152	270	320	9,1
Испания	311	225	257	297	277	276	7,9
Остальные	1176	1142	1135	1127	1235	1260	36,0
Океания	122	154	190	178	225	235	-
Австралия	32	45	76	83	103	125	53,2
Новая Зеландия	86	105	111	91	119	106	45,1
Остальные	4	3	4	3	4	4	1,7

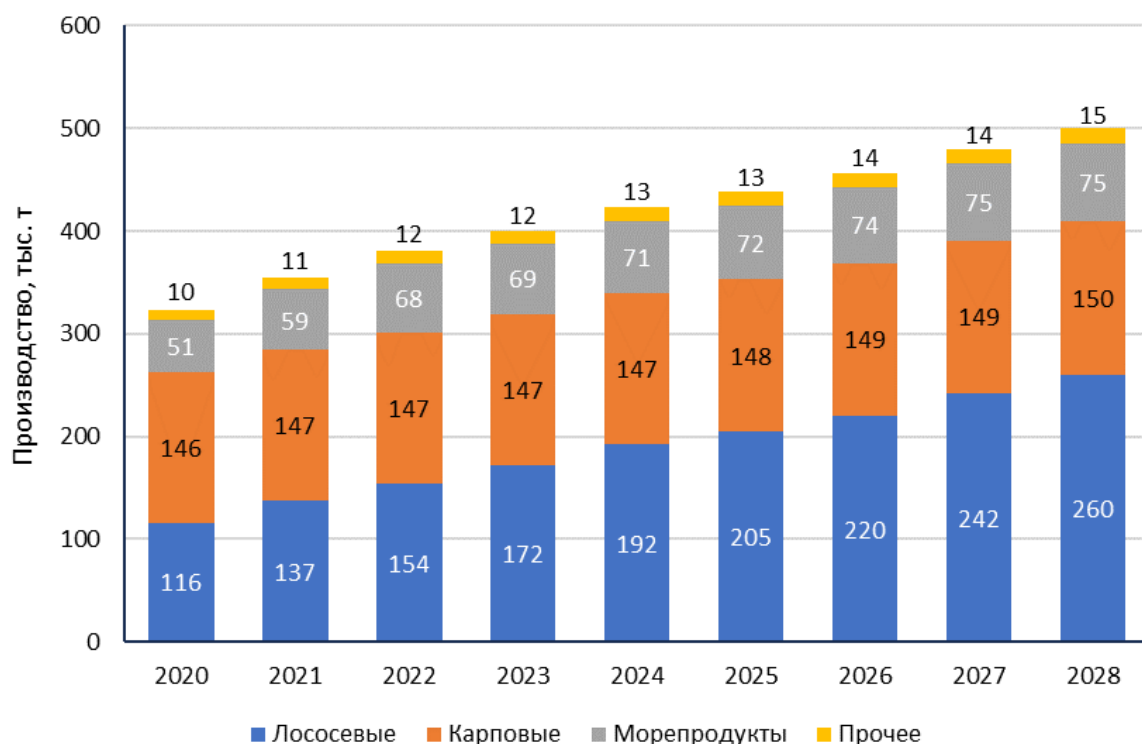


Рисунок 3 – Аквакультурное производство в России, тыс. т.

Основным драйвером роста аквакультуры является растущее потребление рыбы и морепродуктов населением, которое выросло более чем на 100 % за последние 50 лет (Cordeiro, С. М. 2019). В связи с этим, к 2050 году аквакультура должна удвоить свою производительность для удовлетворения растущего спроса населения с учетом исчерпания потенциала роста дикого вылова (Waite, R. et al. 2014). Затраты на корма составляют 60 % - 70 % себестоимости производства аквакультурной продукции (и 75 % - 85 % операционных расходов), и являются одним из ключевых драйверов данной отрасли. Мировой рынок кормов для аквакультуры в 2023 году оценивался в 60 млн тонн и демонстрировал стабильный рост на 8 % - 10 % в последние годы. Российский рынок кормов для аквакультуры все еще сильно зависим от импорта, который составляет более 70 % от общего объема 160 тыс. тонн, однако объемы отечественного производства выросли практически вдвое за последние 3 года (Рисунок 4).

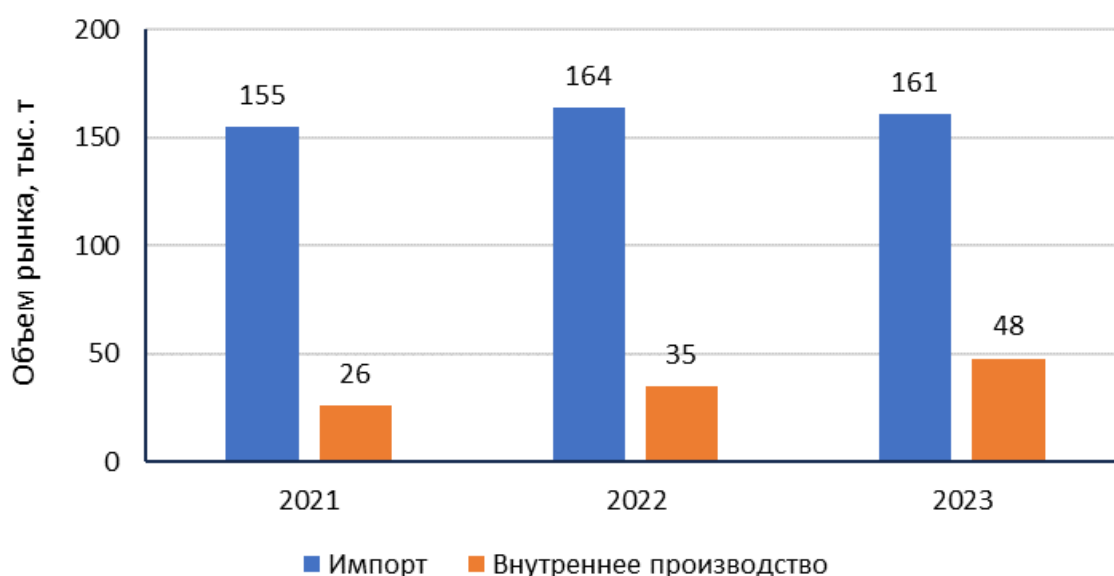


Рисунок 4 – Рынок аквакультурных комбикормов в России, тыс. т.

Одной из наиболее важных стадий рыбоводства является выращивание личинок и молоди (Conceição, L. E. C. et al. 2003). Несмотря на то, что на сегодняшний день освоено аквакультурное выращивание многих гидробионтов, уровень выживаемости личинок во многих случаях остается крайне волатильным, а потенциал роста утилизируется не в полной мере (Conceição, L. E. C. et al. 2003), (Shields, R. J. 2001). Кроме того, проблемы здоровья молоди, например, скелетные аномалии мальков рыб, остаются значимым негативным фактором (Сапу, С. et al. 2003), (Conceição, L. E. C. et al. 2010). Для успешного подращивания необходимо знать биологические особенности постэмбрионального развития различных видов рыб, длительность личиночного периода, особенности питания и требования к основным факторам среды. Например, у карповых рыб личиночный период развития начинается с момента заполнения плавательного пузыря воздухом и перехода на внешнее питание. У лососей наряду с переходом на активное питание происходят внешние изменения: изменяется окраска, поведение, увеличивается активность и появляется поисковая реакция. В личиночный период происходит коренная морфо-экологическая и физиологическая перестройка организма рыб, причем сроки

данного перехода зависят от биологических особенностей каждого вида. В начале этого периода у личинок имеется остаток желточного мешка, и они некоторое время питаются смешанно. Переход личинок на активное питание выделяют как один из критических периодов раннего онтогенеза, и получение качественных кормов является одним из определяющих факторов выживаемости молоди (Саһи, С. et al. 2001), (Infante, J. Z. et al. 2001). Поэтому к стартовым кормам предъявляются особенно жесткие требования по содержанию легкоусвояемого белка, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов и минералов, а также аттрактантов, усиливающих пищевой интерес личинок (Lund, I., et al. 2018), (Samaee, S. M. et al. 2021). Повышенные требования к качеству также определяют и повышенную стоимость стартовых кормов, которая может в 5-10 раз превосходить стоимость производственных. В связи с этим стартовые корма позволяют использовать более дорогие ингредиенты, если они позволяют достичь высокой выживаемости и скорости роста молоди, а также обеспечить легкий переход на производственные корма.

1.2 Сложности производства кормов для аквакультуры

Основными ингредиентами качественных кормов для аквакультуры, обеспечивающими большую часть питательных веществ, являются рыбная мука и рыбий жир. Производство данных ингредиентов в текущих объемах является экологически неустойчивым, так как использует биомассу дикой кормовой рыбы (анчоусов, сардин, сельди), являющуюся основой морских пищевых цепей. На сегодняшний день на производство аквакультурных кормов приходится 70 % мирового потребления рыбной муки и рыбьего жира, большую часть из которого приходится на выращивание лососевых (24 % от потребляемой аквакультурой рыбной муки и 50 % от потребляемого рыбьего жира) (Sarker, P. K. 2023), (Shepherd, C. J. et al. 2013). Несмотря на стабильное сокращение использования рыбной муки в аквакультурных кормах в последние десятилетия (Carter, C. G. et al. 2000), (Shepherd, C. J. et al. 2013), прогнозируемый дефицит рыбной муки к 2050 году может

составить до 1,3 млн тонн, что негативно скажется на темпах роста аквакультурного производства (Jones, S. W. et al. 2020). Кроме того, по подсчетам аналитиков, сохранение текущего уровня потребления рыбной муки и рыбьего жира может привести к полному истощению ресурсов кормовой рыбы к 2037 году, что приведет к катастрофическим последствиям для экосистемы и продовольственной безопасности (Froehlich, H. E. et al. 2018). Более того, на структуру рынка рыбной муки и рыбьего жира влияет стремительно растущее потребление данных веществ в производстве пищевых продуктов, фармацевтических препаратов и функциональных добавок, что вызывает повышение их стоимости и снижение доступного для аквакультуры объема (Tacon, A. G. et al. 2011), (Chauton, M. S. et al. 2015), (Sarker, P. K., 2023). Производители кормов активно используют растительные ингредиенты (сою, кукурузу, рапс) для замещения рыбной муки и рыбьего жира, однако зачастую это приводит к снижению качества конечного продукта. Белок и масла из высших растений обладают рядом недостатков, таких как низкая усвояемость вследствие наличия ряда антипитательных факторов, а также низкого содержания некоторых незаменимых аминокислот, таких как лизин, метионин, треонин и триптофан (Li, P. et al. 2009), (He, J.-Y. et al. 2013), а также длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот. К примеру, соевый белок не содержит достаточного количества метионина, а кукурузный – лизина, при этом данные ингредиенты наиболее часто используются в аквакультурных кормах. Для компенсации этих дефицитов в корм могут вводиться синтетические аминокислоты, однако они характеризуются плохой усвояемостью рыбами и повышенным выделением азотсодержащих отходов (Sarker, P. K. et al. 2009), (Sarker, P. K. et al. 2011), (Pelletier, N. et al. 2010), (Wang, Y. et al. 2008). Другими часто встречающимися антипитательными факторами растительного сырья являются ингибиторы трипсина, гемагглютинины, фитаты, госсипол, фитоэстрогены, глюкозинолаты, алкалоиды, эруковая кислота и тиаминаза (Sarker, P. K. 2023), (Ansari, F. A. et al. 2021). Одним из наиболее проблемных антипитательных факторов являются фитаты, связывающие до 70 % фосфора в растительном сырье и ответственные за снижение скорости роста, конверсии и поглощения корма, а также угнетение функций щитовидной железы у рыб (von Danwitz, A. et al. 2020). Фитаты

наиболее часто встречаются в составе семян высших растений и обладают хелатирующей способностью по отношению к двухвалентным и трехвалентным ионам металлов (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+3} , и Fe^{+3}), что снижает доступность данных минералов для животного. Не жвачные животные не могут метаболизировать фитаты, поэтому они существенно снижают биодоступность кормового фосфора. Кроме того, они снижают биодоступность кормового белка за счет формирования комплексов белок-фитиновая кислота (Kokou, F. et al. 2018), (Venkata Subhash, G. et al. 2020). Многочисленные исследования показали ухудшение ростовых характеристик распространенных аквакультурных видов, таких как форель, тилапия, карп и лосось, при потреблении кормов со значительным содержанием фитатов (Sarker, P. K. et al. 2023), (Ansari, F. A. et al. 2021). Механизмы действия фитатов были подтверждены путем добавления синтетически-полученных соединений в корма радужной форели и канального сомика (Spinelli, J. et al. 1983), (Satoh, S. et al. 1989). В работе (Denstadli, V. et al. 2006) было показано снижение усвояемости кормового фосфора на 50 % при добавлении всего 2 % фитиновой кислоты в корм атлантического лосося. Для борьбы с антипитательными факторами необходимо применение дополнительных факторов обработки растительного сырья, таких как механическая обработка, ферментация, автоклавирование и экстракция (Kokou, F. et al. 2018), однако данные мероприятия удорожают и усложняют производство корма.

1.3 Микроводоросли в качестве пищевых и кормовых ингредиентов

Микроводоросли – это группа фотоавтотрофных одноклеточных и колониальных микроорганизмов, большинство из которых обитает в водной среде. К микроводорослям относят как прокариотные (цианобактерии), так и эукариотные организмы, представляющие собой сборную полифилетическую группу. Таким образом, понятие «водоросли» является эколого-биологическим и объединяет разные по происхождению организмы. Современная систематика микроводорослей основана на происхождении и строении их пластид и охватывает организмы из 4 супергрупп эукариот, а также цианобактерий (Таблица 2).

Таблица 2 – Систематика микроводорослей на основе происхождения пластидов.

Супергруппа	Тип	Происхождение пластидов
Terrabacteria	Cyanobacteria	Нет, цианобактерии являются предками первых пластид
Archaeoplastida	Glaucophyta	Первичный эндосимбиоз с цианобактерией
	Rhodophyta	
	Chlorophyta	
Chromalveolata	Cryptophyta	Вторичный эндосимбиоз с красной водорослью
	Haptophyta	
	Stramenopiles	
	Apicomplexa	
	Chromeridae	
	Dinophyta	Вторичный/третичный эндосимбиоз с различными водорослями (Chlorophyte, Cryptophyte, Stramenopile, Haptophyte)
Rhizaria	Chlorachniophyta	Вторичный эндосимбиоз с зелеными водорослями (Ulvophyceae, Trebuxiophyceae, Chlorophyceae)

Благодаря огромному биоразнообразию, микроводоросли являются продуцентами тысяч биологически активных соединений: белков, углеводов, липидов, витаминов, полифенолов, флавоноидов, каротиноидов, алкалоидов и многих других. Продукты на основе биомассы и метаболитов микроводорослей используются в различных отраслях промышленности, включая производство пищевых продуктов, производство кормов и биоудобрений, косметическую промышленность и производство биотоплива (Таблица 3).

Таблица 3 – Промышленно значимые продукты микроводорослей

Группа продуктов	Продукт	Биологическая активность	Отрасль применения	Штаммы-продуценты	Ссылка на литературный источник
------------------	---------	--------------------------	--------------------	-------------------	---------------------------------

Биомасса	Биомасса	Источник питательных веществ	Пищевая; Кормовая; Удобрения	<i>Arthrospira platensis</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Dunaliella salina</i>	(Jacob-Lopes, E. et al. 2019)
Белки	Незаменимые аминокислоты	Источник белка	Пищевая; Кормовая	<i>Arthrospira platensis</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Dunaliella sp.</i>	(Geada, P. et al. 2021), (Jacob-Lopes, E. et al. 2019)
	Пептиды с биологической активностью	Антиоксидантная; Антикоагулянтная; Антимикробная; Противоопухолевая	Фармацевтическая; БАД	<i>Arthrospira platensis</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i>	(Ovando, C. A. et al. 2018), (Suetsuna, K. et al. 2001)
Пигменты	β-каротин	Краситель; Источник провитамина А; Антиоксидантная; Онкопротекторная; Кардиопротекторная	Пищевая; Кормовая; Фармацевтическая; Косметическая	<i>Dunaliella salina</i>	(Jacob-Lopes, E. et al. 2019), (Monte, J. et al. 2020)
	Астаксантин	Антиоксидантная; Противовоспалительная; Гормональный прекурсор; Иммуностимулирующая	Пищевая; Кормовая; Фармацевтическая; Косметическая	<i>Haematococcus pluvialis</i>	(Jacob-Lopes, E. et al. 2019), (Praveenkumar, R. et al. 2015)
	Лютеин	Антиоксидантная; Онкопротекторная; Кардиопротекторная; Ретинопротекторная	БАД	<i>Chlorella sp.</i> ; <i>Scenedesmus sp.</i>	(Low, K. L. et al. 2020), (Luengo, E. et al. 2015)
	Фукоксантин	Антиоксидантная;	Фармацевтическая;	<i>Isochrysis galbana</i> ;	(Zarekarizi, A. et al. 2019)

		Противовоспалительная; Противодиабетическая; Противоопухолевая; Стимулирование снижения массы тела	Косметическая	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		
Жиры	Триглицериды		Сырье для производства биотоплива	Топливная	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Dunaliella salina</i> ; <i>Chlorella sp.</i> ; <i>Botryococcus braunii</i>	(Brennan, L. et al. 2010), (Dragone, G. et al. 2010)
	ПНЖК	α-линоленовая кислота	Кардиопротекторная; Незаменимая жирная кислота	Пищевая; БАД	<i>Nannochloropsis sp.</i> ; <i>Nodularia harveyana</i> ; <i>Rhodomonas baltica</i> ; <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	(Guihéneuf, F. et al. 2017), (Jacob-Lopes, E. et al. 2019), (Sathasivam, R. et al. 2019)
		Эйкозапентаеновая кислота	Противовоспалительная; Нейропротекторная; Незаменимая жирная кислота	Пищевая; Кормовая; Фармацевтическая	<i>Nannochloropsis</i> ; <i>Phaeodactylum nitzschia</i> ; <i>Pavlova lutheri</i>	
		Докозагексаеновая кислота	Противовоспалительная; Нейропротекторная; Незаменимая жирная кислота	Пищевая; Кормовая; Фармацевтическая	<i>Schizochytrium sp.</i> ; <i>Cryptocodinium cohnii</i> ; <i>Pavlova lutheri</i>	
		Линолевая кислота	Противовоспалительная; Незаменимая жирная кислота	Пищевая	<i>Scenedesmus obliquus</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Chroococcus sp.</i> ; <i>Rhodomonas baltica</i>	

		Арахидоновая кислота	Противовоспалительная	Пищевая; Кормовая; Фармацевтическая	<i>Porphyridium sp.</i>	
		γ-линоленовая кислота	Противовоспалительная	Пищевая; Кормовая; Фармацевтическая	<i>Arthrospira sp.</i>	
Углеводы	Полисахариды		Сырье для производства биотоплива	Топливная	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Dunaliella salina</i> ; <i>Chlorella sp.</i> ; <i>Botryococcus braunii</i> ;	(Brennan, L. et al. 2010), (Dragone, J. et al. 2010)
			Иммуностимулирующая; Противовирусная; Противоопухолевая; Противовоспалительная; Флокулирующая;	Пищевая; Фармацевтическая	<i>Arthrospira platensis</i> , <i>Chlorella pyrenoidosa</i> , <i>Chlorella stigmatophora</i>	
	Сульфатированные полисахариды		Антикоагулянтная; Противовирусная; Антиоксидантная; Противоопухолевая	Фармацевтическая; БАД	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i>	(Jacob-Lopes, E. et al. 2019), (Sathasivam, R. et al. 2019)
Фенольные соединения	Фенольные соединения		Антиоксидантная	Пищевая	<i>Chlamydomonas nivalis</i> ; <i>Botryococcus sp.</i> ; <i>Chlorella sp.</i> ; <i>Dunaliella sp.</i> ; <i>Nostoc sp.</i> ; <i>Phaeodactylum sp.</i> ; <i>Spirulina sp.</i> ; <i>Haematococcus sp.</i> ; <i>Chaetoceros sp.</i>	(Goiris, K. et al. 2012)

Ожидается, что к 2028 году мировой рынок продукции на основе микроводорослей составит 2,8 млрд долл. при совокупном среднегодовом темпе роста 7,9 % (Прогноз рынка продуктов из микроводорослей до 2028 г. от Globenewswire, 2021). На сегодняшний день промышленное производство микроводорослей в основном сконцентрировано на нуждах пищевой и косметической промышленности. Некоторые аквакультурные хозяйства используют микроводоросли такие как *Isochrysis sp.*, *Pavlova sp.*, *Chlorella sp.* для кормления различных гидробионтов (моллюсков, креветок, мальков рыб), а также для обогащения живого корма (зоопланктона), но масштабы данной индустрии невелики. В то же время в последние годы растет интерес к микроводорослям как к кормовым ингредиентам для аквакультурных видов рыб (Hodar, A. R. et al. 2020) благодаря ряду преимуществ. Микроводоросли превосходят любую растительную и животную биомассу по удельной скорости роста, уступая только бактериям (Rizwan, M. et al. 2018). Кроме того, в отличие от высших растений, микроводоросли не требуют плодородной почвы для роста, более того, для их выращивания можно использовать соленую и сточную воду (Li, K. et al. 2019). Благодаря этому, производство микроводорослей не конкурирует с пищевыми культурами за пахотные земли и чистую воду, и может использоваться для параллельной утилизации некоторых стоков. По сравнению с насекомыми, дрожжами и бактериями, микроводоросли используют более дешевые питательные среды, а также содержат значительно меньше антипитательных факторов. Кроме того, микроводоросли могут использоваться для производства продуктов с высокой добавленной стоимостью, таких как каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты, полисахариды и другие биологически активные продукты параллельно с использованием отработанной биомассы в качестве кормовых ингредиентов (Arun, J. et al. 2020), (Nagappan, S. et al. 2020). В природе микроводоросли являются фундаментом пищевой цепи водоемов, обеспечивающей высшие звенья практически всеми необходимыми питательными веществами. Сбалансированный химический состав микроводорослей обеспечивает их привлекательность в качестве перспективного источника белка, жиров и углеводов для кормления гидробионтов. В частности,

микроводоросли способны накапливать до 60 % - 80 % белка или липидов в биомассе (в зависимости от штамма и условий культивирования), что делает их более продуктивными по сравнению с другими альтернативными кормовыми ингредиентами, такими как дрожжи и бактерии (Таблица 4).

Таблица 4 – Содержание белка, жиров и углеводов в микроводорослях и различных кормовых ингредиентах

Кормовой ингредиент	Белок (%)	Жиры (%)	Углеводы (%)	Ссылка на литературный источник
Биомасса микроводорослей				
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	4-7	25–30	(Becker, E.W. 2007)
<i>Botryococcus braunii</i>	39,9	34,4	18,5	(Tavakoli, K. et al. 2021)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	43–56	14–22	2,9–17	(Becker, E.W. 2007)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26	(Becker, E.W. 2007)
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	14–22	12–17	(Becker, E.W. 2007)
<i>Dunaliella salina</i>	49–57	6–8	4–32	(Becker, E.W. 2007)
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–20	14–18	(Becker, E.W. 2007)
<i>Nannochloropsis granulata</i>	33,5	23,6	36,2	(Tibbetts, S. M. et al. 2017)
<i>Pavlova sp.</i>	24–29	9–14	6–9	(Madeira, M. S. et al. 2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	39,6	18,2	25,2	(Sørensen, M. et al. 2016)
<i>Porphyridium aeruginosum</i>	31,6	13,7	45,8	(Madeira, M. S. et al. 2017)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	12–14	10–52	(Becker, E.W. 2007)
<i>Schizochytrium sp.</i>	12,5	40,2	38,9	(Samuelsen, T. A. et al. 2018)
<i>Spirulina platensis</i>	55,8	14,2	22,2	(Madeira, M. S. et al. 2017)
<i>Spirulina maxima</i>	60–71	6–7	13–16	(Madeira, M. S. et al. 2017)
<i>Spirogyra sp.</i>	6–20	11–21	33–64	(Becker, E.W. 2007)
<i>Synechococcus sp.</i>	63	11	15	(Becker, E.W. 2007)
<i>Tetraselmis sp.</i>	27,2	14	45,4	(Tulli, F. et al. 2012)

<i>Tetraselmis chuii</i>	46,5	45363	25	(Makridis, P. et al. 2006)
<i>Dunaliella sp.</i>	40,46	15,51	20,44	(Madeira, M. S. et al. 2017)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	30,87	23,07	37,93	(Madeira, M. S. et al. 2017)
<i>Isochrysis sp.</i>	41	17,72	14,46	(Madeira, M. S. et al. 2017)
Другие кормовые ингредиенты				
Рыбная мука	63	11	–	(Hodar, A. R. et al. 2020)
Биомасса мух <i>Hermetia illucens</i>	43,6	33,1	–	(Varelas, V. 2019)
Биомасса дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50,1	1,8	4,6	(Blomqvist, J. et al. 2018)
Гидролизат перьевой муки	84,2	10,04	–	(Yu, R. et al. 2020)
Кукурузная глютеновая мука	62	5	18,5	(Liu, W. Y. et al. 2020)
Соевая мука	44	2,2	39	(El-Sayed, A. F. M. 1994)
Пшеничная мука	12,2	2,9	69	(Sørensen, M. et al. 2011)
Биомасса бурых водорослей	2,4–16,8	0,3–9,6	38–61	(Wan, A. H. et al. 2019)
Биомасса зеленых водорослей	3,2–35,2	0,3–2,8	15–65	(Wan, A. H. et al. 2019)
Биомасса красных водорослей	6,4–37,6	0,2–12,9	36–66	(Wan, A. H. et al. 2019)

Биомасса микроводорослей также характеризуется сбалансированным аминокислотным профилем, что позволяет заменить животный белок и дорогостоящие аминокислотные кормовые добавки. Так, биомасса штаммов родов *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Porphyridium*, *Isochrysis*, и *Nannochloropsis* богата метионином, который отсутствует в большинстве растительных источников белка (Wan, A. H. et al. 2019). Преобладающий тип углеводов также является важной характеристикой кормов. Так, крахмал является легко усвояемым для большинства видов животных, в отличие от целлюлозы и хитина. Доля крахмала в клетках микроводорослей варьируется от 7 % до 45 % (Dragone, G. et al. 2011), а клетчатки –

от 5 % до 18 % (Matos, A. P. et al. 2016). В отличие от высших растений, клетчатка микроводорослей не содержит лигнина и характеризуется низким содержанием гемицеллюлозы, что обеспечивает лучшую усвояемость биомассы (Niccolai, A. et al. 2019). Микроводоросли рода *Spirulina* и *Chlorella* характеризуются низким содержанием клетчатки (5 % - 8 %), в то время как штаммы *Nannochloropsis* sp., *Tetraselmis* sp., *Tisochrysis* sp. и *Phaeodactylum* sp. содержат больше клетчатки (Niccolai, A. et al. 2019). Микроводоросли также содержат множество пигментов с антиоксидантной активностью, а также витамины и иммуностимуляторы, благоприятно влияющие на рост и развитие гидробионтов (Prabha, S. P. et al. 2020), (Zhou, R. et al. 2019). Каротиноидные пигменты микроводорослей, такие как астаксантин и фукоксантин, также придают привлекательный товарный вид мясу красной рыбы, и потому используются в качестве кормовых добавок для лососевых (Posten, C. et al. 2009). Биомасса микроводорослей также характеризуется большим содержанием минералов (Mustafa, M. G. et al. 1995). Это объясняется тем, что оболочки многих микроводорослей обладают структурными и химическими свойствами, позволяющие им связывать относительно большие количества ионов металлов. Многие штаммы микроводорослей способны накапливать значительные количества незаменимых омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), таких как эйкозапентаеновая (ЭПК) и докозагексаеновая (ДГК) кислоты, что делает их перспективными для замещения рыбьего жира (Cottrell et al., 2020). К богатым ПНЖК микроводорослям относятся штаммы родов *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Nitzschia*, *Schizochytrium*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium* и др (Lu, Q. et al. 2021), (Nagappan, S. et al. 2018), (Patil, V. et al. 2007), (Long, J. et al. 2022), которые могут накапливать до 40 % ЭПК и/или ДГК от общего содержания жирных кислот. Вышеперечисленные факторы делают биомассу микроводорослей одной из наиболее перспективных альтернатив для одновременного замещения рыбной муки и рыбьего жира в качественных аквакультурных кормах.

1.4 Микроводоросли как источник белка

Микроводоросли могут стать конкурентоспособным крупнотоннажным источником кормового белка благодаря высокой скорости роста биомассы и сбалансированному аминокислотному профилю (Becker, E. W. 2007), (Sarker, P. K. et al. 2018), (Carneiro, W. F. et al. 2020). Так, некоторые штаммы *Spirulina sp.* и *Dunaliella sp.* содержат 50 % - 70 % белка в пересчете на сухую массу и обладают на 50 % -100 % большей продуктивностью на единицу занимаемой площади по сравнению с растительными и животными источниками белка (Ejike, C. E. et al. 2017). Существует 10 незаменимых аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан, лизин, гистидин), которые не могут быть синтезированы в организме животных и рыб, и потому должны обязательно поступать с пищей. В отличие от белка высших растений, белок микроводорослей содержит полный набор незаменимых аминокислот и потому может использоваться для замещения рыбной муки, являющийся основным белковым компонентом качественных кормов. По сравнению с белком насекомых, микроводоросли обладают более высокой скоростью роста и продуктивностью на единицу занимаемой площади, а также используют более дешевые питательные субстраты. Последнее верно также для сравнения микроводорослей с дрожжами и бактериями. Сравнение аминокислотного профиля микроводорослей с рыбной мукой и альтернативными источниками кормового белка приведено в (Таблица 5).

Таблица 5 – Аминокислотный профиль микроводорослей и различных источников кормового белка

Кормовой ингредиент	Биомасса микроводорослей							Другие источники кормового белка				
	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Nannochloropsis granulata</i>	<i>Botryococcus braunii</i>	<i>Porphyridium aeruginum</i>	<i>Tetraselmis chuii</i>	<i>Chlorella sp.</i>	Рыбная мука	Биомасса мух <i>Hermetia illucens</i>	Биомасса дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Биомасса водоросли <i>Gracilaria sp.</i>	Соевый концентрат

Незаменимые аминокислоты												
Треонин	2,7	2,7	5,4	3,7	5,8	4,0	4,0	3,5	3,6	8,2	3,8	2,9
Валин	3,0	4,6	7,1	4,4	7,3	4,8	5,3	4,0	5,5	9,6	7,2	2,5
Метионин	1,2	7,0	3,5	2,5	3,7	2,4	2,2	2,5	1,8	3,4	0,7	0,2
Изолейцин	2,9	4,8	5,6	3,4	7,1	3,4	3,8	3,7	3,9	8,1	4,7	2,5
Лейцин	4,8	1,5	11,0	7,1	11,9	7,3	7,8	6,2	6,1	12,2	8,3	5,3
Фенилаланин	2,5	6,4	6,2	4,4	6,3	4,7	4,7	3,3	3,6	7,3	4,2	3,4
Лизин	2,5	2,6	8,5	4,7	8,0	5,6	5,2	3,7	6,2	12,0	6,2	4,3
Гистидин	0,8	5,7	2,3	1,5	1,9	1,6	1,8	–	3,0	3,7	1,0	1,8
Аргинин	3,4	0,9	7,4	20,5	8,6	9,4	5,5	6,8	4,7	8,1	10,3	5,1
Заменимые аминокислоты												
Аспарагин	5,1	18,8	11,4	8,7	15,0	14,1	7,8	–	8,5	17,1	12,8	8,4
Серин	2,6	7,1	5,6	3,5	7,0	4,2	3,3	–	3,9	7,9	5,4	4,0
Глутамин	7,8	5,5	14,1	12,7	15,6	12,0	9,7	–	10,2	23,4	13,0	15,4
Глицин	2,6	1,5	7,5	4,9	7,0	6,5	5,2	1,7	5,4	7,9	6,0	3,1
Аланин	3,9	3,4	7,1	6,4	8,4	6,0	7,2	–	5,6	11,1	10,0	3,3
Цистеин	–	1,5	1,6	1,4	2,2	2,8	–	0,4	0,8	2,4	0,1	1,1
Тирозин	2,1	3,4	4,2	2,8	5,8	3,0	–	–	0,0	6,6	1,5	2,1
Пролин	1,7	7,3	11,2	4,6	5,0	3,6	4,2	–	5,2	7,1	4,8	3,6
Ссылка на литературный источник	(Mad eira, M. S. et al. 2017)	(Sørensen, M. et al. 2016)	(Tibbetts, S. M. et al. 2017)	(Tavakoli, K. et al. 2021)	(Mad eira, M. S. et al. 2017)	(Makridakis, P. et al. 2006)	(Becker, E.W. 2007)	(Hodari, A. R. et al. 2020)	(Varelas, V. 2019)	(Blomqvist, J. et al. 2018)	(Wan, A. H. et al. 2019)	(El-Sayed, A. F. M. 1994)

Усвояемость белка является важным фактором при выборе кормовых ингредиентов. Усвояемость белка микроводорослей с толстой целлюлозной клеточной стенкой, таких как *Chlorella sp.*, *Desmodesmus sp.*, *Nannochloropsis sp.*, and *Tetraselmis sp.* для различных аквакультурных видов варьировалась в пределах 50 %

– 60 %, 54 % – 67 %, 69 % – 81 % и 70 % – 73 %, соответственно (Gong, Y. et al. 2018), (Moheimani, N. R. et al. 2018), (Niccolai, A. et al. 2019), (Skrede, A. et al. 2011), в то время как усвояемость белка микроводорослей с не-целлюлозной стенкой, таких как *Isochrysis sp.* and *Spirulina sp.*, составляла более 86 % (Niccolai, A. et al. 2019), (Skrede, A. et al. 2011).

Общая усвояемость биомассы также показывала аналогичный тренд с более высокими значениями для микроводорослей с не-целлюлозной клеточной стенкой. Недавние исследования показали, что включение в корма до 25 % микроводорослей не оказывает негативного влияния согласно данным производительности, гистологических параметров, анализа поведения гидробионтов и активности пищеварительных ферментов (Patterson, D. et al. 2013), (Tibaldi, E. et al. 2015), (Vizcaino, A. J. et al. 2018). Применение различных методов разрушения клеточной стенки может повысить усвояемость питательных веществ биомассы микроводорослей (Agboola, J. O. et al. 2019), (Batista, S. et al. 2020). В работе (Agboola, J. O. et al. 2019) биомасса *Nannochloropsis gaditana* подвергалась пастеризации, нагреванию, лиофилизации и механическому разрушению перед включением в корм африканского сома и нильской тилляпии. Биомасса, подвергнутая холодной пастеризации и механическому разрушению показала 13 % и 11 % увеличение абсолютного прироста и конверсии корма по сравнению с контролем, соответственно. Корма, содержащие ферментированную биомассу *Nannochloropsis oceanica* и механически обработанную биомассу *Chlorella vulgaris* and *Tetraselmis sp.* показали более высокую доступность белка и кормовой энергии по сравнению с контролем в работе (Batista, S. et al. 2020). В недавнем исследовании было показано, что ферментирование биомассы *Spirulina sp.* бромелаином повысило ее усвояемость мальком мозамбикской тилляпии, в то время как другие ферменты (папаин и трипсин) были менее эффективны (Sharma, S. A. et al. 2021). Процесс экструзии также способен разрушать клеточные стенки микроводорослей, позволяя рыбе получать больше питательных веществ (Maehre, H. K. et al. 2016), (Shi, Z. et al. 2016), (Venou, B. et al. 2009). В исследовании, посвященном кормлению атлантического лосося биомассой *Nannochloropsis sp.*, было показано, что экструдированный корм обладал

лучшей усвояемостью чем неэкструдированный (Gong, Y. et al. 2018). В другой работе кормление серебристого карася экструдированным кормом на основе микроводорослей показало лучшую усвояемость белка по сравнению с гранулированными кормами (Shi, Z. et al. 2016).

1.5 Микроводоросли как источник полиненасыщенных жирных кислот

Липиды являются одним из основных компонентов клеточных мембран, а также образуют энергетический резерв организма. Помимо высокой энергетической ценности, употребляемые в пищу жиры являются единственным источником незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), которые, в свою очередь, необходимы для поддержания целостности клеточных мембран, оптимального липидного транспорта (в качестве эмульгирующих агентов в составе фосфолипидов), а также являются прекурсорами гормонов-простагландинов (Tacon, A. G. J. et al. 1987). К ПНЖК относятся жирные кислоты, содержащие две и более двойных углерод-углеродных связей в молекуле. В зависимости от положения двойных связей они разделяются на омега-3 (первая двойная связь расположена после третьего атома углерода считая от метилового конца цепи) и омега-6 (первая двойная связь расположена после шестого атома углерода считая от метилового конца цепи). К наиболее важным омега-3 ПНЖК относятся α -линоленовая кислота (18:3), эйкозапентаеновая кислота (20:5) (ЭПК) и докозагексаеновая кислота (20:6) (ДГК), в то время как среди омега-6 ПНЖК наиболее важными с диетологической точки зрения являются линолевая (18:2), арахидоновая (20:4) и γ -линоленовая (18:3) кислоты. Позвоночные не способны самостоятельно синтезировать α -линоленовую и арахидоновую кислоту, которые являются прекурсорами остальных кислот своего класса, и потому должны обязательно получать их вместе с пищей. В то же время, организм большинства плотоядных и многих всеядных животных (включая человека) не способен преобразовывать α -линоленовую кислоту в ЭПК и ДГК с достаточной эффективностью, поэтому поступление этих веществ с пищей также является необходимым для нормальной физиологии (Jovanovic, S. et al. 2021).

Потребность рыб в ПНЖК составляет в среднем 1 % от рациона (Tacon, A. G. J. et al. 1987). Живущие в холодной воде пресноводные рыбы наиболее нуждаются в омега-3 ПНЖК, в то время как обитатели теплых водоемов зависимы от омега-6 или от обоих классов жирных кислот (Tacon, A. G. J. et al. 1987). В научных работах показано, что недостаток данных веществ ведет к снижению скорости роста, угнетению работы желудочно-кишечного тракта, а также снижению фертильности (Sundell, K. et al. 2022), (Ansari, F. A. et al. 2021). В то же время введение в корм дополнительных количеств ПНЖК способствует повышению скорости роста и выживаемости рыб, а также улучшению реакции на стресс и качества мяса (Houston, S. J. S. et al. 2017), (Lutfi, E. et al. 2023). Мировой рынок Омега-3 ПНЖК в 2019 году оценивался в 2,5 млрд долл. с прогнозом роста до 4 млрд долл. к 2027 году (Oliver, L. et al. 2020). Основным промышленным источником данных соединений является рыбий жир, однако его производство сопряжено с рядом проблем, в числе которых стремительное истощение природных рыбных ресурсов, зависимость качества конечного продукта от сезонности и географической локации места вылова (Cuellar-Bermudez, S. P. et al. 2015), а также опасность загрязнения жирорастворимыми токсинами и загрязнителями, накапливающимися в рыбе (Ruckebusch, E. et al. 2012). Благодаря вышеперечисленным факторам, поиск альтернативных источников омега-3 ПНЖК является актуальной задачей.

Водоросли являются единственными фотосинтезирующими организмами, способными синтезировать ЭПК и ДГК. Содержание ПНЖК в биомассе микроводорослей варьируется в широких пределах и зависит как от штамма, так и от условий культивирования. Как правило, Зеленые микроводоросли (Chlorophyceae) накапливают меньшие количества ПНЖК чем Диатомовые (Bacillariophyceae), Эустигматовые (Eustigmatophyceae), Золотистые (Chrysophyceae) и КRYPTOФИТОВЫЕ (Cryptophyceae). К наиболее эффективным продуцентам ДГК относятся водоросли классов Dinophyceae, Pavlovophyceae, а также некоторые штаммы Cryptophyta, Thraustochytriidae и Euglenophyta (Leblond, J. D. et al. 2003), (Pernet, F. et al. 2003), (Taipale, S. et al. 2020), (Mendes, A. et al. 2009), (Fan, K. W. et al. 2007). Динофитовые микроводоросли могут содержать до 40 % ДГК в жирнокислотном профиле, в то

время как для гаптофитовых водорослей этот показатель может достигать до 30 % (Mendes, A. et al. 2009), (Leblond, J. D. et al., 2000), (Usup, G. et al. 2008), (Da Costa, F. et al. 2017). Штаммы семейства Thraustochytriidae, например, *Schizochytrium sp.* и *Thraustochytrium sp.*, являются наиболее производительными продуцентами ДГК и способны накапливать ее в количестве 40 % - 60 % от всех жирных кислот при гетеротрофном культивировании (Fan, K. W. et al. 2007), (Lee Chang, K. J. et al. 2014). Среди продуцентов ЭПК наиболее эффективными являются штаммы Диатомовых и Эустигматовых микроводорослей, а также некоторые Гаптофитовые (Taipale, S. et al. 2020), (Moreno, V. J. et al. 1979), (Gillan, F. T. et al. 1981), (Arao, T. et al. 1994), (Tonon, T. et al. 2002), (Zulu, N. N. et al. 2018). Диатомовые, например, *Phaeodactylum tricornutum*, могут накапливать ЭПК в количестве до 30 % от общего содержания жирных кислот, а также небольшие количества ДГК (Liang, Y. et al. 2014), (Patil, V. et al. 2007). Среди Эустигматовых микроводорослей наиболее исследованными являются *Nannochloropsis sp.*, накапливающие 15 % - 30 % ЭПК в жирнокислотном профиле (Yao, L. et al. 2015), (Patil, V. et al. 2007). Другие классы микроводорослей, такие как Цианобактерии или Зеленые водоросли, как правило, не способны накапливать длинноцепочечные омега-3 ПНЖК в значительных количествах (Gladyshev, M. I. et al. 2019). Жирнокислотный профиль различных микроводорослей представлен в (Таблица 6).

Таблица 6 – Жирнокислотный профиль различных микроводорослей

Штамм	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:5 (ЭПК)	22:6 (ДГК)	Всего жирных кислот (% сухой массы)	Ссылка на литературный источник
	% от суммы жирных кислот										
<i>Aurantiochytrium sp.</i>	2,9	39,8	–	0,5	0,5	0,1	0,4	0,5	46,7	40–55	(Jovanovic, S. et al. 2021), (Lee Chang, K. J. et al. 2014)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	–	4–20	3,8	–	1–16	1–10	2–22	–	0–5,4	12–64	(James, G. O. et al. 2011)

<i>i</i>											
<i>Crypthecodiniumc ohnii</i>	18	12–45	–	3	8	–	–	–	13–55	25–63	De Swaaf, M. E. et al. 2003), (Jovanovic, S. et al. 2021), (Wynn, J. et al. 2010)
<i>Dunaliella sp.</i>	–	10–28	12–16	–	8–11	5,9	12–36	–	14–21	12–46	(Araujo, G. S. et al. 2011), (Jovanovic, S. et al. 2021)
<i>Emiliana huxleyi</i>	18,9	10,3	–	10,8	19,8	–	–	–	9,2	–	(Lang, I. et al. 2011)
<i>Euglena gracilis</i>	0,9	11,3	1,3	–	3,1	3,5	19,3	–	9,0	–	(Lang, I. et al. 2011)
<i>Heterococcus chodati</i>	–	10,0	30,6	–		8,1		32,6	–	–	(Lang, I. et al. 2011)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	4,2	14–24	24–30	–	3–5	2,9	0–9	27–49	–	22–37	(Araujo, G. S. et al. 2011), (San Pedro, A. et al. 2014)
<i>Pavlova lutheri</i>	9,7	20,1	26,3	–	1,7	0,5	0,4	18,2	9,8	35	(Lang, I. et al. 2011)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	4,4	14–16	40–60	–	8,1	1,0	20–30	18,4	1,4	32	(Rodolfi, L. et al. 2009)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	–	30,7	–	23,3	6–25	8–18	10–33	–	–	21–58	(Abou-Shanab, R. A. et al. 2011)
<i>Schizochytrium sp.</i>	2–8	20–45	–	4,8	38,4	7,9	1,2	5–12	5–50	51–71	(Chang, G. et al. 2013), (Jovanovic, S. et al. 2021), (Manikan, V. et al. 2015)
<i>Thraustochytrium sp.</i>	1,6	16,8	–	0,2	0,2	0,2	–	7,5	69	13	(Lee Chang, K. J. et al. 2014)
<i>Tribonema vulgare</i>	4,1	13,3	34,4	–	–	–	10,5	17,4	–	–	(Lang, I. et al. 2011)
<i>Ulkenia sp.</i>	–	25–30	–	–	10–12	–	–	5–15	15–30	20–52	(Lee Chang, K. J. et al. 2014)

В дополнение к межвидовым различиям продуктивность микроводорослей по ПНЖК может меняться в зависимости от стадии роста и условий культивирования. Микроводоросли способны менять текучесть мембран в ответ на изменения температуры, тем самым изменяя жирнокислотный профиль (Renaud, S. M. et al. 2002), (Rousch, J. M. et al. 2003). Кроме того, в ряде работ было показано, что микроводоросли увеличивают накопление нейтральных липидов в условиях недостатка питательных веществ (Adams, C. et al. 2013), (Saha, S. K. et al. 2013). В публикациях (Maltsev, Y. et al. 2018), (Mamaeva, A. et al., 2018) было показано, что применение азотного и фосфорного голодания приводит к значительному повышению накопления липидов в биомассе микроводорослей: для штамма *Parietochloris grandis* sp. nov. содержание жирных кислот в биомассе увеличилось в 3 раза (с 15 % до 44,3 % сухой массы) при культивировании в среде без добавления нитратов и фосфатов; в то время как для штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 в аналогичных условиях содержание липидов в биомассе увеличилось в 3,5 раз (с 17 % до 60 % сухой массы), а триацилглицеридов – в 7,5 раз (с 1,5 % до 11 % сухой массы). При этом было показано, что дефицит нитратов и фосфатов в среде приводит к снижению выхода биомассы на 30 % - 40 %, поэтому для максимизации объемной продуктивности по липидам целесообразно осуществлять депривацию по завершении фазы экспоненциального роста.

В отличие от нейтральных липидов, полярные липиды активно накапливаются микроводорослями в достатке питательных веществ в активной фазе роста, что связано с активным созданием клеточных мембран (Saha, S. K. et al. 2013). В работе (Taipale, S. et al. 2020) изучалось влияние стадии роста и внешних условий на производительность по омега-3 и омега-6 ПНЖК различных штаммов микроводорослей, принадлежащих к шести крупнейшим группам (Cryptophytes, Dinophytes, Chrysophytes, Diatoms, Chlorophytes и Cyanobacteria). Результаты показали, что содержание ПНЖК значительно варьируется в пределах одной группы в зависимости от размера клеток. Повышение температуры и содержания азота в среде приводило к повышению производства ЭПК, ДГК и докозапентаеновой кислоты (22:5) у Криптофитовых, Золотистых и Динофитовых микроводорослей,

причем синтез ПНЖК у быстрорастущих штаммов Диатомовых и Динофитовых микроводорослей был наиболее активен в экспоненциальной фазе роста, в то время как у других групп (Криптофитовых и Золотистых) максимальная продуктивность наблюдалась в стационарной фазе роста.

1.6 Микроводоросли как источник каротиноидов

Микроводоросли являются важным природным источником пигментов, которые играют ключевую роль в фотосинтетической фиксации углерода и других клеточных процессов (Silva, S. C. et al. 2020). Помимо этого, пигменты микроводорослей обладают широким спектром биологической активности, включая антиоксидантную, противовоспалительную, нейропротекторную, противоопухолевую и антидиабетическую (D'Alessandro, E. B. et al. 2016) (Таблица 7), из-за чего активно применяются в пищевой и кормовой промышленности, а также в косметологии и фармацевтике (Sun, H. et al. 2023).

Таблица 7 – Основные пигменты микроводорослей.

Группа пигментов	Штаммы-продуценты	Биологическая активность	Ссылка на литературный источник
Хлорофиллы	<i>Chlorella sp.</i> , <i>Monoraphidium dybowskii</i> , <i>Scenedesmus dimorphus</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Pavlova lutheri</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	Иммуностимулирующая, антиоксидантная, онкопротекторная	(da Silva Ferreira, V. et al. 2017), (Jurić, S. et al. 2022)
Фикобилины	<i>Spirulina platensis</i> , <i>Geitlerinema</i> , <i>Porphyridium sp.</i>	Противоопухолевая, антиоксидантная, нейропротекторная	(Cuellar-Bermudez, S. P. et al. 2015), (Jacob-Lopes, E. et al., 2019), (Jurić, S. et al. 2022), (Sigurdson, G. T. et al. 2017)
Каротиноиды			

β-каротин	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Dunaliella bardawil</i>	Противоопухолевая, антиоксидантная, противодиабетическая, подавление синтеза холестерина, фотопротекторная, регулирование липидного обмена, источник провитамина А	(Beydoun, M. A. et al. 2019), (Jacob-Lopes, E. et al. 2019), (Jurić, S. et al. 2022), (Monte, J. et al. 2020), (Sigurdson, G. T. et al. 2017), (Sluijs, I. et al. 2015)
Лютеин	<i>Chlorella protothecoides</i> , <i>Muriellopsis sp.</i> , <i>Scenedesmus almerienses</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Spinacia oleracea</i> , <i>Actinidia deliciosa</i>	Антиоксидантная, иммуностимулирующая, противовоспалительная, нейропротекторная, гепатопротекторная, кардиопротекторная, ретинопротекторная	(Du, S. Y. et al. 2015), (Huang, Y. M. et al. 2015), (Jurić, S. et al. 2022), (Low, K. L. et al. 2020), (Luengo, E. et al. 2015), (Shakeri, A. et al. 2018), (Sun, Y. X. et al. 2014)
Астаксантин	<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Chlorella zofingiensis</i> , <i>Chlorella sp.</i>	Антиоксидантная, фотопротекторная, противовоспалительная, противоопухолевая, регулирование липидного обмена	(Chuyen, H. V. et al. 2017), (Cuellar-Bermudez, S. P. et al. 2015), (Jacob-Lopes, E. et al. 2019), (Park, J. S. et al. 2010), (Pogorzelska, E. et al. 2018), (Praveenkumar, R. et al. 2015), (Yoshida, H. et al. 2010)
Фукоксантин	<i>Cylindrotheca closterium</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Mallomonas sp.</i> , <i>Nitzschia laevis</i> , <i>Odontella aurita</i> , <i>Chaetoceros sp.</i>	Антиоксидантная, противовоспалительная, противоопухолевая, противодиабетическая, регулирование липидного обмена, стимулирование снижения массы тела	(Hosokawa, M. et al. 1999), (Jurić, S. et al. 2022), (Park, J. S. et al. 2010), (Zarekarizi, A. et al. 2019)

Каротиноиды – это жирорастворимые пигменты, имеющие красный, коричневый, желтый или оранжевый цвета. Каротиноиды являются полиненасыщенными соединениями терпенового ряда, их молекулы представляют собой полиеновую цепь, содержащую 4 изопrenoидных остатка, по концам которой расположены циклогексановые кольца или алифатические изопrenoидные остатки. По химической структуре каротиноиды делятся на два класса: каротины и ксантофиллы. Каротины не содержат атомов кислорода в химической структуре и представлены, например, α- и β-каротином. Ксантофиллы наоборот содержат атомы кислорода в молекулах в виде гидроксильных групп (например, зеаксантин и

лютеин), кетогрупп (кантаксантин), либо их комбинации (астаксантин, фукоксантин, виолаксантин). Каротиноиды также делятся на первичные и вторичные метаболиты. Первичные каротиноиды являются функциональными компонентами клеточного фотосинтетического аппарата и, как правило, связаны с мембранами или специфичными белками в тилакоидной мембране (в случае ксантофиллов), в то время как вторичные каротиноиды синтезируются в ответ на специфические внешние воздействия и находятся в жировых везикулах. Каротиноиды выполняют две основные функции в процессах фотосинтеза: (1) поглощение света в тех областях спектра, которые не могут эффективно поглощаться хлорофиллами и (2) защита хлорофиллов от фотоокисления. Каротиноиды способны эффективно нейтрализовывать реактивные формы кислорода, благодаря чему обладают высокой антиоксидантной активностью (Varela, J. C. et al. 2015). На сегодняшний день известно более 600 различных каротиноидов, при этом в микроводорослях наиболее часто встречаются ликопин, β -каротин, зеаксантин, атаксантин, фукоксантин, лютеин и виолаксантин. Наиболее важными для практического применения являются β -каротин, атаксантин, фукоксантин и лютеин.

β -каротин является прекурсором витамина А и обладает оранжево-желтым цветом. Спрос на природный β -каротин довольно высок, так как он обладает повышенной биологической активностью по сравнению с синтетическим. Микроводоросли рода *Dunaliella* могут содержать более 14 % β -каротина в сухой массе, благодаря чему являются одним из важнейших природных источников данного соединения (Spolaore, P. et al. 2006). *Scenedesmus quadricauda* способна накапливать до 2 мг/г β -каротина при фотоавтотрофном культивировании (Rajput, A. et al. 2022). Другие микроводоросли классов Cyanobacteria, Bacillariophyta, и Euglenophyta также способны производить β -каротин.

Атаксантин это метаболит β -каротина розового цвета. Он синтезируется из β -каротина под воздействием β -каротин гидроксилазы и β -каротин оксигеназы при возникновении стрессовых условий (например, избыточного освещения) и накапливается в жировых везикулах у хлоропластов. В клетке атаксантин существует в виде эфира или диэфира жирных кислот, а также может находиться в

форме четырех изомеров в зависимости от положения гидроксильных групп. Различные штаммы Зеленых микроводорослей, такие как *Haematococcus pluvialis*, *Chlorococcum sp.* и *Chlorella zofingiensis* могут накапливать до 5 % астаксантина в сухой массе в стрессовых условиях (Villaró, S. et al. 2021).

Лютеин - это пигмент, придающий желтую или оранжево-красную окраску в зависимости от концентрации. Множество двойных связей в молекуле лютеина позволяет ему проявлять сильную антиоксидантную активность за счет взаимодействия с реактивными формами кислорода. Кроме того, лютеин защищает фоторецепторы путем фильтрации синего света (500 нм) (Andrade, D. et al. 2014). Одним из основных коммерческих источников лютеина являются микроводоросли *Muriellopsis sp.*, способные накапливать 0,4 % - 0,6 % данного соединения в биомассе (Blanco, A. M. et al. 2007). Зеленые водоросли *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella protothecoides*, и *Scenedesmus sp.*, также способны накапливать значимые количества лютеина, однако на сегодняшний день лишь *Scenedesmus almeriensis* и *Muriellopsis sp.* культивировались в промышленном масштабе (Fernández-Sevilla, J. M. et al. 2010).

Оранжевый пигмент фукоксантин является одним из наиболее распространенных каротиноидов (10 % от общего объема) и повсеместно распространен в морских экосистемах. Молекула фукоксантина содержит сопряженные двойные связи, а также гидроксильные, карбонильные и эпоксидные группы (Sun, H. et al. 2023). Эти уникальные особенности строения ответственны за многочисленные биологические эффекты фукоксантина: антиоксидантную и противовоспалительную активность (Fung, A. et al. 2013), (Grasa-López, A. et al. 2016), противоопухолевые свойства (Ahmed, S.A. et al. 2022), регулирование уровня глюкозы в крови, а также стимулирование снижения массы тела в испытаниях на мышах (Wu, M. T. et al. 2014) и человеке (Abidov, M. et al. 2010). Данные свойства могут быть отчасти связаны с особенностями метаболизма фукоксантина. К примеру, в человеческом организме фукоксантин полностью метаболизируется до значительно более гидрофильного соединения – фукоксантинола, после чего поступает в печень и другие ткани (Asai, A. et al. 2008). В то же время в организме

мышей и крыс фукоксантин превращается в амароусиксантин А, полсе чего откладывается в жировой ткани (Gammone, M. A. et al. 2015). В ряде стран препараты на основе фукоксантина одобрены для лечения ожирения (Khaw, Y. S. et al. 2022). Механизмы, ответственные за данный физиологический эффект фукоксантина и его метаболитов подробно описаны в работе (Gammone, M. A. et al. 2015) и включают в себя: снижение уровня триглицеридов в плазме и печени, угнетение синтеза жирных кислот, снижение дифференциации адипоцитов и ингибирование поглощения ими глюкозы, стимулирование термогенеза и липолиза в белой жировой ткани, а также регулирование уровня лептина – гормона, связанного со снижением аппетита и повышением использования жировых резервов организма. Фукоксантин является одним из наиболее высокомаржинальных продуктов микроводорослей, стоимость одного килограмма фукоксантина в зависимости от качества и концентрации составляет 40-80 тыс. долл. (Abu-Ghosh, S. et al. 2021). В 2020 году мировой рынок фукоксантина оценивался в 500 млн долл. с прогнозом роста до 780 млн долл. к 2025 году при среднегодовом темпе роста 6 % (Tzima, S. et al. 2023).

Основным промышленным источником получения фукоксантина являются бурые макроводоросли, такие как *Undaria pinnatifida*, *Eisenia bicyclis*, *Cystoseira abies-marina*, *Himanthalia elongata* и *Sargassum muticum*. В то же время микроводоросли, например, диатомовые *Halamphora coffeaeformis*, *Phaeodactylum tricornutum* и *Odontella aurita*, способны накапливать в 100-200 раз больше фукоксантина в биомассе при несравнимо более высокой скорости роста (Porovich, C. A. et al. 2020), (Xia, S. et al. 2018). Другим перспективным продуцентом фукоксантина является *Isochrysis galbana*, способный накапливать до 2 % фукоксантина в сухой массе (Gao, F. et al. 2021). В ряде работ было показано, что микроводоросли родов *Cylindrotheca*, *Chaetoceros*, *Nitzschia*, *Amphora*, *Navicula* и *Chrysotila* также способны накапливать фукоксантин в количествах 0,2 % - 2 % сухой массы (Khaw, Y. S. et al. 2022).

1.7 Методы выделения внутриклеточных продуктов микроводорослей

Наиболее распространенным методом выделения внутриклеточных метаболитов микроводорослей является экстракция различными органическими растворителями. Для выделения полярных молекул, таких как пигменты, применяются спирты (метанол, этанол) а также кетосоединения (ацетон). Для экстракции триацилглицеридов и других неполярных молекул часто применяется гексан, ввиду низкой стоимости и достаточно высокой эффективности извлечения. Система хлороформ-метанол (в различных соотношениях) позволяет эффективно извлекать как полярные, так и неполярные молекулы, из-за чего получила широкое распространение для извлечения внутриклеточных продуктов различных классов. Следует отметить, что эффективность экстракции значительно снижается при высоком содержании воды в биомассе, поэтому высушивание различными методами является необходимым этапом подготовки биомассы микроводорослей к переработке. Ввиду наличия у многих микроводорослей (особенно класса Chlorophyta) прочной и толстой клеточной стенки, разрушение клеток необходимо для увеличения эффективности выделения целевых продуктов.

Механическое разрушение клеток, осуществляемое путем перемалывания бусами или обработки высоким давлением, зачастую является наиболее простым и эффективным методом подготовки биомассы микроводорослей к экстракции (Yap, B. N. et al. 2014), (Choi, W. Y. et al. 2016), (Doucha, J. et al. 2008). В работе (Cho, S. C. et al. 2012) было продемонстрировано, что гомогенизация биомассы *Scenedesmus sp.* с помощью высокого давления (8,3 МПа) привела к повышению выхода липидов на 25 % при экстракции системой растворителей хлороформ : метанол (2:1), а также улучшению других параметров процесса, таких как температура (с 65°C до 35°C) и время экстракции (с 5 часов до 30 минут), по сравнению с экстракцией из необработанных клеток.

Помимо механического разрушения в последнее время активно исследуются более сложные методы физико-химического воздействия на биомассу, наибольшее распространение из которых получили применение ультразвука и микроволн (Ibañez,

Е. et al. 2012), (Herrero, M. et al. 2015). Ультразвуковое воздействие основано на обработке биомассы звуковыми волнами высокой частоты (более 20 кГц), которые вызывают формирование кавитационных пузырьков (Ibañez, E. et al. 2012). Схлопывание кавитационных пузырьков создает локальную область высоких температур и давления, что вызывает разрушение клеточного материала. Ввиду сложности масштабирования и относительно высоких энергозатрат, данный метод получил широкое распространение лишь на уровне лабораторных исследований (Pico, Y. 2013). В ряде работ было показано существенное ускорение экстракции (в 5-10 раз) при использовании ультразвукового воздействия при извлечении липидов (Ma, Y. A. et al. 2014), пигментов (Pasquet, V. et al. 2011) и жирных кислот (Plaza, M. et al. 2012) из биомассы микроводорослей.

Микроволновое воздействие основано на применении электромагнитного излучения частотой 300^6 - 300^9 Гц. Микроволны индуцируют вращение диполей и миграцию ионов в биомассе и растворителе, что вызывает нагрев жидкости и разрушение клеток вследствие повышения внутреннего давления (Tatke, P. et al. 2011). Следует отметить, что данное воздействие ведет к значительному нагреву образца (100°C - 200°C) и потому может вызывать деградацию нестабильных метаболитов. Экстракция с применением микроволновой обработки применялась для извлечения липидов из *Isochrysis galbana* (Lin, C. Y. et al. 2015), *Chlorella* sp. (Ma, Y. A. et al. 2014) и *Chlorella sorokiniana* (Pan, J. et al. 2016), а также пигментов из *Cylindrotheca closterium* (Pasquet, V. et al. 2011) и *Phaeodactylum tricornutum* (Gilbert-López, B. et al. 2017). В указанных работах микроволновая обработка биомассы микроводорослей показывала сопоставимые или лучшие выходы целевых веществ по сравнению с ультразвуковой, при более высокой скорости экстракции.

Помимо новых методов разрушения клеток, в последние годы активно исследуются применение альтернативных растворителей, таких как ионные жидкости, сверхкритический углекислый газ и растворы ферментов. Как правило, данные методы обладают большей экологичностью и безопасностью (что особенно актуально для пищевой и фармацевтической промышленности) по сравнению с традиционными органическими растворителями, однако их применение зачастую

является более дорогим, и потому подходит только для извлечения высокомаржинальных продуктов.

1.8 Системы масштабного культивирования микроводорослей

Наиболее распространенным методом культивирования микроводорослей является фотоавтотрофное культивирование, при котором источником энергии является искусственный или естественный свет, а источником углерода – углекислый газ, подаваемый в культуру вместе с воздухом в различных соотношениях. Гетеротрофное (культивирование микроводорослей без освещения с применением органических источников углерода и энергии, например глюкозы) и миксотрофное (с применением как света, так и дополнительных источников углерода) культивирование микроводорослей также используется для некоторых штаммов, однако как правило является более дорогим из-за высокой стоимости питательных сред и необходимостью использовать антимикробных веществ для борьбы с бактериальным или грибковым заражением. Существует два метода технологической организации культивирования микроводорослей в промышленных масштабах: выращивание биомассы в открытых резервуарах и использование фотобиореакторов, в которых культура изолирована от внешней среды.

Выращивание в открытых резервуарах является исторически первым и наиболее простым методом крупномасштабного культивирования микроводорослей. Данный метод и сегодня является широко распространенным ввиду относительно низких капитальных и операционных затрат, низкого энергопотребления, а также простоты реализации и высокой масштабируемости (Costa, J. A. V. et al. 2014), (Tan, J. S. et al. 2020). Существует несколько видов реализации открытого культивирования, среди которых наибольшее распространение в промышленности получило использование прудов с непрерывным движением (raceway ponds). Данные сооружения представляют собой систему замкнутых изогнутых каналов глубиной около 30 см, заполненных питательной средой, циркуляция и перемешивание которой осуществляется гребным колесом. Дно каналом может быть грунтовым, а

может укрепляться бетоном и покрываться различными полимерными материалами (Johnson, T. J. et al. 2018). Пруды с непрерывным движением являются более энергоэффективными по сравнению с открытыми резервуарами других конфигураций: применение всего одного гребного колеса достаточно для обслуживания пруда общей площадью до 5 гектар (Rogers, J. N. et al. 2014). Данные сооружения также легко масштабируются, и крупнейшие из них занимают площадь в несколько десятков гектар (Spolaore, P. et al. 2006). Несмотря на широкую распространенность, культивирование микроводорослей в открытых резервуарах имеет ряд существенных недостатков, ограничивающих спектр их применения: невозможность поддержания чистоты культуры; невозможность контроля параметров культивирования; значительные потери воды вследствие испарения; сильная зависимость от климатических и метеорологических условий; невозможность поддержания высокой плотности биомассы (Johnson, T. J. et al. 2018), (Tan, J. S. et al. 2020).

Фотобиореакторы - это закрытые системы, состоящие из пластиковых или стеклянных колонн, трубок или панелей, которые исключают прямой контакт культуры с внешней средой и позволяют контролировать условия выращивания. По сравнению с открытыми резервуарами, фотобиореакторы позволяют поддерживать чистоту культуры и производить в несколько раз больше биомассы на единицу занимаемой площади (Norsker, N. H. et al. 2011), (Chinnasamy, S. et al. 2010). Большинство фотобиореакторов позволяют контролировать сразу несколько параметров культивирования, например pH, состав среды, интенсивность перемешивания, освещенность и благодаря этому могут быть использованы для промышленного выращивания большого числа штаммов и производства широкого спектра метаболитов (Rozenberg, J. M. et al. 2024). К недостаткам фотобиореакторов относится высокие капитальные и эксплуатационные затраты, а также сложность масштабирования (Gupta, P. L. et al. 2015) (Johnson, T. J. et al. 2018), поэтому они получили наибольшее распространение для производства высокомаржинальных продуктов. Одной из ключевых задач дизайна фотобиореакторов является обеспечение оптимального освещения культур с целью максимизации выхода

биомассы и целевого продукта и минимизации затрат электроэнергии в случае использование искусственных источников света. Кроме того, важным является обеспечение эффективного массообмена для обеспечения равномерного доступа всех клеток к свету и питательным веществам, а также борьба с биообрастанием прозрачных поверхностей реактора (Johnson, T. J. et al. 2018). Существует несколько принципиальных дизайнов фотобиореакторных систем, наиболее распространенными из которых являются колонные, трубчатые и панельные фотобиореакторы (Рисунок 5).

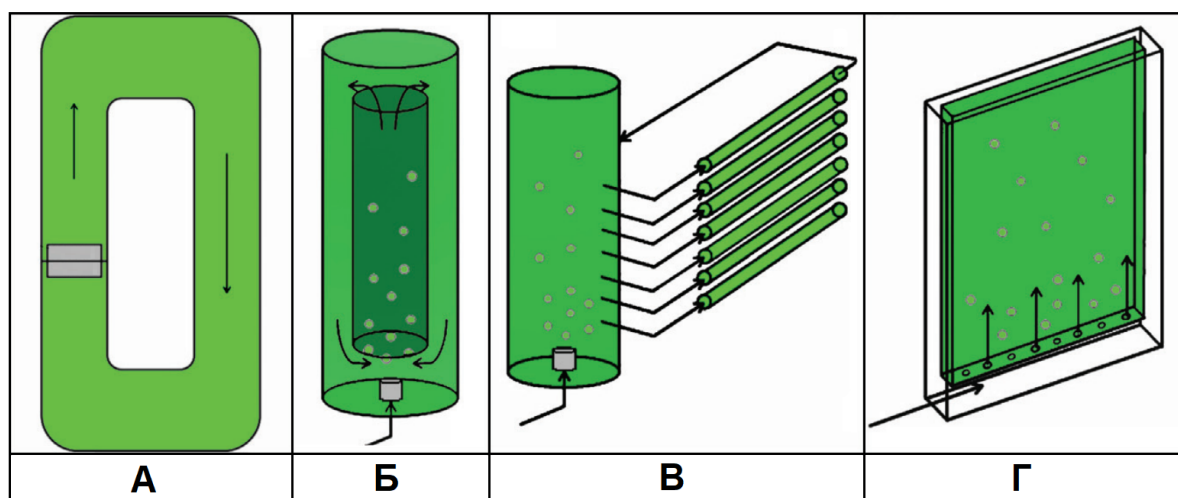


Рисунок 5 – системы культивирования микроводорослей. А - пруд с непрерывным движением, Б - колонный фотобиореактор с эрлифтом, В - трубчатый фотобиореактор, Г - панельный фотобиореактор.

Колонный фотобиореактор представляет собой вертикальную цилиндрическую емкость, оборудованную насосами для откачки/закачки питательной среды и биомассы, а также системой барботирования для перемешивания культуры и подачи углекислого газа (Hannon, M. et al. 2010). Разновидностью данного дизайна является эрлифтный реактор, в котором внутри основной колонны располагается колонна меньшего диаметра для создания вертикальной циркуляции аэрированной питательной среды, что позволяет интенсифицировать циркуляцию суспензии и повышать эффективность фотосинтеза. В работе (Borowiak, D. et al. 2022) было показано, что эрлифтный фотобиореактор позволяет достичь на 16 % большей продуктивности производства астаксантина по

сравнению с обычным колонным реактором. Несмотря на простоту конструкции и эффективный газо- и массообмен (Hannon, M. et al. 2010), (Rinanti, A. et al. 2013), колонные реакторы обладают низкой эффективностью использования освещения и не могут быть эффективно масштабированы из-за хрупкости конструкции, что существенно ограничивает их промышленное применение (Huang, Q. et al. 2017), (Dasgupta, C. N. et al. 2010).

Трубчатые биореакторы состоят из длинных (десятки-сотни метров) прозрачных трубок диаметром 10-500 мм из стекла или пластика, организованных в вертикальные или горизонтальные сети с целью максимизации отношения площади поверхности к занимаемому объему. Питательная среда и биомасса прокачивается через систему труб насосами, а газообмен зачастую осуществляется в рамках отдельного аппарата. К преимуществам трубчатых реакторов относится высокая эффективность использования освещения а также относительно легкая масштабируемость (Gupta, P. L. et al. 2015), (Johnson, T. J. et al. 2018). Ключевым недостатком данного дизайна является плохой массо- и газообмен, что выражается в накоплении кислорода до уровней фотоингибирования. Кроме того, высокая нагрузка на помпы и сложность очистки внутренней поверхности труб от биообрастания создают дополнительные трудности в обслуживании и эксплуатации подобных систем (Gupta, P. L. et al. 2015), (Tan, J. S. et al. 2020). Тем не менее трубчатые реакторы больших объемов (3000-15000 л) успешно применяются для промышленного производства астаксантина (Bajrai, R. et al. 2013) и кормовой биомассы для аквакультуры (Durmaz, Y. et al. 2017).

Панельные фотобиореакторы состоят из одной или нескольких прямоугольных панелей небольшой толщины (5-25 см), заполненных культуральной жидкостью. Панели могут быть выполнены из жесткого или мягкого пластика и расположены вертикально или под наклоном, причем каждая панель подключается к системе барботирования для обеспечения газообмена и перемешивания культуры. Панельные реакторы обладают сравнимой с трубчатыми эффективностью использования освещения и при этом обеспечивают лучший газообмен для избежания фотоингибирования, благодаря чему позволяют достичь наибольшей эффективности

фотосинтеза и высокой продуктивности по биомассе (Yan, X. et al. 2016), (Johnson, T. J. et al. 2018) (Norsker, N. H. et al. 2011). При использовании панелей из мягкого пластика, такие системы легко масштабируются до объемов в несколько тысяч литров (Johnson, T. J. et al. 2018). Недостатком панельных фотобиореакторов с мягкими панелями является проблема утилизации отработанных пластиковых панелей, поскольку с течением времени они тускнеют из-за биообрастания и отложения солей, а также не могут быть автоклавированы для стерилизации (Johnson, T. J. et al. 2018). В таблице 8 представлено сравнение различных систем культивирования микроводорослей по эффективности использования освещения и стоимости производства биомассы, а также потенциал ее оптимизации путем выбора локации с хорошим естественным освещением, рециркуляции питательной среды и использования промышленных отходов в качестве источников нитратов и углекислого газа (Norsker, N. H. et al. 2011).

Таблица 8 – Сравнение систем культивирования микроводорослей

Параметр	Открытые резервуары	Трубчатый фотобиореактор	Панельный фотобиореактор
Эффективность использования освещения, %	1,5	3	5
Продуктивность сухой биомассы, тонн/га	21	41	64
Стоимость производства тонны сухой биомассы в базовом сценарии, евро	4950	4160	5960
Стоимость производства тонны сухой биомассы в результате оптимизации, евро	4170	2280	2300

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Молекулярная идентификация штаммов микроводорослей

2.1.1 Молекулярная идентификация штамма *Vischeria magna* SBV-108

Тотальную ДНК монокультуры штамма экстрагировали с помощью набора InstaGene™ Matrix в соответствии с методикой производителя. Фрагменты ITS2 рДНК длиной 256 пар оснований амплифицировали с использованием праймеров ITS1-ITS4 из публикации (White, T. J. et al. 1990). Амплификация фрагментов проводилась с использованием готовой смеси для ПЦР ScreenMix (Евроген). Условия амплификации фрагментов ITS2 рДНК: первичная денатурация в течение 5 мин при 95°C; затем 35 циклов, состоящих из: денатурации (30 с) при 94°C, отжига праймеров (30 с) при 52°C и элонгации (50-80 с) при 72°C; затем финальная элонгация в течение 10 мин при 72°C. Полученные ампликоны визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле (1,5 %), с окрашиванием красителем SYBR Safe (Life Technologies). Очистку фрагментов ДНК проводили с помощью набора ExoSAP-IT (Affymetrix) в соответствии с методикой производителя. Фрагменты ITS2 рДНК были прочитаны с двух сторон с использованием прямого и обратного ПЦР праймеров и набора BigDye (Applied Biosystems), после чего подвергнуты капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Полученные последовательности редактировали и выравнивали вручную с использованием ПО BioEdit v7.1.3 и MegaX (Kumar, S. et al. 2018). Для выравнивания использовали полученные последовательности, а также 13 последовательностей других штаммов *Vischeria* из GenBank. Филогению максимального правдоподобия (ML) строили с помощью ПО MegaX (Kumar, S. et al. 2018). Бутстрэп-анализ проводили с 1000 повторений. Визуализацию и редактирование деревьев выполняли с использованием ПО FigTree (1.4.2) и Adobe Photoshop CC (19.0).

2.1.2 Молекулярная идентификация штамма *Mallomonas furtiva* SBV-13

Тотальную ДНК из монокультуры штамма экстрагировали с помощью суспензии InstaGene Matrix (BioRad) в соответствии с протоколом производителя. Фрагменты рДНК малой субъединицы (SSU rDNA) длиной 1711 пар оснований амплифицировали с помощью следующих праймеров: 18S-F (Katana, A. et al. 2001) и 18L (Hamby, R. K. et al. 1988). Для амплификации фрагментов ITS1-5.8S-ITS2 рДНК длиной 542-635 пар оснований использовали праймеры KN1 (Wee, J. L. et al. 2001) и Chryso_ITSR (Škaloud, P. et al. 2012). Амплификацию маркера *rbcL* хлоропластной ДНК длиной 654 пар оснований проводили с использованием праймеров *rbcL_2F* (Daugbjerg, N. et al. 1997) и *Synura_rbcLR* (Gusev, E. S. et al. 2018). Амплификацию всех исследованных фрагментов проводили с использованием готовой смеси для ПЦР ScreenMix (Евроген). Условия амплификации фрагментов рДНК: первичная денатурация при 95°C в течение 5 мин; затем 35 циклов, состоящих из денатурации при 94°C в течение 30 сек, отжига праймеров при 52°C в течение 30 сек и элонгации при 72°C в течение 40-90 сек; затем финальная элонгация при 72°C в течение 10 мин. Условия амплификации для фрагментов *rbcL* были аналогичными, за исключением числа циклов (40) и температуры отжига праймеров (48°C). Полученные ампликоны визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле (1,5 %) с окрашиванием красителем SYBR Safe (Life Technologies). Очистку фрагментов ДНК проводили с использованием набора ExoSAP-IT (Affymetrix) в соответствии с протоколом производителя. Все исследованные фрагменты были прочитаны с двух сторон с использованием прямого и обратного ПЦР праймеров и набора BigDye (Applied Biosystems), после чего подвергнуты капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Полученные последовательности редактировали и выравнивали вручную с использованием ПО BioEdit v7.1.3 и MegaX (Kumar, S. et al. 2018). Для выравнивания использовали полученные последовательности, а также 73 последовательности других штаммов *Mallomonas* из GenBank. Кроме того,

последовательности *Synura americana* (Škaloud, P. et al. 2012), *Synura mamillosa* (Takahashi, K. 1972) и *Neotessella lapponica* (Skuja) (Jo, B. Y. et al. 2016) были добавлены в датасет в качестве аутгруппы. Выравнивание последовательностей выполняли с помощью метода ПО SINA v1.2.11 (Pruesse, E. et al. 2012) для фрагментов рДНК, и ПО MAFFT v7 (Kato, K. et al. 2019) для *rbcL* хлоропластной ДНК. Филогению максимального правдоподобия (ML) строили с помощью ПО MegaX (Kumar, S. et al. 2018). Бутстрэп-анализ проводили с 1000 повторений. Визуализацию и редактирование деревьев выполняли с использованием ПО FigTree (1.4.2) и Adobe Photoshop CC (19.0).

2.2 Культивирование микроводорослей

Выращивание *M. furtiva* SBV-13 производилось на модифицированной среде WC (Guillard, R. R. L. et al. 1972) с десятикратным содержанием нитратов и фосфатов. Среда содержала 0,85 г/л NaNO_3 ; 0,114 г/л $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,0126 г/л NaHCO_3 ; 0,0368 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,0212 г/л $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 0,5 г/л Трис-буфера; 0,037 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; микроэлементы (4,36 мг/л Na_2EDTA ; 3,15 мг/л $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,01 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,022 мг/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 мг/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,18 мг/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,006 мг/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1 мг/л H_3BO_3) и витамины (0,1 мг/л тиамина, 0,0005 мг/л биотина).

Выращивание *V. magna* SBV-108 проводилась на модифицированной среде 3NBVM содержащей: 0,75 г/л NaNO_3 ; 0,075 г/л K_2HPO_4 ; 0,175 г/л KH_2PO_4 ; 0,025 г/л NaCl ; 0,025 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,075 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; микроэлементы (4,5 мг/л $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$; 0,582 мг/л $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,03 мг/л $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,012 мг/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,246 мг/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,006 мг/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Культуры выращивались в лабораторном шейкере-инкубаторе Multitron (Infors HT) при температуре 24°C, постоянном перемешивании 150 об/мин и 5 % объемной доле CO_2 в подаваемом воздухе. Освещение интенсивностью 160 мкмоль фотонов/м²с⁻¹ осуществлялось с фотопериодом 16 ч свет : 8 ч темнота. Для культивирования использовался 20 % инокулят, и выращивание производилось в

течение 2 недель. Микроскопия и измерение оптической плотности культур на длине волны 680 нм выполнялось ежедневно.

После лабораторного этапа выращивания, культуральная жидкость использовалась для инокулирования полупромышленного фотобиореактора Lumian AGS260 с рабочим объемом 240 л (Рисунок 6).

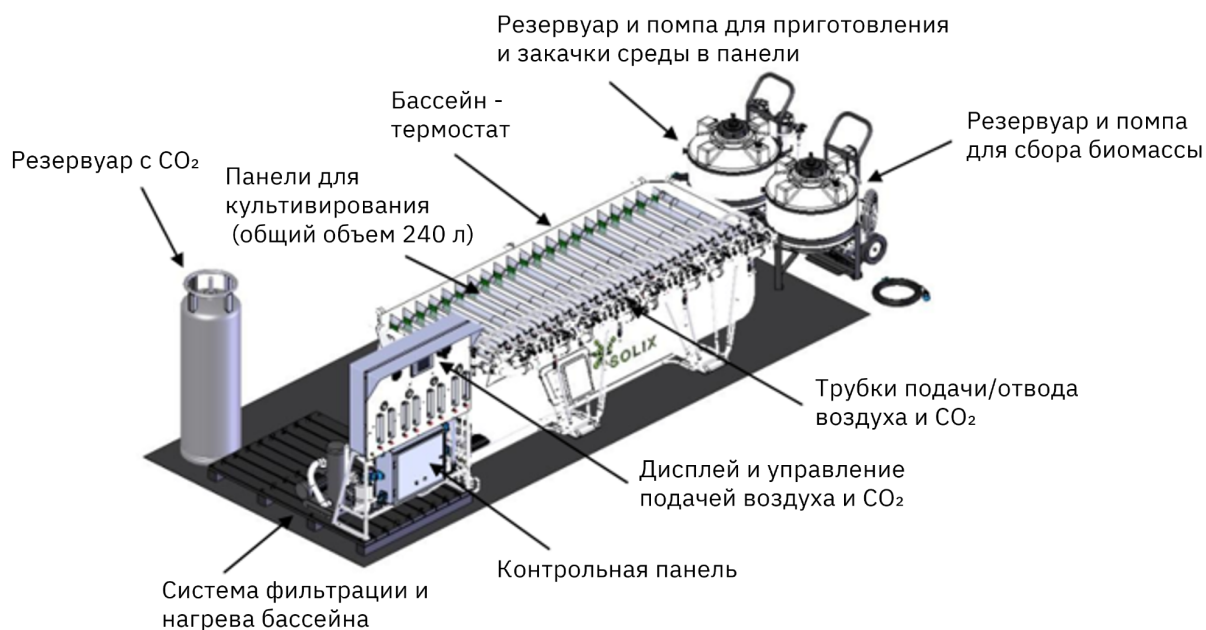


Рисунок 6 – Принципиальная схема фотобиореактора Lumian AGS260.

Реактор работал в режиме периодического культивирования. Культуры выращивались одновременно в разных группах панелей (совокупный объем групп для каждой культуры составлял 120 л). В каждой из панелей 3 л инокулята прибавлялось к 12 л свежей питательной среды, после чего культура выращивалась в течение 14 дней. Освещение осуществлялось с фотопериодом 16 ч свет : 8 ч темнота в двух режимах интенсивности: 120 мкмоль фотонов/м²с в первую неделю культивирования и 235 мкмоль фотонов/м²с во вторую неделю культивирования. Продувание CO₂ осуществлялось в течение 30 мин ежедневно; контроль pH 7 и температуры 24°C осуществлялся в автоматическом режиме. Раз в два дня 20 мл культуры отбирали из каждой панели для микроскопирования, определения сухой биомассы и содержания нитратов и фосфатов в среде. На 8 и 14 день выращивания 100 мл культуры отбирали из каждой панели для определения содержания ПНЖК и

фукоксантина. По истечении 14 дней культивирования, 12 л культуральной жидкости откачивалось из панели и центрифугировалось на проточной центрифуге CERA LE (Biorus). Оставшиеся 3 л культуральной жидкости использовались в качестве инокулята для следующего этапа. Собранная биомасса подвергалась лиофилизации в течение 48-72 ч в лиофильной сушке FreeZone (Labconco). Полученный порошок взвешивался и отправлялся на хранение при -80°C в кельвинатор MDF-U4186S (Sanyo).

2.3 Определение выхода сухой массы культуры и содержания нитратов и фосфатов в среде

Для проведения измерений отбирали 20 мл культуральной жидкости из каждой панели фотобиореактора раз в два дня. Перед измерениями образец микроскопировали на оптическом микроскопе CX41 (Olympus) при увеличении 400х для оценки состояния культуры и мониторинга загрязнений. Для определения массовой концентрации образец центрифугировали при 15000 g в течение 3 мин, затем полученную биомассу лиофилизировали на сушке Free Zone (Labconco) и взвешивали на аналитических весах. Оставшийся после центрифугирования супернатант (12 мл) использовали для определения содержания нитратов и фосфатов.

Определение содержания нитратов и фосфатов проводили на УФ-ВИД спектрофотометре DR 6000 (HACH-Lange). Стандарты нитратов Permachem NitraVer 5 Powder Pillows и фосфатов Permachem PhosVer 3 Powder Pillows от производителя (HACH-Lange) использовались для калибровки прибора. Определение концентраций производилось согласно интегрированным в прибор протоколам № 357 «N Nitrate UV» и № 490 «P React. PV» соответственно.

2.4 Оценка жизнеспособности лиофилизата микроводорослей

Леофилизат отбирали на кончике стерильного шпателя и помещали в колбу объемом 50 мл. Затем в колбу добавляли 20 мл среды, в которой исследуемый штамм микроводоросли культивировался ранее. После трех дней культивирования на столе при температуре 27°C и постоянном освещении 120 мкмоль фотонов/м²с проводили визуальную оценку жизнеспособности культуры с помощью микроскопа CX41 (Olympus) при увеличении x400. После визуальной оценки, жизнеспособность клеток изучали с помощью цитофлуориметрического анализа с использованием красителя SYTOX Green Nucleic Acid Stain (ThermoFisher Scientific). Для этого к 95 мкл культуры добавляли 5 мкл 50 мкМ раствора красителя и инкубировали в течение 15 мин в темноте. После этого разбавляли в 5-10 раз фосфатным буфером (в зависимости от количества клеток в культуре) и анализировали на проточном цитофлуориметре NovoCyte 2060 (Agilent). Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и анализировали в канале FITC 530/30 нм (не менее 10 тыс. событий). В качестве контрольных образцов использовали живые культуры клеток, а также неокрашенные лиофилизированные клетки.

2.5 Химический анализ биомассы микроводорослей

2.5.1 Определение содержания фукоксантина

Определение содержания фукоксантина в биомассе производилось следующим образом. Точную навеску образца 10,0 мг взвешивали в эппендорфе, добавляли 1,0 мл ацетонитрила (АЦН) и помещали на встряхиватель с частотой 1800 встряхиваний в минуту на 10 мин. По окончании экстракт центрифугировали в течение 3 мин при оборотах 15000 g. Экстракт над осадком объемом 0,9 мл отбирали с осторожностью мерной пипеткой и переносили в другой эппендорф, после чего в исходную пробу добавляли 0,5 мл АЦН, повторяли экстракцию и

центрифугирование и отбирали 0,5 мл оставшегося экстракта. Далее каждый из экстрактов анализировали отдельно.

Количественное определение содержания фукоксантина в экстрактах проводили методом ВЭЖХ с использованием градуировочных растворов фукоксантина. Стандартный раствор фукоксантина (Sigma-Aldrich fucoxanthin standard PN F6932) в АЦН концентрацией 1 мг/мл готовили взвешиванием 10 мг в мерной колбе на 10 мл. Градуировочные растворы концентрацией 20, 40, 60, 80 и 100 мкг/мл готовили соответствующим разбавлением стандартного раствора АЦН. Растворы анализировали в 3-кратном повторе на хроматографе Nexera X2 (Shimadzu) с диодно-матричным детектором SPD M20A и ВЭЖХ колонкой Discovery C18 15 x 4,6 мм, 5 мкм (Supelco) в следующих условиях. Подвижная фаза: вода 25 % – АЦН 75 %, 10 мин, градиент до 90 % АЦН до 12 мин, затем 9 % АЦН до 17 мин, обратный градиент до 75 % АЦН до 18 мин, окончание анализа при 23 мин. Расход подвижной фазы 1 мл/мин, длина волны детектора 450 нм. Построение градуировочной кривой осуществляли с помощью программы LabSolution.

Степень извлечения фукоксантина из водорослей определяли путем анализа 3 последовательных экстрактов одного образца одинаковыми объемами растворителя, 1 мл АЦН. После первой экстракции отбирали 0,9 мл экстракта, затем к остатку добавляли 0,9 мл АЦН, проводили вторую экстракцию, снова отбирали 0,9 мл, аналогично повторяли экстракцию в третий раз. Было получено следующее соотношение концентраций экстрактов: $C_1 = 102,5$; $C_2 = 13,7$; $C_3 = 1,2$. Учитывая последовательность операций и неполный отбор экстракта, при двух экстракциях, с точностью до погрешности определения, был сделан вывод о том, что вещество извлекается полностью.

Количество фукоксантина в водорослях рассчитывали по следующей формуле:

$$\Phi (\%) = 100 \cdot (V_1 \cdot C_1 + V_2 \cdot C_2) / M,$$

Где C_1 и C_2 – концентрации фукоксантина в первом и втором экстракте;

V_1 и V_2 – объемы первого и второго экстрактов;

М – масса навески биомассы.

2.5.2 Определение содержания эйкозапентаеновой кислоты и других жирных кислот

Определение содержания эйкозапентаеновой кислоты в биомассе производилось следующим образом. Точную навеску образца лиофильно высушенной биомассы массой 10 мг помещали в стеклянную пробирку на 10 мл с закручивающейся крышкой с PTFE прокладкой добавляли пипет-дозатором 600 мкл внутреннего стандарта нонадекановой кислоты, три стеклянных шарика и 2 мл раствора HCl в MeOH с концентрацией 1,25 М. Точность дозирования внутреннего стандарта контролировали весовым методом. Далее пробу перемешивали в течение 1 мин и выдерживали 2 ч при 96 °С на водяном термостате. Каждые 30 мин образцы встряхивали в течение 15 сек на скорости 1800 об/мин. По истечении 2 ч образцы охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1 мл насыщенного раствора NaCl и перемешивали пробу. После расслоения отбирали 100 мкл органической фазы, добавляли 900 мкл гексана и анализировали пробу методом газовой хромато-масс-спектрометрии на оборудовании Trace GC Ultra DSQ II (Thermo Scientific) с колонкой HP-5MS 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм. Температурный режим анализа: изотерма 140 °С 5 мин, нагрев до 280 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма 280 °С 15 мин, ввод пробы объемом 1 мкл в режиме деления потока 1:20, поток газа-носителя He 1,2 мл/мин. Детектирование аналита осуществлялось в режиме селективного детектирования ионов SIM с соотношением массы к заряду 67, 74, 79, 87, 91. Количественное определение эйкозапентаеновой кислоты осуществлялось методом внешнего стандарта эйкозапентаеновой кислоты Eicosapentaenoic acid ethyl ester standard PHR1790 (Sigma-Aldrich) По калибровочному графику с использованием внутреннего стандарта нонадекановой кислоты для учета потерь пробоподготовки.

Анализ на содержание прочих жирных кислот проводили аналогично анализу на содержание эйкозапентаеновой кислоты, однако калибровку времен удерживания проводили по смесям метиловых эфиров жирных кислот Fatty Acid Methyl Esters, Unsaturated Kit ME14-1KT и Fatty Acid Methyl Esters, Saturated Straight Chains ME10-1KT (Supelco). Детектирование аналита при хромато-масс-спектрометрическом анализе состава жирных кислот осуществлялось в режиме полного ионного тока (70 эВ) в диапазоне соотношений массы к заряду от 50 до 550. Определение содержания жирных кислот осуществлялось методом внутренней нормализации.

2.5.3 Определение содержания белка

Определение содержания общего белка проводили согласно методике из публикации (Lowry, O. et al. 1951). 5 мг сухой биомассы смешивали с 25 мл дистиллированной воды. Готовили реагент путем добавления 1 мл 1 % раствора тартарата натрия-калия к 50 мл 0,2 г/л раствора карбоната натрия в 0,1 Н NaOH. Затем 0,5 мл образца добавляли к 0,6 мл 1Н NaOH и помещали на водяную баню (100°C) на 5 мин. После охлаждения до комнатной температуры, к образцу добавляли 2,5 мл приготовленного ранее реагента и 0,6 мл реактива Фолина-Чокалтеу (Ленреактив) после чего смесь перемешивали и оставляли в темноте на 30 мин. Содержание белка определяли измеряя оптическое поглощение раствора на длине волны 750 нм на УФ-ВИД спектрофотометре DR 6000 (HACH-Lange).

2.5.4 Определение содержания жиров

Для определения содержания тотальных липидов использовали методику (Bligh, E. G. et al. 1959) с модификациями. 200 мг сухой биомассы смешивали с 3,2 мл метанола и гомогенизировали. Далее добавляли 4 мл хлороформа и 4 мл

метанола и перемешивали в течение 15 мин. После перемешивания добавляли 4 мл 0,3 % раствора NaCl, после чего отделяли верхнюю фракцию, состоящую из раствора NaCl и метанола. Нижнюю фракцию, содержащую хлороформ и липиды высушивали и определяли содержание липидов гравиметрически.

2.5.5 Определение содержания углеводов

Для определения содержания углеводов использовали методику (DuBois, M. et al. 1956). 5 мл сухой биомассы смешивали с 25 мл дистиллированной воды. В тестовую пробирку добавляли 1 мл образца, 1 мл 5 % раствора фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты и помещали пробирку в ледяную баню для охлаждения. После охлаждения измеряли оптическую плотность образца на 488 нм на УФ-ВИД спектрофотометре DR 6000 (HACH-Lange).

2.6 Приготовление тестовых кормов

Тестовые корма готовили путем влажного смешивания гомогенизированного коммерческого корма Supreme-15 (Coppens) с высушенной биомассой микроводорослей. Полученную массу высушивали при 50°C, гомогенизировали и просеивали через сито для получения однородных гранул необходимого размера (0,5 мм). Было приготовлено три тестовых корма: Корм 1, содержащий 10 % биомассы *V. magna* SBV-108; Корм 2, содержащий 10 % биомассы *M. furtiva* SBV-13; Корм 3, содержащий 5 % биомассы *V. magna* SBV-108 и 5 % биомассы *M. furtiva* SBV-13. Гомогенизированный корм Supreme-15 (Coppens) использовался в качестве контроля, его состав приведен в (Таблица 9).

Таблица 9 – Состав контрольного корма Supreme-15 (Coppens).

Компонент	Содержание
Белок (% сухой массы)	46

Жиры (% сухой массы)	15
Клетчатка (% сухой массы)	1,8
Зола (% сухой массы)	8,1
Общий фосфор (% сухой массы)	1,06
Витамин А (УЕ/кг)	10000
Витамин D (УЕ/кг)	2790
Витамин Е (мг/кг)	200
Витамин С (мг/кг)	490
Общая энергия (кДж/г)	21
Легко усваиваемая энергия (кДж/г)	19,2

2.7 Выращивание тилляпии

Эксперименты по выращиванию тилляпии выполнялись на базе кафедры Аквакультуры и водных биоресурсов ФГБУ ВО Астраханского государственного технического университета (АГТУ). Методика эксперимента и протоколы выращивания рыбы были одобрены Комитетом по этике работы с животными АГТУ. Мальки красной тилляпии *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*, выращенные в АГТУ, с исходной массой $0,56 \pm 0,04$ г были случайным образом распределены по 12 аквариумам объемом 10 л с плотностью посадки 10 мальков на аквариум. Каждый аквариум был оснащен индивидуальным биофильтром и системой контроля температуры. 5 % воды в каждом аквариуме обновлялось ежедневно.

Качество воды контролировалось ежедневно для соответствия следующим параметрам: температура 29-30°C, pH 7-8, растворенный кислород 8-10 мг/л, общий аммонийный азот <0,8 мг/л, концентрация нитритов <0,15 мг/л, концентрация нитратов 100-200 мг/л, проводимость 8000-3000 мкСм/см. Фотопериод 16 ч свет : 8 ч темнота использовался для стимулирования природного освещения. Длительность

эксперимента составляла 15 дней. Тестовые корма были случайным образом распределены между аквариумами, по 3 аквариума на каждый корм. Рыбу кормили вручную четыре раза в день в следующих временных интервалах: 7:00-7:30, 11:00-11:30, 15:00-15:30 и 19:00-19:30; дневная норма кормления составляла 7,5 % от массы тела (El-Dahhar, A. A. 2007).

2.8 Контроль параметров воды

Температура, pH, проводимость и растворенный кислород в каждом аквариуме проверяли дважды в день в 7:00 и в 19:00 с помощью предварительно откалиброванного мультипараметрического анализатора HI2030-02 edge (Hanna Instruments). Содержание нитратов, нитритов и общего аммонийного азота в каждом аквариуме измеряли ежедневно с помощью УФ-ВИД спектрофотометра DR 6000 (HACH-Lange). Для определения содержания нитратов использовался реагент NitraVer 5 Nitrate Reagent Powder Pillows и методика Method 8039 от производителя (HACH-Lange). Для определения содержания нитритов использовался реагент NitriVer 2 Nitrite Reagent Powder Pillows и методика Method 8153 от производителя (HACH-Lange). Для определения общего аммонийного азота использовался набор реагентов Nitrogen, Total, LR, Test 'N Tube Reagent Set и методика Method 10071 от производителя (HACH-Lange).

2.9 Химический анализ кормов и рыбы

Химический анализ кормов и мяса рыбы проводили согласно единым стандартным методикам. Перед началом эксперимента 10 мальков из той же партии, что и экспериментальные рыбы, были использованы для определения исходного химического состава мяса. Сухая масса и содержание воды определяли высушиванием образцов при 103°C в течение 4 ч до постоянной массы (ISO 6496). Содержание золы определяли путем сжигания образцов в муфельной печи при 550°C в течение 4 ч (ISO 5984). Содержание белка (N x 6,25) определяли по

Къельдалю (ISO 5983). Содержание жира определяли с помощью экстракции по Сокслету (ISO 5986). Содержание углеводов вычисляли путем вычитания массы белка, жиров и золы из сухой массы образца.

2.10 Оценка ростовых характеристик и показателей эффективности кормления

Для определения ростовых характеристик и показателей эффективности кормления использовали формулы из публикаций (Sarker, P. K. et al. 2016a), (Sarker, P. K. et al. 2016b), (Sarker, P. K. et al. 2018).

1) Абсолютный прирост вычисляли как разность между усредненной итоговой (M_1) и исходной (M_0) массой рыбы в граммах.

2) Абсолютную скорость роста (AGR) вычисляли по формуле:

$$AGR = \frac{M_1 - M_0}{T}$$

где:

M_0 – исходная масса рыбы, г;

M_1 – итоговая масса рыбы, г;

T – длительность эксперимента, дней.

3) Удельную скорость роста (SGR) вычисляли по формуле:

$$SGR = \frac{[\ln M_1 - \ln M_0]}{T} \times 100$$

где:

M_0 – исходная масса рыбы, г;

M_1 – итоговая масса рыбы, г;

T – длительность эксперимента, дней.

4) Выживаемость определяли путем учета мертвых рыб во время ежедневной чистки аквариумов по формуле:

$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{Исходное количество рыб в аквариуме}}{\text{Итоговое количество рыб в аквариуме}} \times 100\%$$

5) Конверсию корма (FCR) вычисляли по формуле:

$$FCR = \frac{\text{Суммарное потребление корма (г)}}{\text{Суммарный прирост массы (г)}}$$

6) Прирост на грамм кормового белка (PER) вычисляли по формуле:

$$PER = \frac{M_1 - M_0}{P_i}$$

где:

M_0 – исходная масса рыбы, г;

M_1 – итоговая масса рыбы, г;

P_i – суммарное потребление белка с кормом, г.

7) Эффективность использования белка (PPV) вычисляли по формуле:

$$PPV = \frac{P_1 - P_0}{P_i} \times 100\%$$

где:

P_0 – исходное содержание белка в мясе рыбы, г;

P_1 – итоговое содержание белка в мясе рыбы, г;

P_i – суммарное потребление белка с кормом, г.

8) Эффективность использования энергии (EPV) вычисляли по формуле:

$$EPV = \frac{E_1 - E_0}{E_i} \times 100\%$$

где:

E_0 – исходное содержание энергии в мясе рыбы, кДж;

E_1 – итоговое содержание энергии в мясе рыбы, кДж;

E_i – суммарное потребление энергии с кормом, кДж.

9) Содержание энергии в мясе рыб вычисляли по формуле:

$$\text{Энергия} = 23,66 \times P + 39,57 \times F + 17,17 \times C$$

где:

P, F и C – содержание белка, жира и углеводов, соответственно, в мокрой массе, г

10) Статистический анализ выполняли с использованием ПО STATISTICA (StatSoft). Данные ростовых характеристик, показателей эффективности кормления и химического состава мяса рыб подвергали однофакторному дисперсионному анализу ANOVA и тесту Тьюки в случае сравнения нескольких экспериментальных групп. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM) по трем повторностям ($n=3$). Отсутствие индексов или одинаковые индексы в рамках одного ряда данных свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий между величинами ($p > 0,05$), в то время как разные индексы свидетельствуют о наличии статистически значимых различий между величинами ($p < 0,05$).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Биотехнологическое исследование штамма *Vischeria magna* SBV-108

3.1.1 Описание штамма

Отдел: Heterokontophyta

Класс: Eustigmatophyceae

Порядок: Eustigmatales

Семейство: Chlorobotryaceae

Род: *Vischeria*

Штамм: *Vischeria magna* SBV-108 (J.B. Petersen, Kryvenda, Rybalka, Wolf & Friedl) (Синоним: *Eustigmatos magnus* (J.B. Petersen D.J. Hibberd); *Pleurochloris magna* (J.B. Petersen)) (Рисунок 7). *Vischeria magna* SBV-108 депонирован в Коллекции живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA) под регистрационным номером SYKOA E-07-09 (SYKOA, Сыктывкар, Россия, <https://ib.komisc.ru/sykoa/eng/collection/280/>).

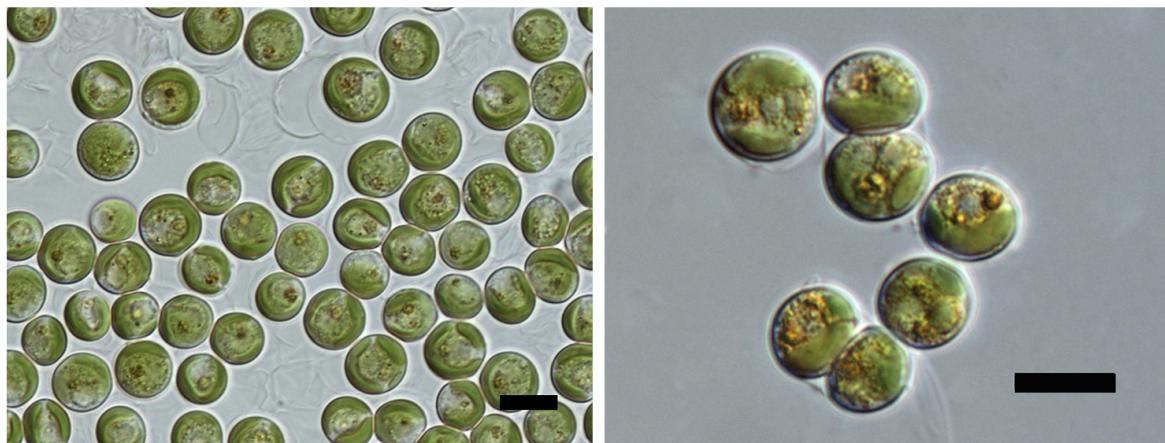


Рисунок 7 – Вегетативные клетки *V. magna* SBV-108. Масштабная линейка 10 мкм.

Репрезентативный сиквенс ITS2 рДНК: GenBank PP178161.

Происхождение: Выделен из почвы, травяно-злаково-ивняковое сообщество 20 VII 2009, Россия, Приполярный Урал, гора Баркова 65°12'34" N, 60°15'45"E, 630 м

над уровнем моря. Детальное описание местообитания, включая химию почвы, представлено в публикации (Patova, E. N. et al. 2023).

Морфологическое описание: форма клеток шаровидная, размер 6-14 мкм, в оптимальных условиях большинство клеток имеет диаметр 10-11 мкм; пиреноид полигональный, крупный, угловой, без обкладки и тилакоидов; хроматофор чашевидный, с глубоко вырезанными лопастными краями; штамм размножается зооспорами и автоспорами, у зооспоры имеется один жгутик, автоспоры образуются по 2-4 шт; при длительном хранении клетки увеличиваются в размерах за счет вакуолизации, цитоплазма гранулируется, происходит обесцвечивание хлоропластов. Размер и форма клеток совпадает с описанием в (Ettl 1978). Сравнение с другими штаммами рода *Vischeria* на основе ITS2 рДНК показало, что штамм относится к кладе *Vischeria magna* (Рисунок 8).

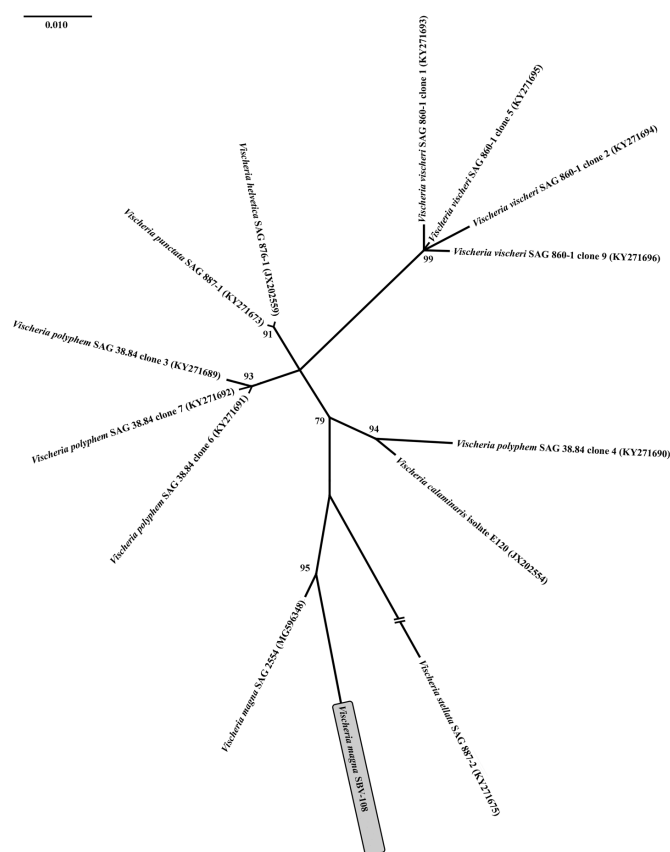


Рисунок 8 – Неукорененное Байесовское древо ITS2 рДНК штаммов рода *Vischeria*. Значения бутстрепа приведены у узлов. Масштабная линейка отражает число замен на 1 сайт.

3.1.2 Оценка жизнеспособности лиофилизата

Микроскопирование культуры *V. magna* SBV-108 показало, что после лиофилизации форма клеток не изменялась, клеточная стенка оставалась четко очерченной, все органеллы находились внутри клеток. На рисунке 9 показано состояние клеток после лиофилизации. При инкубировании лиофилизата *V. magna* SBV-108 на питательной среде происходило увеличение оптической плотности суспензии.

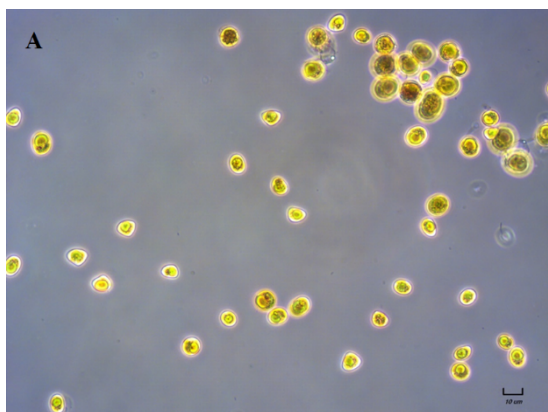


Рисунок 9 – Микрофотография клеток *V. magna* SBV-108 после лиофилизации.

Данные микроскопирования подтверждались результатами цитофлуориметрического анализа. Для неокрашенных клеток лиофилизата *V. magna* SBV-108 сигнал флуоресценции достигал 10^5 (Рисунок 10А). Для живых клеток в присутствии SYTOX Green флуоресценция оставалась на таком же уровне. События с флуоресценцией выше 10^6 принимались за мертвые клетки. В живой культуре присутствовало не более 3 % мертвых клеток (Рисунок 10Б). В лиофилизированном образце около 5 % мертвых клеток (Рисунок 10В). Таким образом, было показано, что клетки *V. magna* SBV-108 сохраняют жизнеспособность после лиофилизации.

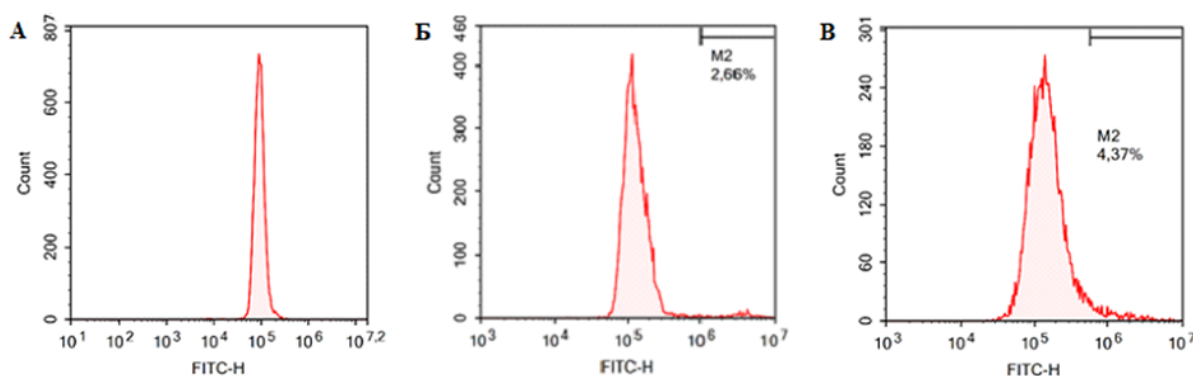


Рисунок 10 – Оценка жизнеспособности клеток *V. magna* SBV-108 после лиофилизации. А – неокрашенный лиофилизат, Б – живая культура, окрашенная SYTOX Green, В – образец после лиофилизации и окрашивания.

3.1.3 Культивирование и химический анализ биомассы

При культивировании в фотобиореакторе Lumian AGS260 *V. magna* SBV-108 достиг финальной концентрации сухой массы 4 г/л, что соответствует массовой продуктивности 0,29 г/л/день. Питательные вещества среды были полностью утилизированы штаммом в течение 14-дневного цикла культивирования. Кривые роста и поглощения питательных веществ для *V. magna* SBV-108 приведены ниже (Рисунок 11).

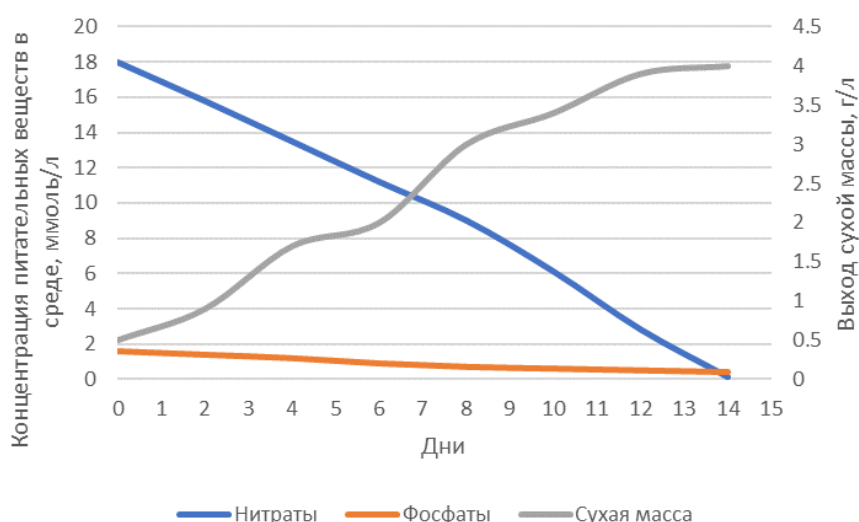


Рисунок 11 – Кривые роста и поглощения питательных веществ для *V. magna* SBV-108

В условиях эксперимента штамм достиг высокого содержания липидов – 38,6 % сухой массы. В его жирнокислотном профиле доминировали омега-7 пальмитолеиновая кислота (50 мг/г сухой массы) и омега-3 эйкозапентаеновая кислота (46,1 мг/г сухой массы). Химический состав биомассы *V. magna* SBV-108 приведен ниже (Таблица 10).

Таблица 10 – Химический состав биомассы *V. magna* SBV-108.

Компонент	Содержание, % сухой массы
Белок	23,2
Жиры	38,6
Углеводы	28,2
Зола	10,0
Жирнокислотный профиль	Содержание, мг/г сухой массы
C14:0	2,5
C16:1 (n-7)	50,1
C16:0	12,2
C18:2 (n-6)	13,8
C18:1 (n-9)	9,5
C20:4 (n-6)	6,3
C20:5 (n-3) ЭПК	46,1

Содержание эйкозапентаеновой кислоты в биомассе на 8 и 14 день культивирования различалось незначительно. Максимальный объемный выход эйкозапентаеновой кислоты при культивировании *V. magna* SBV-108 был достигнут на 14 день культивирования и составил 186,6 мг/л, в то время как максимальная объемная продуктивность была достигнута на 8 день культивирования и составила 17,4 мг/л/день (Таблица 11).

Таблица 11 – Объемная продуктивность штамма *V. magna* SBV-108 по биомассе и эйкозапентаеновой кислоте (ЭПК) при культивировании в фотобиореакторе (120 л).

Параметр	8 день культивирования	14 день культивирования
Объемный выход биомассы, г/л	3,02 ± 0,08	4,00 ± 0,06
Объемная продуктивность по биомассе, г/л/день	0,38 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Содержание ЭПК в биомассе, мг/г	45,93 ± 0,61	46,13 ± 1,06
Объемный выход ЭПК, мг/л	139,53 ± 3,48	185,63 ± 2,96
Объемная продуктивность по ЭПК, мг/л/день	17,44 ± 0,44	13,26 ± 0,21

*Значения представлены как среднее ± SEM

3.1.4 Обсуждение

Наиболее перспективным биотехнологическим свойством штамма *V. magna* SBV-108 является накопление большого количества ЭПК в биомассе. По литературным данным, *V. magna* SBV-108 является лидером по данному показателю среди всех описанных на сегодняшний день природных пресноводных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании (Таблица 12).

Таблица 12 – Содержание эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в биомассе микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании.

Штамм	Среда обитания	Содержание ЭПК, мг/г сухой массы	Ссылка на литературный источник
<i>Nannochloropsis oceanica</i> CY2	морской	55,7	(Chen, C. Y. et al. 2013)
<i>Vischeria magna</i> SBV-108	пресноводный	46,1	Настоящее исследование
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	морской	38,9	(Jakhwal, P. et al. 2022)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> П242	морской	38,6	(Alonso, D. L. et al. 1996)
<i>Pavlova</i> sp. CS-50	морской	35,2	(Martínez-Fernández, E. et al. 2006)

<i>Nannochloropsis oceanica</i> IMET1	морской	31,2	(Jakhwal, P. et al. 2022)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	морской	30,8	(Jakhwal, P. et al. 2022)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> NIVA BAC 2	морской	28,4	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Nannochloropsis oceanica</i> NIVA 2/03	морской	23,4	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Porphyridium cruentum</i> SRP-6	морской	23,2	(Cohen, Z. et al. 1992)
<i>Nitzschia</i> sp. FD397	пресноводный	23,1	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Pavlova lutheri</i>	морской	23,1	(Jakhwal, P. et al. 2022)
<i>Diatoma tenuis</i> CPCC 62	пресноводный	18,9	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Aurantiochytrium</i> sp. SD116::PfaA-D	морской	18,7	(Wang, S. et al. 2020)
<i>Pavlova</i> sp. NIVA 4/92	морской	18,0	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Chaetoceros</i> sp. CS-256	морской	15,4	(Martínez-Fernández, E. et al. 2006)
<i>Gymnodinium fuscum</i> K-1836	пресноводный	13,7	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> CPCC 267 (CCAP 1079/4)	пресноводный	12,6	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Chaetoceros muelleri</i> CS-176	морской	10,4	(Martínez-Fernández, E. et al. 2006)
<i>Peridinium cinctum</i> K-1721	пресноводный	10,2	(Peltomaa, E. et al. 2019)
<i>Rhodomonas baltica</i>	морской	8,0	(Wang, X. et al. 2019)
<i>Porphyridium cruentum</i> NIVA 1/92	морской	6,1	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Tetraselmis suecica</i> NIVA 3/92	морской	4,8	(Patil, V. et al. 2007)
<i>Rhodomonas baltica</i> NIVA 5/91	морской	4,4	(Patil, V. et al. 2007)

V. magna SBV-108 показал высокий объемный выход биомассы (4 г/л) и ЭПК (185,6 мг/л) при культивировании в панельном фотобиореакторе Lumian AGS260 в объеме 120 л (Таблица 11). Объемная продуктивность штамма по ЭПК также является самой высокой среди описанных в литературе природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании в объеме более 50 л (Таблица 13). Следует отметить, что в отличие от большинства высокоэффективных продуцентов ЭПК, *V. magna* SBV-108 является пресноводным, что потенциально обеспечивает ему преимущество при культивировании в закрытых фотобиореакторах за счет снижения образования солевых осадков и более низкой стоимости питательных сред.

Таблица 13 – Объемная продуктивность по эйкозапентаеновой кислоте (ЭПК) различных штаммов микроводорослей, культивируемых в фотобиореакторах объемом более 50 л.

Штамм	Среда обитания	Объем фотобиореактора, л	Продуктивность по ЭПК, мг/л/день	Ссылка на литературный источник
<i>Vischeria magna</i> SBV-108	пресноводный	120	17,4	Настоящее исследование
<i>Nannochloropsis</i> sp.	морской	500	11,7	(Cheng-Wu, Z. et al. 2001)
<i>Nannochloropsis gaditana</i> B-3	морской	250	11,5	(Camacho-Rodríguez, J. et al. 2014)
<i>Isochrysis galbana</i> ALII-4	морской	50	8,2	(Grima, E. M. et al. 1994)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 640	морской	51	7,1	(Benavides, A. M. S. et al. 2013)
<i>Tribonema aequale</i> SAG200.80	пресноводный	140	2,7	(Long, J. et al. 2022)

<i>Halamphora coffeaeformis</i>	морской	300	1,3	(Popovich, C. A. et al. 2020)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	морской	100	1,3	(Nogueira, N. et al. 2020)
<i>Tribonema minus</i> UTEX B 3156	пресноводный	1000	1,11	(Davis, A. K. et al. 2021)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> PTN0301	морской	70	0,9	(Simonazzi, M. et al. 2019)
<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 1776	морской	7500	0,8	(Crowe, B. et al. 2012)

3.2 Биотехнологическое исследование штамма *Mallomonas furtiva* SBV-13

3.2.1 Описание штамма

Отдел: Gyrista

Класс: Chrysophyceae

Порядок: Synurophyceae

Семейство: Mallomonadaceae

Род: *Mallomonas*

Штамм: *Mallomonas furtiva* SBV-13 (E.S. Gusev) (Синоним: *Mallomonas kalinae* (E.S. Gusev)) (Рисунок 12). *Mallomonas furtiva* SBV-13 депонирован в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» под регистрационным номером ВКПМ AI-23 (Каталог микроорганизмов. URL: <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov>).

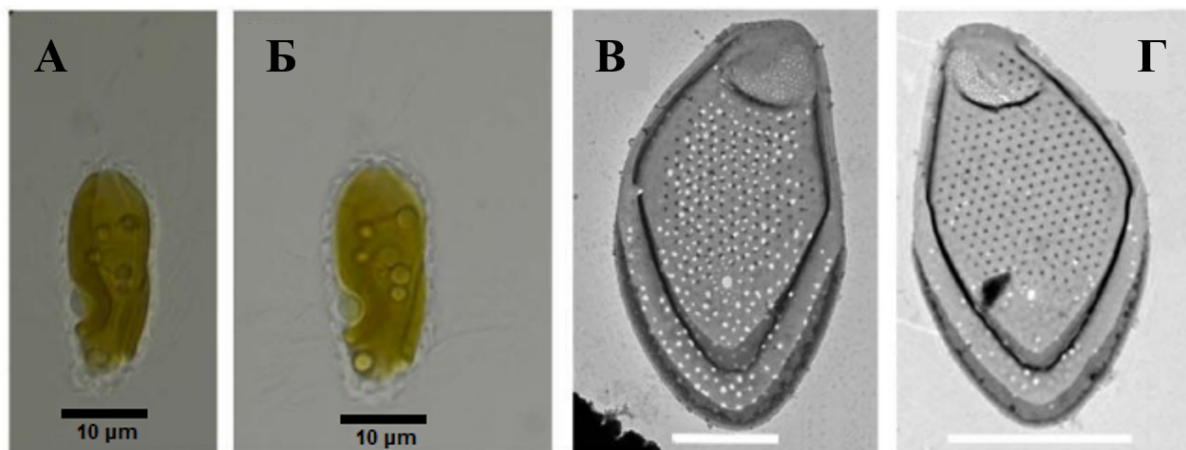


Рисунок 12 – А, Б - Вегетативные клетки *M. furtiva* SBV-13 (масштабная линейка 10 мкм); В, Г - кремнеземные чешуйки клеток *M. furtiva* SBV-13 (масштабная линейка 1 мкм).

Репрезентативный сиквенс 18S рДНК: GenBank KX905104

Происхождение: Выделен из безымянного пресноводного водоема в провинции Кханьхоа, Вьетнам, N 12°15.016', 109°09.083' E.

Морфологическое описание: Клетки имеют удлинённо-эллипсоидную форму, размером 18-25 × 8-15 мкм. Клетки покрыты овальными кремнеземными чешуйками размером 3,6-4,3 × 2,2-2,5 мкм. Хлоропласт одиночный, двухлопастной. Клетки с двумя жгутиками, короткий и длинный (виден только длинный). При длительном хранении без пересева клетки обездвиживаются и образуют скопления в слизи. Данные молекулярных исследований показывают, что *Mallomonas furtiva* SBV-13 наиболее близок к *Mallomonas rasilis* и *Mallomonas kalinae* (Рисунок 13).



Рисунок 13 – Байесовское древо штаммов рода *Mallomonas* на основе комбинированного анализа рДНК малой субъединицы (SSU rDNA) и *gbcL* хлоропластной ДНК. Значения байесовских апостериорных вероятностей и бутстрепа максимального правдоподобия приведены слева и справа от разделительных линий, соответственно. Масштабная линейка отражает число замен на 1 сайт. Два штамма рода *Synura* и штамм *Neotessella lapponica* использованы в качестве аутгруппы.

3.2.2 Оценка жизнеспособности лиофилизата

Проведенный анализ показал, что лиофилизированные клетки штамма *M. furtiva* SBV-13 не сохраняют жизнеспособность. Микроскопирование показало, что после лиофилизации форма клеток изменилась, внутриклеточное содержимое часто находилось вне клетки. На рисунке 14 показано состояние клеток *M. furtiva* SBV-13 после лиофилизации. При инкубировании лиофилизата на питательной среде оптическая плотность суспензии не увеличивалась, при этом наблюдалась дальнейшая деградация клеток.

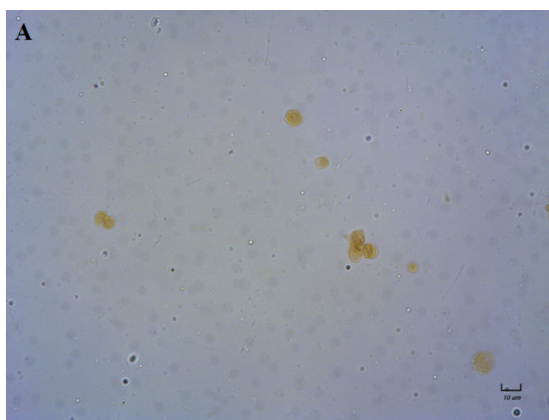


Рисунок 14 – Микрофотография клеток *M. furtiva* SBV-13 после лиофилизации.

Для неокрашенных клеток *M. furtiva* SBV-13 сигнал флуоресценции составлял 10^4 (Рисунок 15А). События с флуоресценцией 10^6 и более принимались за мертвые клетки водорослей. В живой культуре присутствовало около 10 % мертвых клеток (Рисунок 15Б). В образце после лиофилизации все клетки погибли (Рисунок 15В).

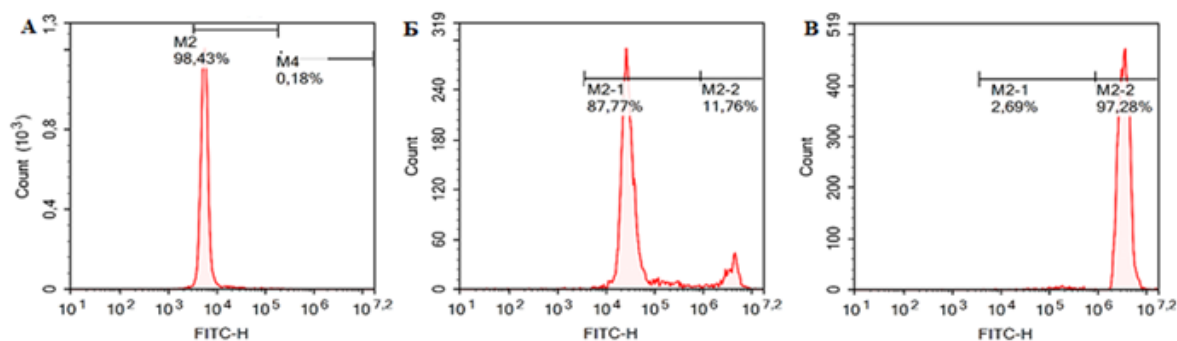


Рисунок 15 – Оценка жизнеспособности клеток *M. furtiva* SBV-13 после лиофилизации. А – неокрашенный лиофилизат. Б – живая культура, окрашенная SYTOX Green. В – образец после лиофилизации и окрашивания.

3.2.3 Культивирование и химический анализ биомассы

При культивировании в фотобиореакторе Lumian AGS260 *M. furtiva* SBV-13 показал финальную концентрацию сухой массы 2 г/л и массовую продуктивность 0,14 г/л/день. Питательные вещества среды были полностью утилизированы в течение 14-дневного цикла культивирования. Кривые роста и поглощения питательных веществ для *M. furtiva* SBV-13 приведены ниже (Рисунок 16).

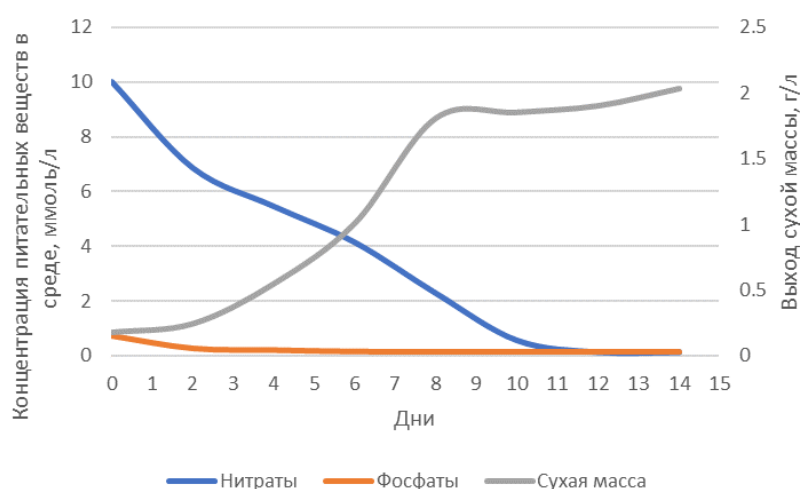


Рисунок 16 – Кривые роста и поглощения питательных веществ для *M. furtiva* SBV-13.

В условиях эксперимента биомасса *M. furtiva* SBV-13 содержала 41,3 % белка, 15,4 % жиров и 15,7 % углеводов. В жирнокислотном профиле штамма преобладали омега-9 олеиновая кислота (29,5 мг/г сухой массы) и миристиновая кислота (19,3 мг/г сухой массы). Химический состав биомассы приведен ниже (Таблица 14).

Таблица 14 – Химический состав биомассы *M. furtiva* SBV-13.

Компонент	Содержание, % сухой массы
Белок	41,3
Жиры	15,4
Углеводы	15,7
Зола	25,0
Фукоксантин	2,6
Жирнокислотный профиль	Содержание, мг/г сухой массы
C14:0	19,3
C16:0	7,9
C18:1 (n-9)	29,5
C18:2 (n-6)	12,7
C18:4 (n-3)	10,4
C22:2 (n-6)	2,1

Содержание фукоксантина в биомассе *M. furtiva* SBV-13 на 8 и 14 день культивирования различалось незначительно, и в среднем составило 25,9 мг/г сухой массы. Объемный выход фукоксантина составил 53,7 мг/л, а максимальная объемная продуктивность была достигнута на 8 день культивирования и составила 6,1 мг/л/день (Таблица 15).

Таблица 15 – Объемная продуктивность штамма *M. furtiva* SBV-13 по биомассе и фукоксантину при культивировании в фотобиореакторе (120 л).

Параметр	8 день культивирования	14 день культивирования
----------	---------------------------	----------------------------

Объемный выход биомассы, г/л	$1,82 \pm 0,07$	$2,06 \pm 0,08$
Объемная продуктивность по биомассе, г/л/день	$0,23 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$
Содержание фукоксантина в биомассе, мг/г	$25,88 \pm 0,19$	$26,10 \pm 0,31$
Объемный выход фукоксантина, мг/л	$48,48 \pm 1,77$	$53,70 \pm 2,13$
Объемная продуктивность по фукоксантину, мг/л/день	$6,06 \pm 0,22$	$3,84 \pm 0,15$

*Значения представлены как среднее $\pm$ SEM

3.2.4 Обсуждение

Ключевой биотехнологической особенностью *Mallomonas furtiva* SBV-13 является способность накапливать большие количества каротиноида фукоксантина – 26,1 мг/г сухой массы – что является наивысшим значением среди известных в настоящий момент природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании (Таблица 16).

Таблица 16 – Содержание фукоксантина в биомассе микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании.

Штамм	Среда обитания	Содержание фукоксантина, мг/г сухой массы	Ссылка на литературный источник
<i>Mallomonas furtiva</i> SBV-13	пресноводный	26,1	Настоящее исследование
<i>Odontella aurita</i> SCCAP K-1251	морской	21,7	(Xia, S. et al. 2013)
<i>Isochrysis aff. galbana</i> CCMP1324	морской	18,2	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Isochrysis sp.</i>	морской	17	(Crupi, P. et al. 2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> KMMCC (B-007)	морской	15,7	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 646	морской	10,3	(Eilers, U. et al. 2016)

<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX L642	морской	10,2	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> KMMCC-14	морской	8,5	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Prymnesium parvum</i>	пресноводный	7,9	(Allen, M. B. et al. 1960)
<i>Sellaphora minima</i>	пресноводный	7,2	(Gerin, S. et al. 2020)
<i>Isochrysis galbana</i> KMMCC-12	морской	6,0	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Nitzschia cf. carinospeciosa</i> SBV-25	пресноводный	5,5	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Cylindrotheca closterium</i>	морской	5,3	(Pasquet, V. et al. 2011)
<i>Nitzschia palea</i>	пресноводный	5,3	(Gerin, S. et al. 2020)
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	морской	5,2	(Foo, S. C. et al. 2015)
<i>Nitzschia sp.</i> KMMCC-308	морской	4,9	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Nitzschia cf. carinospeciosa</i> SBV-26	пресноводный	4,0	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Ochromonas danica</i>	пресноводный	3,1	(Allen, M. B. et al. 1960)
<i>Cyclotella meneghiniana</i> SBV-23	пресноводный	2,3	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Chaetoceros gracilis</i> KMMCC-27	морской	2,2	(Kim, S. M. et al. 2012)
<i>Cyclotella meneghiniana</i> SBV-11	пресноводный	2,0	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 640	морской	1,8	(Reboloso-Fuentes, M. M. et al. 2001)
<i>Paralia longispina</i> SBV-19	морской	1,4	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Chromulina ochromonoides</i>	пресноводный	1,3	(Withers, N. W. et al. 1981)
<i>Mougeotia sp.</i>	пресноводный	0,9	(Soares, A. T. et al. 2019)

<i>Cyclotella cf. cryptica</i> <i>SBV12</i>	пресноводный	0,7	(Petrushkina, M. et al. 2017)
<i>Selenastrum</i> <i>bibraianum</i>	пресноводный	0,4	(Soares, A. T. et al. 2019)
<i>Desmodesmus</i> <i>denticulatus</i> var. <i>linearis</i>	пресноводный	0,07	(Soares, A. T. et al. 2019)

Штамм показал достаточно быстрый и устойчивый рост в полупромышленном фотобиореакторе Lumian AGS260 в объеме 120 л и достиг максимальной объемной продуктивности по фукоксантину 6,1 мг/л/день на 8 день культивирования (Таблица 15). Данный показатель также является одним из наиболее высоких для природных штаммов, выращиваемых фотоавтотрофно в реакторах сопоставимого объема: среди всех описанных в литературе штаммов лишь *Odontella auriata* (Xia et al., 2013) показал большую продуктивность по фукоксантину 6,9 мг/л/день (Таблица 17). Следует отметить, что все упоминаемые в литературе высокопродуктивные штаммы являются морскими, что потенциально удорожает их культивирование по сравнению с *M. furtiva* SBV-13 за счет более высокой стоимости питательных сред и необходимости борьбы с осаждением солей при эксплуатации закрытых фотобиореакторов.

Таблица 17 – Объемная продуктивность по фукоксантину различных штаммов микроводорослей, культивированных в фотобиореакторах объемом более 50 литров.

Штамм	Среда обитания	Объем фотобиореактора, л	Продуктивность по фукоксантину, мг/л/день	Ссылка на литературный источник
<i>Odontella auriata</i>	морской	75	6,9	(Xia, S. et al. 2013)
<i>Mallomonas furtiva</i> SBV-13	пресноводный	120	6,1	Настоящее исследование
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	морской	800	5,1	(Marella, T. K. et al. 2020)

<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	морской	50	4,7	(Gao, B. et al. 2017)
<i>Odontella auriata</i> K-1251	морской	240	3,7	(Zhang, H. et al. 2022)
<i>Pavlova</i> sp. OPMS 30543	морской	60	1,1	(Kanamoto, A. et al. 2021)
<i>Tisochrysis lutea</i>	морской	190	0,7	(Gao, B. et al. 2017)

3.3 Исследование влияния включения биомассы *Vischeria magna* SBV-108 и *Mallomonas furtiva* SBV-13 в стартовый корм на ростовые характеристики и эффективность кормления мальков тилапии

3.3.1 Состав исследованных кормов

Состав исследованных кормов представлен ниже (Таблица 18). Добавление биомассы *V. magna* SBV-108 в Корм 1 и 3 привело к незначительному увеличению содержания жиров и снижению содержания белка, в то время как Корм 2, содержащий биомассу *M. furtiva* SBV-13, практически не отличался от контрольного корма по данным параметрам. Добавление микроводорослей незначительно увеличило содержание углеводов во всех тестовых кормах, при этом общая энергия кормов практически не изменилась.

Таблица 18 – Химический состав исследованных кормов.

Компонент	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3
Биомасса <i>M. furtiva</i> SBV-13 (%)	0	0	10	5
Биомасса <i>V. magna</i> SBV-108 (%)	0	10	0	5
Белок (% сухой массы)	46,0	43,7	45,8	45,1

Жиры (% сухой массы)	15,0	17,3	15,1	16,2
Углеводы (% сухой массы)	8,0	9,9	8,9	9,3
Общая энергия (кДж/г)	21	22	21	22

3.3.2 Ростовые характеристики рыб

Итоговая масса всех рыб по окончании эксперимента превысила 1 г, что говорит об эффективности исследованных кормов. За время эксперимента не было зафиксировано гибели рыб ни в одном из аквариумов. Наибольшую эффективность роста продемонстрировали рыбы, получавшие Корм 1 (содержащий 10 % биомассы *V. magna* SBV-108), их средняя итоговая масса составила 1,27 г, что почти на 25 % выше аналогичного показателя контрольной группы (1,03 г) ($p < 0,05$). Итоговая масса рыб, получавших Корм 3 (содержащим 5 % биомассы *V. magna* SBV-108 и 5 % биомассы *M. furtiva* SBV-13) и Корм 2 (содержащим 10 % биомассы *M. furtiva* SBV-13) не показала статистически значимого отличия от итоговой массы рыб контрольной группы. Средние значения абсолютного прироста и абсолютной скорости роста рыб во всех экспериментальных группах превышали показатели контрольной группы, однако только для Корма 1 эта разница была статистически значимой. Удельная скорость роста была наивысшей у рыб из группы Корма 1 (на 25 % выше контроля) ($p < 0,05$), затем следовали группы Корма 3, Корма 2 и контрольная группа, которые статистически значимо не различались. Следует отметить, что рыбы очень быстро реагировали на корм, особенно на содержащие микроводоросли Корма 1-3. Можно предположить, что корма с добавлением микроводорослей обладали дополнительными аттрактивными свойствами. Обобщенные данные ростовых характеристик рыб приведены ниже (Таблица 19, Рисунок 17, 18).

Таблица 19 - Влияние исследованных кормов на ростовые характеристики мальков тилапии.

Параметр	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-критерий	P-значение
Исходная масса (г)	0,57 ± 0,02 ^a	0,58 ± 0,01 ^a	0,58 ± 0,02 ^a	0,53 ± 0,01 ^a	1,72	0,167
Итоговая масса (г)	1,03 ± 0,03 ^a	1,27 ± 0,07 ^b	1,08 ± 0,05 ^{a,c}	1,10 ± 0,04 ^{a,b,c}	4,56	0,005
Абсолютный прирост (г)	0,46 ± 0,04 ^a	0,70 ± 0,07 ^b	0,50 ± 0,05 ^{a,c}	0,57 ± 0,04 ^{a,b,c}	4,56	0,005
AGR (г/день)	0,03 ± 0,002 ^a	0,05 ± 0,005 ^b	0,03 ± 0,003 ^{a,c}	0,04 ± 0,003 ^{a,b,c}	4,07	0,009
SGR (%/день)	3,97 ± 0,31 ^a	5,16 ± 0,37 ^b	4,06 ± 0,32 ^{a,b}	4,81 ± 0,26 ^{a,b}	3,38	0,021
Выживаемость (%)	100	100	100	100	-	-

*Значения представлены как среднее ± SEM по трем повторностям (n = 3). Значения с разными индексами в пределах одной строки статистически значимо различаются (p<0,05).

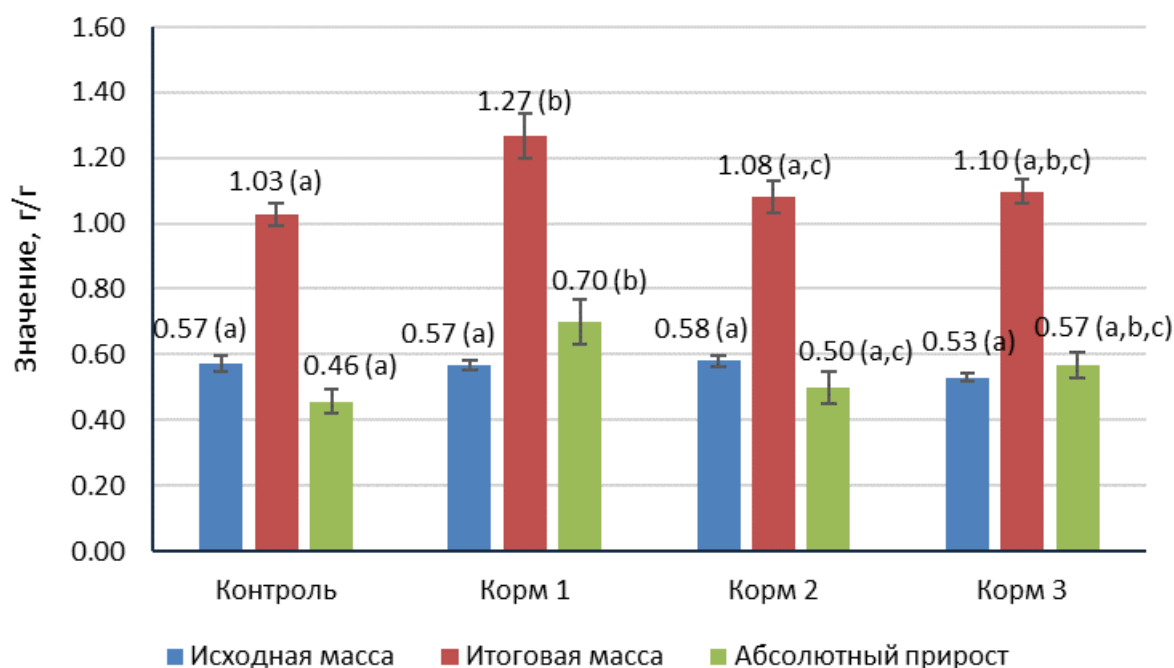


Рисунок 17 – Параметры роста: исходная масса, итоговая масса и абсолютный прирост. Значения представлены как среднее по трем повторностям (n=3). Значения с разными индексами в пределах одной диаграммы статистически значимо различаются (p<0,05). Пределы погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM).

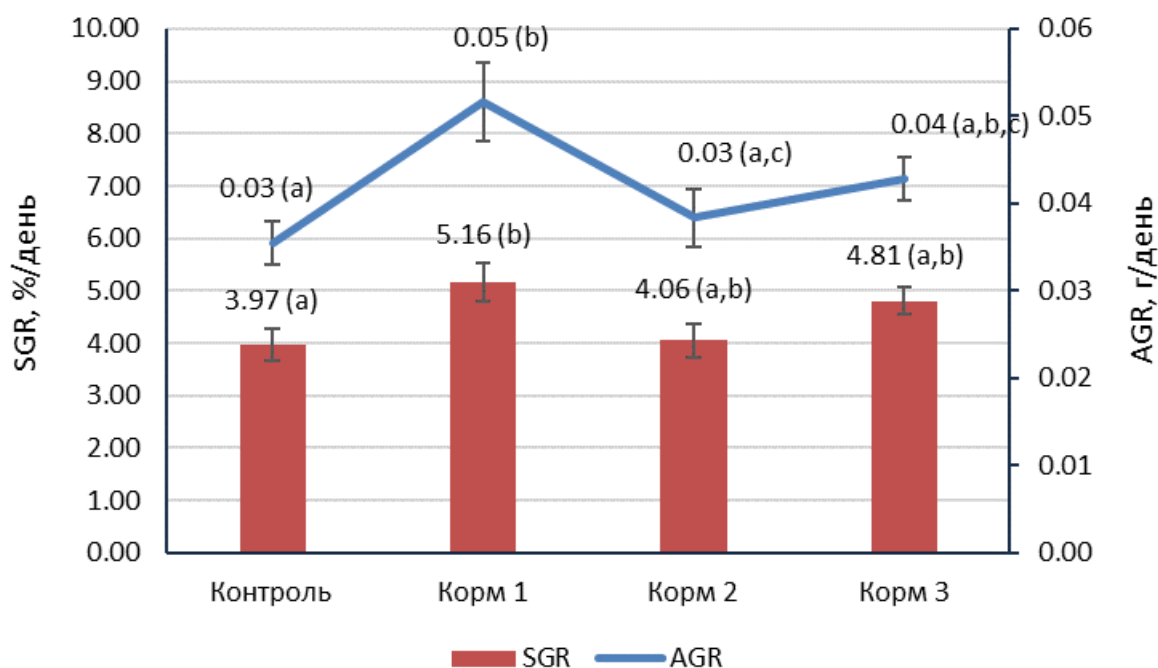


Рисунок 18 – Параметры роста: абсолютная скорость роста (AGR) и удельная скорость роста (SGR). Значения представлены как среднее по трем повторностям (n=3). Значения с разными индексами в пределах одной диаграммы статистически значимо различаются ($p < 0,05$). Пределы погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM).

3.3.3 Показатели эффективности кормления

Конверсии корма, а также эффективность использования белка и энергии являются одними из важнейших показателей эффективности кормов. Лучший показатель конверсии был достигнут для Корма 1 (1,07), в то время как Корм 2 (1,43) и Корм 3 (1,13) не показали статистически значимых различий по сравнению с контрольным кормом (1,56). Значение прироста на грамм кормового белка было значительно выше для Корма 1 (2,84) по сравнению с Кормом 2 (1,94) и контрольным кормом (1,77), в то время как Корм 3 (2,23) не показал статистически значимых различий по данному параметру по сравнению с любой другой группой. Показатель эффективности использования протеина при добавлении микроводорослей существенно повысился в случае Корма 1 (26 %) и Корма 3 (20 %), в то время как Корм 2 (18 %) не показал статистически значимых различий с

контролем (14 %). Значения эффективности использования энергии составили 16 %, 12 %, 13 % (Корма 1-3) и 11 % (контрольный корм), причем только Корм 1 показал статистически значимое отличие от контроля. Обобщенные данные эффективности кормления представлены ниже (Таблица 20, Рисунок 19, 20).

Таблица 20 – показатели эффективности кормления мальков тилапии.

Параметр	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-критерий	P-значение
FCR	1,56 ± 0,17 ^a	1,07 ± 0,11 ^b	1,43 ± 0,13 ^{a,b}	1,13 ± 0,09 ^{a,b}	3,27	0,024
PER	1,77 ± 0,14 ^a	2,84 ± 0,27 ^b	1,94 ± 0,18 ^{a,c}	2,23 ± 0,14 ^{a,b,c}	5,77	0,001
PPV (%)	14 ± 1 ^a	26 ± 2 ^b	18 ± 1 ^{a,c}	20 ± 1 ^c	13,36	<0,001
EPV (%)	11 ± 1 ^a	16 ± 1 ^b	12 ± 1 ^{a,c}	13 ± 1 ^{a,b,c}	4,62	0,004

Значения представлены как среднее ± SEM по трем повторностям (n = 3). Значения с разными индексами в пределах одной строки статистически значимо различаются (p<0,05).

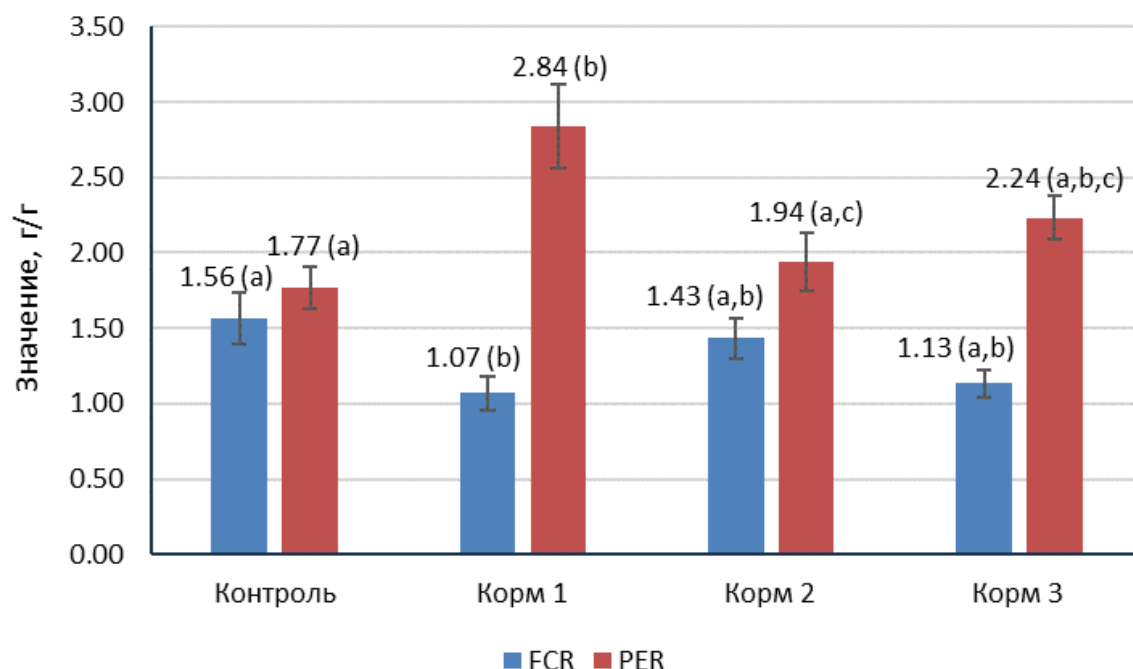


Рисунок 19 – Показатели эффективности кормления: конверсия корма (FCR) и прирост на грамм кормового белка (PER). Значения представлены как среднее по трем повторностям (n=3). Значения с разными индексами в пределах одной

диаграммы статистически значимо различаются ($p < 0,05$). Пределы погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM).

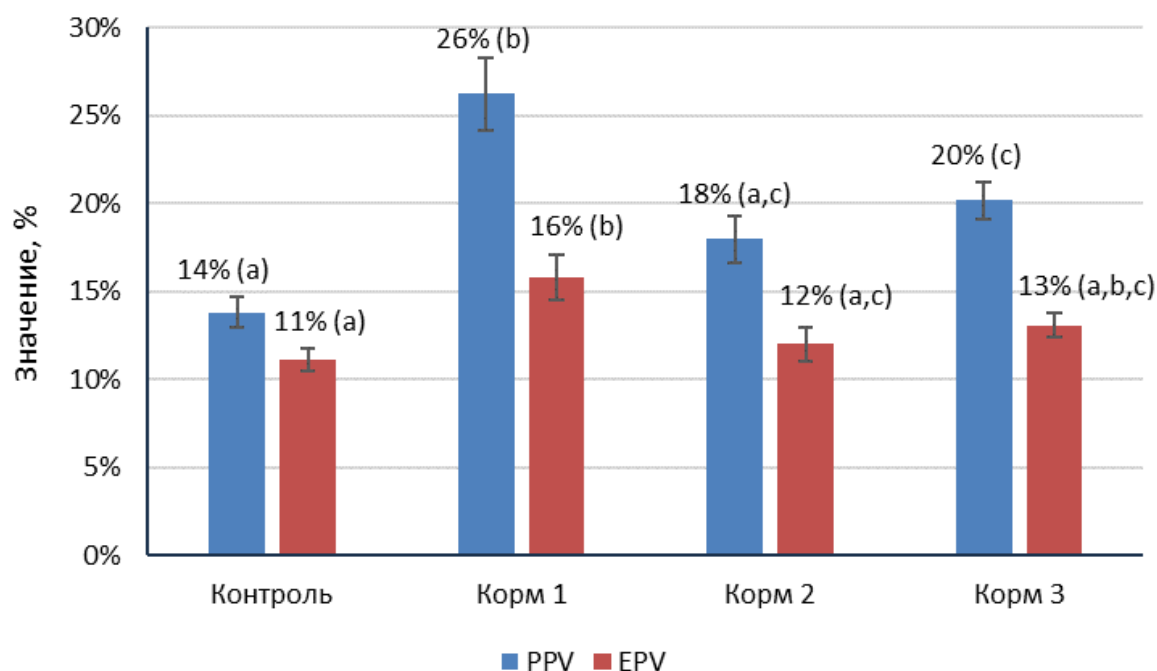


Рисунок 20 – Показатели эффективности кормления: эффективность использования белка (PPV) и эффективность использования энергии (EPV). Значения представлены как среднее по трем повторностям ($n=3$). Значения с разными индексами в пределах одной диаграммы статистически значимо различаются ($p < 0,05$). Пределы погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего (SEM).

3.3.4 Химический состав мяса мальков тилапии

Обобщенные результаты влияния экспериментальных кормов на химический состав мяса рыб приведены ниже (Таблица 21). Содержание белка, жира, золы и энергии увеличилось в мясе всех рыб по сравнению с исходным, что свидетельствует о хорошей усвояемости исследованных кормов. В то же время добавление микроводорослей в Корма 1-3 не показало статистически значимого эффекта на химический состав мяса рыб в конце эксперимента.

Таблица 21 – Влияние исследованных кормов на химический состав мяса мальков тилапии.

Параметр	Исходное значение	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-критерий	P-значение
Белок (% сухой массы)	63,1 ± 0,21	66,5 ± 0,25	68,6 ± 0,27	66,3 ± 0,21	67,2 ± 0,35	2,925	0,132
Жиры (% сухой массы)	7,9 ± 0,15	11,6 ± 0,60	11,8 ± 0,46	11,0 ± 0,72	10,9 ± 0,55	1,875	0,253
Углеводы (% сухой массы)	16,6 ± 0,02	7,2 ± 0,05	4,6 ± 0,12	7,9 ± 0,08	7,5 ± 0,07	3,834	0,08
Зола (% сухой массы)	12,4 ± 0,32	14,7 ± 0,25	15 ± 0,15	14,8 ± 0,19	14,4 ± 0,38	1,283	0,396
Энергия (кДж/г мокрой массы)	1,89 ± 0,10	2,11 ± 0,22	2,38 ± 0,03	2,33 ± 0,14	2,34 ± 0,18	2,012	0,231

Значения представлены как среднее ± SEM по трем повторностям (n = 3).

3.3.5 Обсуждение

Микроводоросли являются незаменимым источником питания для молодняка рыб, моллюсков и ракообразных в естественной среде обитания. Кроме того, некоторые штаммы микроводорослей содержат значительные количества биологически активных веществ (например полиненасыщенных жирных кислот), которые необходимы для быстрого и полноценного развития молоди рыб. Практика искусственного разведения рыб показала, что высокая жизнеспособность выращиваемой молоди зависит от обеспеченности ее качественными функциональными кормами, особенно на ранних этапах постэмбрионального развития в период перехода на активное питание. В связи с этим включение биомассы микроводорослей в стартовые корма для аквакультуры является перспективной биотехнологической задачей. Одним из основных барьеров для применения биомассы микроводорослей в аквакультуре является высокая стоимость ее производства. Поэтому зачастую микроводоросли используются в аквакультуре в небольших объемах в качестве стартовых кормов для личинок и малька, а также для обогащения живых кормов, таких как коловратки. На сегодняшний день лишь небольшое число штаммов микроводорослей исследовалось в качестве добавок в

аквакультурные корма, по большей части это цианобактерии рода *Arthrospira* (Lu, J. et al. 2002), (Takeuchi, T. et al. 2002), (Lu, J. et al. 2004), (Abdel-Tawwab, M. et al. 2009), (Sarker, P. K. et al. 2016b), а также эукариотические штаммы родов *Chlorella* и *Schizochytrium* (Tadesse, Z. et al. 2003), (Sarker, P. K. et al. 2016a).

В настоящей работе было использовано 2 штамма микроводорослей, которые были впервые описаны в настоящей работе и ранее не исследовались в качестве кормовых ингредиентов: *Mallomonas furtiva* SBV-13 (Chrysophyceae) и *Vischeria magna* SBV-108 (Eustigmatophyceae). Биомасса данных микроводорослей выращивалась в полупромышленном панельном фотобиореакторе, и ее лиофилизат был использован для приготовления стартерных кормов для мальков тилапии. Таким образом, было исследовано влияние обогащения стартерных кормов биомассой микроводорослей с высоким содержанием ЭПК и фукоксантина на ростовые характеристики рыб и эффективность кормления.

Состав всех исследованных кормов был благоприятным для мальков тилапии, так как все рыбы увеличили свою массу в конце эксперимента и их выживаемость сохранилась на уровне 100 %. Кроме того, обогащенные микроводорослями корма показали сопоставимые или лучшие результаты по сравнению с контрольным коммерческим кормом Supreme-15 (Coppens), а также обладали повышенными аттрактивными свойствами для мальков. Наибольшую эффективность продемонстрировал Корм 1, содержащий 10 % богатой ЭПК биомассы *V. magna* SBV-108 – итоговая масса и удельная скорость роста рыб, получавших данный корм, превышали показатели контрольной группы на 25 %, в то время как Корма 2 и 3, содержащие биомассу *M. furtiva* SBV-13, не показали статистически значимых отличий от контрольного корма по данным параметрам (Таблица 19). Добавление в корм 10 % биомассы *V. magna* SBV-108 (Корм 1) также привело к увеличению усвояемости корма и показало наилучшие результаты конверсии корма, прироста на 1 г кормового белка, а также эффективности использования белка и энергии по сравнению с остальными исследованными кормами (Таблица 20).

В литературе встречаются исследования, посвященные изучению влияния микроводорослей на ростовые характеристики различных аквакультурно значимых

видов рыб, таких как мозамбикская тиляпия (*Oreochromis mossambicus*), нильская тиляпия (*Oreochromis niloticus*), радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*), атлантический лосось (*Salmo salar*) и африканский сом (*Clarias gariepinus*) (Sommer, T. R. et al. 1992), (Lu, J. et al. 2002), (Tadesse, Z. et al. 2003), (Abdel-Tawwab, M. et al. 2009), (Sarker, P. K. et al. 2016a), (Sprague, M. et al. 2016), (Raji, I. D. et al. 2020). В большинстве случаев авторы фиксируют положительный эффект от добавления микроводорослей: так, описано ускорение роста (Ju, Z. Y. et al. 2008), (Ju, Z. Y. et al. 2009), (Ju, Z. Y. et al. 2012), (An, B. N. T. et al. 2020), (Annamalai, S. N. et al. 2021), (Ansari, F. A. et al. 2021), повышение выживаемости аквакультурных видов (Nagappan, S. et al. 2021), стимулирование иммунитета гидробионтов (Hayashi, O. et al. 1994), (Bahi, A. et al. 2023) и противовирусные свойства биомассы микроводорослей (Hayashi, T. et al. 1996), (Ma, K. et al. 2020). Повышение скорости роста рыб при включении в их рацион микроводорослей ассоциируется с улучшением физиологического состояния гидробионтов, регуляцией белкового и липидного обмена, стимулированием функций печени и снижением стресса (Mustafa, M. G. et al. 1995), (Ansari, F. A. et al. 2021).

Многочисленные исследования показывают важность антиоксидантов для здоровья гидробионтов. Антиоксиданты способны предохранять липиды от окисления свободными радикалами (Suárez-Jiménez, G. M. et al. 2016), снижать оксидативный стресс и усталость мышечных клеток (Powers, S. K. et al. 2004) и модулировать иммунитет рыб (Blount, J. D. et al. 2003). Фукоксантин – это сильный природный антиоксидант, часто встречающийся в микроводорослях (класса Bacillariophyceae и др), которые являются естественным кормом для личинок и молоди многих гидробионтов. Недавние публикации (Gammone, M. A. et al. 2015), (Miyashita, K. et al. 2017) описывают влияние фукоксантина на метаболизм липидов, пищевой термогенез и регуляцию уровня глюкозы в крови. Однако влияние фукоксантина на рост и эффективность кормления рыбы в настоящий момент изучено слабо.

Известно, что организм рыб не способен самостоятельно синтезировать незаменимые омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, поэтому их

обеспеченность данными веществами напрямую зависит от качества потребляемой пищи и условий внешней среды (Ju, Z. Y. et al. 2017), (Serrano, E. et al. 2021). Предыдущие исследователи предпринимали попытки увеличения содержания омега-3 ПНЖК в мясе тилапии. Группа (Shapira, N. et al. 2009) обнаружила, что добавление 7 % льняного масла в рацион аквакультурной тилапии привело лишь к незначительному повышению уровня омега-3 докозагексаеновой кислоты (ДГК) в мясе. В работах (Tocher, D. R. et al. 2001) и (Karapanagiotidis, I. T. et al. 2007) было показано, что добавление в корма для тилапии рыбьего жира и растительных масел приводит к увеличению содержания длинноцепочечных омега-3 жирных кислот в мясе. Высокое содержание ЭПК и ДГК особенно важно для стартовых аквакультурных кормов, так как потребность личинок и мальков рыб в этих соединениях практически вдвое превосходит потребность взрослых особей. Вероятно, это связано с активным развитием нервной системы гидробионтов на ранних стадиях роста (Izquierdo, M. et al. 1997). Кроме того, включение омега-3 ПНЖК в рацион рыб является основным методом повышения содержания данных соединений в товарном мясе (Stoneham, T. R. et al. 2018). В работе (Ju, Z. Y. et al. 2017) показано, что включение микроводорослей в рацион тилапии приводит к увеличению доли омега-3 ПНЖК, в особенности ДГК, в мясе. Недавние исследования показали, что обогащенная ДГК биомасса микроводоросли *Schizochytrium sp.* является перспективным кандидатом для полного замещения рыбьего жира в кормах для ювенильных стадий нильской тилапии (Sarker, P. K. et al. 2016a). Однако в настоящий момент не существует коммерческого штамма микроводорослей, богатого ЭПК, который получил бы широкое распространение в качестве корма или кормовой добавки для аквакультуры. *V. magna* SBV-108 является перспективным кандидатом для этой ниши, так как в настоящем исследовании он показал быстрый и стабильный рост в полупромышленном масштабе, высокое содержание ЭПК в биомассе и существенный положительный эффект на ростовые характеристики и эффективность кормления малька.

Заключение

Микроводоросли являются эффективными продуцентами важных биологически активных веществ для пищевой, кормовой, косметической и фармацевтической промышленности, в том числе каротиноидов и полиненасыщенных жирных кислот. В отличие от традиционных источников, в качестве которых выступает биомасса высших растений и животных, микроводоросли обладают несравнимо более высокой скоростью накопления биомассы, не требуют использования пахотных земель и не истощают природные ресурсы, а также могут быть использованы для параллельной утилизации углекислого газа и промышленных стоков. Это делает микроводоросли одними из наиболее перспективных продуцентов для создания устойчивого производства данных соединений в рамках концепции биоэкономики. Биомасса микроводорослей также является одним из наиболее перспективных кандидатов для замещения рыбной муки и рыбьего жира, а также повышения производительности аквакультурных кормов, благодаря сбалансированному аминокислотному профилю, малому числу антипитательных факторов и возможности накопления значительных количеств омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и других соединений, оказывающих благоприятный эффект на рост и развитие гидробионтов.

Одним из основных барьеров широкого внедрения производства на основе микроводорослей является экономическая эффективность, повышение которой требует поиска новых высокопродуктивных штаммов. При этом большинство исследований исторически сосредоточено на морских видах, в то время как потенциал множества пресноводных штаммов остается нераскрытым.

Основная цель настоящей работы состояла в поиске и исследовании новых высокопроизводительных пресноводных штаммов микроводорослей с потенциалом промышленного применения в качестве продуцентов каротиноида фукоксантина и незаменимой омега-3 эйкозапентаеновой кислоты, а также ингредиентов для аквакультурных кормов. В настоящей работе были впервые охарактеризованы и исследованы два штамма: *Mallomonas furtiva* SBV-13 (Chrysophyceae) и *Vischeria*

magna SBV-108 (Eustigmatophyceae). Было показано, что штамм *M. furtiva* SBV-13 способен накапливать значительные количества каротиноида фукоксантина (25,9 мг/г сухой массы), являющегося высокомаржинальным продуктом, используемым в косметической и фармацевтической промышленности.

При культивировании в панельном фотобиореакторе в объеме 120 л *M. furtiva* SBV-13 показал высокую объемную продуктивность по фукоксантину (6,1 мг/л/день), что свидетельствует о возможности масштабирования его культивирования и потенциале промышленного применения в качестве продуцента данного соединения. Добавление биомассы данного штамма в стартерный корм для тилапии не привело к статистически значимому улучшению эффективности кормления малька в рамках двухнедельного эксперимента. Потенциально *M. furtiva* SBV-13 может иметь отсроченный благоприятный эффект за счет стимулирования обмена веществ и иммунитета рыб, однако для подтверждения данной гипотезы необходимы дополнительные эксперименты.

Биотехнологическое исследование штамма *Vischeria magna* SBV-108 показало высокое содержание в его биомассе омега-3 эйкозапентаеновой кислоты (46,1 мг/г сухой массы), которая является незаменимым питательным веществом для людей и большинства высших животных, благодаря чему используется в пищевой, кормовой и фармацевтической промышленности. Штамм показал высокую объемную производительность по эйкозапентаеновой кислоте (17,4 мг/л/день) при культивировании в панельном фотобиореакторе в объеме 120 л, что делает его перспективным микробным продуцентом данного соединения. Кроме того, настоящее исследование показало, что биомасса *V. magna* SBV-108 может быть успешно использована для повышения эффективности стартовых кормов для аквакультуры. Добавление в корм 10 % биомассы *V. magna* SBV-108 привело к увеличению практически всех ключевых характеристик корма более чем на 20 %, что делает данный штамм перспективным для использования в аквакультуре.

Выводы

1. Охарактеризован оригинальный штамм микроводоросли *Mallomonas furtiva* SBV-13, способный накапливать 25,9 мг/г фукоксантина в сухой массе. По данному параметру штамм *M. furtiva* SBV-13 является лидером среди описанных в литературе природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании.

2. Штамм *M. furtiva* SBV-13 был успешно культивирован в полупромышленном панельном фотобиореакторе в объеме 120 л, где объемная продуктивность по фукоксантину достигала 6,1 мг/л/день. По данному параметру штамм *M. furtiva* SBV-13 является лидером среди описанных в литературе природных пресноводных и почвенных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании в сопоставимых объемах.

3. Охарактеризован оригинальный штамм микроводоросли *Vischeria magna* SBV-108, способный накапливать 46,1 мг/г эйкозапентаеновой кислоты в сухой массе. По данному параметру штамм *V. magna* SBV-108 является лидером среди описанных в литературе природных пресноводных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании.

4. Штамм *V. magna* SBV-108 был успешно культивирован в полупромышленном панельном фотобиореакторе в объеме 120 л, где объемная продуктивность по эйкозапентаеновой кислоте достигала 17,4 мг/л/день. По данному параметру штамм *V. magna* SBV-108 является лидером среди описанных в литературе природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании в сопоставимых объемах.

5. Добавление в стартовый корм для мальков красной тиляпии (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) 10 % сухой биомассы *V. magna* SBV-108 привело к улучшению всех значимых характеристик выращивания более чем на 20 % (абсолютный прирост, абсолютная скорость роста, удельная скорость роста, конверсия корма, прирост на грамм кормового белка, коэффициент

использования протеина и энергии). Это делает данный штамм перспективным для применения в качестве кормового ингредиента для аквакультуры.

Список использованных сокращений

АЦН – ацетонитрил

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДГК – докозагексаеновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПО – программное обеспечение

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

рДНК – рибосомальная ДНК

УФ-ВИД – ультрафиолетового и видимого спектров

ЭПК – эйкозапентаеновая кислота

AGR – (absolute growth rate) абсолютная скорость роста

EPV – (energy productive value) эффективность использования белка

F-критерий – статистический критерий для оценки значимости различия дисперсий двух случайных выборок

FCR – (feed conversion rate) конверсия корма

ITS – (internal transcribed spacer) внутренний транскрибируемый спейсер

ISO – (International Organization for Standardization) международная организация по стандартизации

ML – (maximum likelihood) максимального правдоподобия

P-значение – расчетная вероятность ошибки первого рода

PER – (protein efficiency ratio) прирост на грамм кормового белка

pH – водородный показатель

PPV – (protein productive value) эффективность использования белка

rbcL – (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) ген большой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы

SEM – (standard error of mean) стандартная ошибка среднего

SGR – (specific growth rate) удельная скорость роста

SSU rDNA – (small subunit ribosomal DNA) рДНК малой субъединицы

Список использованной литературы

1. Каталог микроорганизмов: Национальный биоресурсный центр. Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт». [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov>
2. Abidov, M., Ramazanov, Z., Seifulla, R., Grachev, S. The effects of XanthigenTM in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat // *Diabetes, obesity and metabolism*. – 2010. – Vol. 12(1). – P. 72–81.
3. Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M. H. Live *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila* // *Aquaculture Research*. – 2009. – Vol. 40. – P. 1037–1046.
4. Abou-Shanab, R. A., Hwang, J. H., Cho, Y., Min, B., Jeon, B. H. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production // *Applied energy*. – 2011. – Vol. 88(10). – P. 3300–3306.
5. Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V., Iluz, D. Unconventional high-value products from microalgae: A review // *Bioresource Technology*. – 2021. – Vol. 329. – P. 124895.
6. Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L., Bugbee, B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae // *Bioresource Technology*. – 2013. – Vol. 131. – P. 188–194.
7. Agboola, J. O., Teuling, E., Wierenga, P. A., Gruppen, H., Schrama, J. W. Cell wall disruption: an effective strategy to improve the nutritive quality of microalgae in African catfish (*Clarias gariepinus*) // *Aquaculture nutrition*. – 2019. – Vol. 25(4). – P. 783–797.
8. Ahmed, S.A., Mendonca, P., Elhag, R. and Soliman, K.F. Anticancer effects of fucoxanthin through cell cycle arrest, apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and

autophagy modulation // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23(24). – P. 16091.

9. Aladetohun, N. F., Sogbesan, O. A. Utilization of blood meal as a protein ingredient from animal waste product in the diet of *Oreochromis niloticus* // International journal of fisheries and aquaculture. – 2013. – Vol. 5(9). – P. 234–237.

10. Allen, M. B., Goodwin, T. W., Phagpolngarm, S. Carotenoid distribution in certain naturally occurring algae and in some artificially induced mutants of *Chlorella pyrenoidosa* // The Journal of General Microbiology. – 1960. – Vol. 23. – P. 93–103.

11. Alonso, D. L., Segura del Castillo, C. I., Grima, E. M., Cohen, Z. First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) by induced mutagenesis // Journal of Phycology. – 1996. – Vol. 32. – P. 339–345.

12. An, B. N. T., Anh, N. T. N. Co-culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red seaweed (*Gracilaria tenuistipitata*) under different feeding rates: effects on water quality, fish growth and feed efficiency // Journal of Applied Phycology. – 2020. – Vol. 32. – P. 2031–2040.

13. Annamalai, S. N., Das, P., Thaher, M. I. A., Abdul Quadir, M., Khan, S., Mahata, C., Al Jabri, H. Nutrients and Energy Digestibility of Microalgal Biomass for Fish Feed Applications // Sustainability. – 2021. – Vol. 13. – P. 13211.

14. Andrade, D., Colozzi-Filho, A., Guedes, C., Lima, F., Machineski, G., Matos, M. Principais produtos da biomassa algal e suas aplicações biotecnológicas // Microalgas de Águas Continentais: Potencialidades e Desafios do Cultivo. – 2014. – P. 265–343.

15. Ansari, F. A., Guldhe, A., Gupta, S. K., Rawat, I., Bux, F. Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae // Environmental Science and Pollution Research International. – 2021. – Vol. 28(32). – P. 43234–43257.

16. Arao, T., Sakaki, T., Yamada, M. Biosynthesis of polyunsaturated lipids in the diatom, *Phaeodactylum tricornutum* // Phytochemistry. – 1994. – Vol. 36(3). – P. 629–635.

17. Araujo, G. S., Matos, L. J., Gonçalves, L. R., Fernandes, F. A., Farias, W. R. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: evaluation of oil and biomass

production for ten microalgal strains // Bioresource technology. – 2011. - Vol. 102(8). – P. 5248–5250.

18. Arun, J., Gopinath, K. P., Sundar Rajan, P., Felix, V., Joselyn Monica, M., Malolan, R. A conceptual review on microalgae biorefinery through thermochemical and biological pathways: bio-circular approach on carbon capture and wastewater treatment // Bioresource technology reports. – 2020. – Vol. 11. – P. 100477.

19. Asai, A., Yonekura, L., Nagao, A. Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans // British journal of nutrition. – 2008. – Vol. 100(2). – P. 273-277.

20. Bahi, A., Ramos-Vega, A., Angulo, C., Monreal-Escalante, E., Guardiola, F. A. Microalgae with immunomodulatory effects on fish // Reviews in Aquaculture. – 2023. – Vol. 15(4). – P. 1522–1539.

21. Bajpai, R., Prokop, A., Zappi, M., et al. Algal biorefineries: Volume 1: Cultivation of cells and products // Springer Science & Business Media. – 2013. – Vol. 1. – p. 337.

22. Batista, S., Pintado, M., Marques, A., Abreu, H., Silva, J. L., Jessen, F., Tulli, F., Valente, L. M. Use of technological processing of seaweed and microalgae as strategy to improve their apparent digestibility coefficients in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles // Journal of Applied Phycology. – 2020. – Vol. 32. – P. 3429–3446.

23. Becker, E. W. Micro-algae as a source of protein // Biotechnology Advances. – 2007. – Vol. 25(2). – P. 207–210.

24. Benavides, A. M. S., Torzillo, G., Kopecký, J., Masojídek, J. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds // Biomass Bioenergy. – 2013. – Vol. 54. – P. 115–122.

25. Beydoun, M. A., Chen, X., Jha, K., Beydoun, H. A., Zonderman, A. B., Canas, J. A. Carotenoids, vitamin A, and their association with the metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis // Nutrition reviews. – 2019. – Vol. 77(1). – P. 32–45.

26. Blanco, A. M., Moreno, J., Del Campo, J. A., Rivas, J., Guerrero, M. G. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2007. – Vol. 73. – P. 1259–1266.
27. Bligh, E. G., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Canadian journal of biochemistry and physiology*. – 1959. – Vol. 37(8). – 911–917.
28. Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R., Surai, P. F. Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches // *Science*. – 2003. – Vol. 300. – P. 125–127.
29. Blomqvist, J., Pickova, J., Tilami, S.K., Sampels, S., Mikkelsen, N., Brandenburg, J., Sandgren, M., Passoth, V. Oleaginous yeast as a component in fish feed // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8(1). – P. 15945.
30. Bosch, G., Zhang, S., Oonincx, D. G., Hendriks, W. H. Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods // *Journal of nutritional science*. – 2014. – Vol. 3. – P. e29.
31. Borowiak, D., Krzywonos, M. Bioenergy, biofuels, lipids and pigments – Research trends in the use of microalgae grown in photobioreactors // *Energies*. – 2022. – Vol. 15(15). – P. 5357.
32. Brennan, L., Owende, P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // *Renewable and sustainable energy reviews*. – 2010. – Vol. 14(2). – P. 557–577.
33. Cahu, C., Infante, J. Z. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae // *Aquaculture*. – 2001. – Vol. 200(1-2). – P. 161-180.
34. Cahu, C., Infante, J. Z., Takeuchi, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae // *Aquaculture*. – 2003. – Vol. 227(1-4). – P. 245–258.
35. Camacho-Rodríguez, J., González-Céspedes, A. M., Cerón-García, M. C., Fernández-Sevilla, J. M., Acién-Fernández, F. G., Molina-Grima, E. A quantitative study of eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture as a function of dilution rate, temperature and average irradiance // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 98. – P. 2429–2440.

36. Carneiro, W. F., Castro, T. F. D., Orlando, T. M., Meurer, F., de Jesus Paula, D. A., Virote, B. D. C. R., Vianna, A. R. D. C. B., Murgas, L. D. S. Replacing fish meal by *Chlorella* sp. meal: effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters and digestive enzymes // *Aquaculture*. – 2020. – Vol. 528. – P. 735612.
37. Carter, C. G., Hauler, R. C. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. // *Aquaculture*. – 2000. – Vol. 185(3-4). – P. 299–311.
38. Chang, G., Luo, Z., Gu, S., Wu, Q., Chang, M. and Wang, X. Fatty acid shifts and metabolic activity changes of *Schizochytrium* sp. S31 cultured on glycerol // *Bioresource technology*. – 2013. – Vol. 142. – P. 255–260.
39. Chauton, M. S., Reitan, K. I., Norsker, N. H., Tveterås, R., Kleivdal, H. T. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities // *Aquaculture*. – 2015. – Vol. 436. – P. 95–103.
40. Chen, C.-Y., et al. Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga *Nannochloropsis oceanica* CY2 // *Bioresource technology*. – 2013. – Vol. 147. – P. 160-167.
41. Cheng-Wu, Z., Zmora, O., Kopel, R., Richmond, A. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) // *Aquaculture*. – 2001. – Vol. 195. – P. 35–49.
42. Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Claxton, R., Das, K.C. Biomass and bioenergy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium // *Bioresource technology*. – 2010. – Vol. 101(17). – P. 6751–6760.
43. Cho, S. C., Choi, W. Y., Oh, S. H., Lee, C. G., Seo, Y. C., Kim, J. S., Song, C. H., Kim, G. V., Lee, S. Y., Kang, D. H., Lee, H. Y. Enhancement of lipid extraction from marine microalga, *Scenedesmus* associated with high-pressure homogenization process // *BioMed Research International*. – 2012. – Vol. 2012(1). – P. 359432.

44. Choi, W. Y., Lee, H. Y. Effective production of bioenergy from marine *Chlorella* sp. by high-pressure homogenization // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2016. – Vol. 30(1). – P. 81–89.
45. Chuyen, H. V., Eun, J. B. Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2017. – Vol. 57(12). – P. 2600–2610.
46. Cohen, Z. et al. Overproduction of γ -linolenic and eicosapentaenoic acids by algae // *Plant physiology*. – 1992. – Vol. 98. – No. 2. – P. 569–572
47. Conceição, L. E. C., Grasdalen, H., Rønnestad, I. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings // *Aquaculture*. – 2003. – Vol. 227(1-4). – P. 221–232.
48. Conceição, L. E., Aragão, C., Richard, N., Engrola, S., Gavaia, P., Mira, S., Dias, J. Novel methodologies in marine fish larval nutrition // *Fish physiology and biochemistry*. – 2010. – Vol. 36. – P. 1–16.
49. Cordeiro, C. M. A corpus-based approach to understanding market access in fisheries and aquaculture international business research: A systematic literature review // *Aquaculture and Fisheries*. – 2019. – 4(6). – P. 219–230.
50. Costa, J. A. V., de Moraes, M. G. An open pond system for microalgal cultivation. In *Biofuels from algae* // Elsevier. – 2014. – P. 1–22.
51. Cottrell, R. S., Blanchard, J. L., Halpern, B. S., Metian, M., Froehlich, H. E. Global adoption of novel aquaculture feeds could substantially reduce forage fish demand by 2030 // *Nature Food*. – 2020. – Vol. 1(5). – P. 301–308.
52. Crowe, B., Attalah, S., Agrawal, S., Waller, P., Ryan, R., Van Wagenen, J., Chavis, A., Kyndt, J., Kacira, M., Ogden, K. L., et al. A comparison of *Nannochloropsis salina* growth performance in two outdoor pond designs: Conventional raceways versus the ARID pond with superior temperature management // *International Journal of Chemical Engineering*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 920608.
53. Crupi, P., Toci, A. T., Mangini, S., Wrubl, F., Rodolfi, L., Tredici, M. R., Coletta, A., Antonacci, D. Determination of fucoxanthin isomers in microalgae (*Isochrysis* sp.) by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector

multistage mass spectrometry coupled with positive electrospray ionization // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2013. – Vol. 27(9). – P. 1027–1035.

54. Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., Parra-Saldivar, R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins // *Microbial biotechnology*. – 2015. – Vol. 8(2). – P. 190–209.

55. D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2016. – Vol. 58. – P. 832–841.

56. Da Costa, F., Le Grand, F., Quéré, C., Bougaran, G., Cadoret, J. P., Robert, R., Soudant, P. Effects of growth phase and nitrogen limitation on biochemical composition of two strains of *Tisochrysis lutea* // *Algal research*. – 2017. – Vol. 27. – P. 177–189.

57. da Silva Ferreira, V., Sant'Anna, C. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 33(1). – P. 20.

58. Dasgupta, C. N., Gilbert, J. J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S. A., Skjanes, K., Das, D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2010. – Vol. 35(19). – P. 10218–10238.

59. Daugbjerg, N., Andersen, R. A. Phylogenetic analysis of the *rbcL* sequences from haptophytes and heterokont algae suggest their chloroplasts are unrelated // *Molecular Biology and Evolution*. – 1997. – Vol. 14. – P. 1242–1251.

60. Davis, A. K., Anderson, R. S., Spierling, R., Leader, S., Lesne, C., Mahan, K., Lundquist, T., Benemann, J. R., Lane, T., Polle, J. E. Characterization of a novel strain of *Tribonema minus* demonstrating high biomass productivity in outdoor raceway ponds // *Bioresource Technology*. – 2021. – Vol. 331. – P. 125007.

61. De Swaaf, M. E., Sijtsma, L., Pronk, J. T. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptothecodinium cohnii* // *Biotechnology and bioengineering*. – 2003. – Vol. 81(6). – P. 666–672.

62. Delgado, E., Valles-Rosales, D. J., Flores, N. C., Reyes-Jáquez, D. Evaluation of fish oil content and cottonseed meal with ultralow gossypol content on the functional properties of an extruded shrimp feed // *Aquaculture Reports*. – 2021. – Vol. 19. – P. 100588.
63. Denstadli, V., Skrede, A., Krogdahl, Å., Sahlstrøm, S., Storebakken, T. Feed intake, growth, feed conversion, digestibility, enzyme activities and intestinal structure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed graded levels of phytic acid // *Aquaculture*. – 2006. – Vol. 256(1-4). – P. 365–376.
64. Doucha, J., Lívanský, K. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2008. – Vol. 81. – P. 431–440.
65. Draganovic, V., Van der Goot, A. J., Boom, R., Jonkers, J. Wheat gluten in extruded fish feed: effects on morphology and on physical and functional properties // *Aquaculture Nutrition*. – 2013. – Vol. 19(6). – P. 845–859.
66. Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae // *Applied energy*. – 2011. – Vol. 88(10). – P. 3331–3335.
67. Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. Third generation biofuels from microalgae // *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. – 2010. – Vol. 2. – P. 1355–1366.
68. Du, S. Y., Zhang, Y. L., Bai, R. X., Ai, Z. L., Xie, B. S., Yang, H. Y. Lutein prevents alcohol-induced liver disease in rats by modulating oxidative stress and inflammation // *International journal of clinical and experimental medicine*. – 2015. – Vol. 8(6). – P. 8785.
69. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analytical chemistry*. – 1956. – Vol. 28(3). P. 350–356.
70. Durmaz, Y., Erbil, G. Ç. Performance of industrial-scale tubular photobioreactor in marine hatchery // *Journal of Applied Phycology*. – 2017. – Vol. 29. – P. 2755–2760.

71. Eilers, U., Bikoulis, A., Breitenbach, J. et al. Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum* // Journal of Applied Phycology. – 2016. – Vol. 28. – P. 123–129.
72. Ejike, C. E., Collins, S. A., Balasuriya, N., Swanson, A. K., Mason, B., Udenigwe, C.C. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health // Trends in Food Science & Technology. – 2017. – Vol. 59. – P. 30–36.
73. El-Dahhar, A. A. Review article on protein and energy requirements of tilapia and mullet // Journal of the Arabian Aquaculture Society. – 2007. – Vol. 2(1). – P. 28.
74. El-Sayed, A. F. M. Evaluation of soybean meal, spirulina meal and chicken offal meal as protein sources for silver seabream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings // Aquaculture. – 1994. – Vol. 127(2-3). – P. 169–176.
75. Ettl, H. Xanthophyceae. 1 Teil // Süßwasserflora von Mitteleuropa. Bd 3. Stuttgart. – 1978. – P. 530.
76. Fan, K. W., Jiang, Y., Faan, Y. W., Chen, F. Lipid characterization of mangrove thraustochytrid – *Schizochytrium mangrovei* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. – Vol. 55(8). – P. 2906-2910.
77. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 // FAO Blue Transformation in action. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd0683en>
78. Fernández-Sevilla, J. M., Acién Fernández, F. G., Molina Grima, E. Biotechnological production of lutein and its applications // Applied microbiology and biotechnology. – 2010. – Vol. 86. – P. 27–40.
79. Foo, S. C., Yusoff, F., Ismail, M., Basri, M., Chan, K. W., Khong, N., Yau, S. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968 // Algal Research. – 2015. – Vol. 12. – P. 26–32.
80. Froehlich, H. E., Jacobsen, N. S., Essington, T. E., Clavelle, T., Halpern, B.S. Avoiding the ecological limits of forage fish for fed aquaculture // Nature Sustainability. – 2018. – Vol. 1(6). – P. 298–303.

81. Fung, A., Hamid, N., Lu, J. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida* // Food chemistry. – 2013. – Vol. 136(2). – P. 1055–1062.
82. Gérin, S., Delhez, T., Corato, A. et al. A novel culture medium for freshwater diatoms promotes efficient photoautotrophic batch production of biomass, fucoxanthin, and eicosapentaenoic acid // Journal of Applied Phycology. – 2020. – Vol. 32. – P. 1581–1596.
83. Gammone, M. A., D’Orazio, N. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin // Marine drugs. – 2015. – Vol. 13(4). – P. 2196–2214.
84. Gao, B., Chen, A., Zhang, W. et al. Co-production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricornutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions // Journal of Ocean University of China. – 2017. – Vol. 16. – P. 916–924.
85. Gao, F., Sá, M., Cabanelas, I. T. D., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J. Improved fucoxanthin and docosahexaenoic acid productivities of a sorted self-settling *Tisochrysis lutea* phenotype at pilot scale // Bioresource Technology. – 2021. – Vol. 325. – P. 124725.
86. García-Vaquero, M., Hayes, M. Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development // Food Reviews International. – 2016. – Vol. 32(1). – P. 15–45.
87. Gilbert-López, B., Barranco, A., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. Development of new green processes for the recovery of bioactives from *Phaeodactylum tricornutum* // Food Research International. – 2017. – Vol. 99. – P. 1056–1065.
88. Gillan, F. T., McFadden, G. I., Wetherbee, R., Johns, R. B. Sterols and fatty acids of an Antarctic sea ice diatom, *Stauroneis amphioxys* // Phytochemistry. – 1981. – Vol. 20(8). – P. 1935–1937.
89. Microalgae-based products market forecast to 2028. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.globenewswire.com/> (дата обращения: 01.07.2024).
90. Gladyshev, M. I., Sushchik, N. N. Long-chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Natural Ecosystems and the Human Diet: Assumptions and Challenges // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9(9). – P. 485.

91. Goda, A. M. A. S., Wafa, M. E., El-Haroun, E. R., Kabir Chowdhury, M. A. Growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) and tilapia *galilae* *Sarotherodon galilaeus* (Linnaeus, 1758) fingerlings fed plant protein-based diets // *Aquaculture research*. – 2007. – Vol. 38(8). – P. 827–837.
92. Gong, Y., Guterres, H. A. D. S., Huntley, M., Sørensen, M., Kiron, V. Digestibility of the defatted microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Desmodesmus* sp. when fed to Atlantic salmon, *Salmo salar* // *Aquaculture nutrition*. – 2018. – Vol. 24(1). – P. 56–64.
93. Grasa-López, A., Miliar-García, Á., Quevedo-Corona, L., Paniagua-Castro, N., Escalona-Cardoso, G., Reyes-Maldonado, E., Jaramillo-Flores, M. E. Undaria pinnatifida and fucoxanthin ameliorate lipogenesis and markers of both inflammation and cardiovascular dysfunction in an animal model of diet-induced obesity // *Marine drugs*. – 2016. – Vol. 14(8). – P. 148.
94. Geada, P., Moreira, C., Silva, M., Nunes, R., Madureira, L., Rocha, C. M., Pereira, R. N., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. Algal proteins: Production strategies and nutritional and functional properties // *Bioresource Technology*. – 2021. – Vol. 332. – P. 125125.
95. Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., De Cooman, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content // *Journal of applied phycology*. – 2012. – Vol. 24. – P. 1477–1486.
96. Grazziotin, A., Pimentel, F. A., De Jong, E. V., Brandelli, A. Poultry feather hydrolysate as a protein source for growing rats // *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. – 2008. – Vol. 45(1). – P. 61–67.
97. Grima, E. M., Pérez, J. S., Camacho, F. G., Sánchez, J. G., Fernández F. A., Alonso, D. L. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 in a closed tubular photobioreactor // *Journal of Biotechnology*. – 1994. – Vol. 37. – P. 159–166.
98. Guihéneuf, F., Stengel, D. B. Interactive effects of light and temperature on pigments and n-3 LC-PUFA-enriched oil accumulation in batch-cultivated *Pavlova lutheri* using high-bicarbonate supply // *Algal research*. – 2017. – Vol. 23. – P. 113–125.

99. Guillard, R. R. L., Lorenzen, C. J. Yellow-Green Algae with Chlorophyllide C1,2 // *Journal of Phycology*. – 1972. – Vol. 8. – P. 10–14.
100. Gupta, P. L., Lee, S. M., Choi, H. J. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 31. – P. 1409–1417.
101. Gusev, E. S., Čertnerová, D., Škaloudová, M., Škaloud, P. Exploring cryptic diversity and distribution patterns in the *Mallomonas kalinae/rasilis* species complex with a description of a new taxon—*Mallomonas furtiva* sp. nov // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. – 2018. – Vol. 65. – P. 38–47.
102. Hamby, R. K., Sims, L., Issel, L., Zimmer, E. Direct ribosomal RNA sequencing: optimization of extraction and sequencing methods for work with higher plants // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 1988. – Vol. 6. – P. 175–192.
103. Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S. Biofuels from algae: challenges and potential // *Biofuels*. – 2010. – Vol. 1(5). – P. 763.
104. Hardy, R. W. New developments in aquatic feed ingredients, and potential of enzyme supplements // *Avances en Nutrición Acuicola*. – 2000. – P. 19–22.
105. Harwood, J. L. Algae: Critical Sources of Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 9(11). – P. 708.
106. Hayashi, O., Katoh, T., Okuwaki, Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis* // *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. – 1994. – Vol. 40. – P. 431–441.
107. Hayashi, T., Hayashi, K., Maeda, M., Kojima, I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis* // *Journal of Natural Products*. – 1996. – Vol. 59. – P. 83–87.
108. He, J.-Y., Tian, L.-X., Lemme, A., Gao, W., Yang, H.-J., Niu, J., Liang, G.-Y., Chen, P.-F., Liu, Y.-J. Methionine and Lysine Requirements for Maintenance and Efficiency of Utilization for Growth of Two Sizes of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) // *Aquaculture Nutrition*. – 2013. – Vol. 19. – P. 629–640.

109. Herrero, M., Ibanez, E. Green processes and sustainability: An overview on the extraction of high added-value products from seaweeds and microalgae // *The Journal of supercritical fluids*. – 2015. – Vol. 96. – P. 211–216.
110. Hodar, A. R., Vasava, R. J., Mahavadiya, D. R., Joshi, N. H. Fish meal and fish oil replacement for aqua feed formulation by using alternative sources: a review // *Journal of Experimental Zoology India*. – 2020. – Vol. 23(1). – P. 13.
111. Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., Odashima, S., Takahashi, K. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60 // *Food Science and Technology Research*. – 1999. – Vol. 5(3). – P. 243–246.
112. Houston, S. J. S., Karalazos, V., Tinsley, J., Betancor, M. B., Martin, S. A. M., Tocher, D. R., Monroig, O. The compositional and metabolic responses of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to a gradient of dietary fish oil and associated n-3 long-chain PUFA content // *British Journal of Nutrition*. – 2017. – Vol. 118(12). – P. 1010–1022.
113. Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., Yang, C. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms // *Engineering*. – 2017. – Vol. 3(3). – P. 318–329.
114. Huang, Y. M., Dou, H. L., Huang, F. F., Xu, X. R., Zou, Z. Y., Lin, X. M. Effect of supplemental lutein and zeaxanthin on serum, macular pigmentation, and visual performance in patients with early age-related macular degeneration // *BioMed research international*. – 2015. – Vol. 2015(1). – P. 564738.
115. Hussain, S. M., Afzal, M., Salim, M., Javid, A., Khichi, T. A. A., Hussain, M., Raza, S. A. Apparent digestibility of fish meal, blood meal and meat meal for *Labeo rohita* fingerlings // *Journal of Animal and Plant Sciences*. – 2011. – Vol. 21(4). – P. 807–811.
116. Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., Castro-Puyana, M. Marine bioactive compounds: sources, characterization and applications. Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates // Madrid: Springer. – 2012. – P. 55–98.

117. Infante, J. Z., Cahu, C. L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2001. – Vol. 130(4). – P. 477–487.
118. Izquierdo, M., Hernández-Palacios, H. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock // *CIHEAM*. – 1997. – P. – 243–264.
119. Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Deprá, M. C., Sartori, R. B., Dias, R. R., Zepka, L. Q. Bioactive food compounds from microalgae: An innovative framework on industrial biorefineries // *Current Opinion in Food Science*. – 2019. – Vol. 25. – P. 1–7.
120. Jakhwal, P., Biswas, J. K., Tiwari, A., Kwon, E. E., Bhatnagar, A. Genetic and non-genetic tailoring of microalgae for the enhanced production of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA)—a review // *Bioresource Technology*. – 2022. – Vol. 344. – P. 126250.
121. James, G. O., Hocart, C. H., Hillier, W., Chen, H., Kordbacheh, F., Price, G. D., Djordjevic, M. A. Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation // *Bioresource technology*. – 2011. – Vol. 102(3). – P. 3343–3351.
122. Jo, B. Y., Kim, J. I., Škaloud, P., Siver, P. A., Shin, W. Multigene phylogeny of *Synura* (Synurophyceae) and descriptions of four new species based on morphological and DNA evidence // *European Journal of Phycology*. – 2016. – Vol. 51. – P. 413–430.
123. Johnson, T. J., Katuwal, S., Anderson, G. A., Gu, L., Zhou, R., Gibbons, W. R. Photobioreactor cultivation strategies for microalgae and cyanobacteria // *Biotechnology Progress*. – 2018. – Vol. 34(4). – P. 811–827.
124. Jones, S. W., Karpol, A., Friedman, S., Maru, B. T., Tracy, B. P. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture // *Current opinion in biotechnology*. – 2020. – Vol. 61. – P. 189–197.
125. Jovanovic, S., Dietrich, D., Becker, J., Kohlstedt, M., Wittmann, C. Microbial production of polyunsaturated fatty acids – high-value ingredients for aquafeed, superfoods, and pharmaceuticals // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2021. – Vol. 69. – P. 199–211.

126. Ju, Z. Y., Davis, S., Ramm, K., Steck, M., Soller, F., Fox, B. K. Effects of microalgae-added diets on growth performance and meat composition of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) // *Aquaculture Research*. – 2017. – Vol. 48. – P. 5053–5061.
127. Ju, Z. Y., Deng, D.-F., Dominy, W. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) // *Aquaculture*. – 2012. – Vol. 354–355. – P. 50–55.
128. Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp feces or feces fractions to a formulated diet // *Aquaculture Nutrition*. – 2008. – Vol. 14. – P. 533–543.
129. Ju, Z. Y., Forster, I. P., Dominy, W. G. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) // *Aquaculture*. – 2009. – Vol. 292. – P. 237–243.
130. Jurić, S., Jurić, M., Król-Kilińska, Ż., Vlahoviček-Kahlina, K., Vinceković, M., Dragović-Uzelac, V., Donsì, F. Sources, stability, encapsulation and application of natural pigments in foods // *Food Reviews International*. – 2022. – Vol. 38(8). – P. 1735–1790.
131. Kanamoto, A., Kato, Y., Yoshida, E., Hasunuma, T., Kondo, A. Development of a Method for Fucoxanthin Production Using the Haptophyte Marine Microalga *Pavlova* sp. OPMS 30543 // *Marine Biotechnology*. – 2021. – Vol. 23(2). – P. 331–341.
132. Katana, A., Kwiatowski, J., Spalik, K., Zakryś, B., Szalacha, E., Szymańska, H. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // *Journal of Phycology*. – 2001. – Vol. 37. – P. 443–451.
133. Katiyar, R., Arora, A. Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review // *Algal Research*. – 2020. – Vol. 46. – P. 101800.
134. Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // *Briefings in bioinformatics*. – 2019. – Vol. 20. – P. 1160–1166.

135. Karapanagiotidis, I. T., Bell, M. V., Little, D. C., Yakupitiyage, A. Replacement of dietary fish oils by alpha-linolenic acid-rich oils lowers omega 3 content in tilapia flesh // *Lipids*. – 2007. – Vol. 42. – P. 547–559.
136. Khaw, Y. S., Yusoff, F. M., Tan, H. T., Noor Mazli, N. A. I., Nazarudin, M. F., Shaharuddin, N. A., Omar, A. R., Takahashi, K. Fucoxanthin Production of Microalgae under Different Culture Factors: A Systematic Review // *Marine Drugs*. – 2022. – Vol. 20(10). – P. 592.
137. Kim, S. M., Kang, S. W., Kwon, O. N. et al. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application // *Journal of the Korean Society for Applied Biological*. – 2012. – Vol. 55. – P. 477–483.
138. Kim, S. M., Jung, Y. J., Kwon, O. N., Cha, K. H., Um, B. H., Chung, D., Pan, C. H. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 166(7). – P. 1843–1855.
139. Kokou, F., Fountoulaki, E. Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients // *Aquaculture*. – 2018. – Vol. 495. – P. 295–310.
140. Kryvenda, A., Rybalka, N., Wolf, M., Friedl, T. Species distinctions among closely related strains of Eustigmatophyceae (Stramenopiles) emphasizing ITS2 sequence-structure data: *Eustigmatos* and *Vischeria* // *European Journal of Phycology*. – 2018. – Vol. 53(4). – P. 471–491.
141. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35. – P. 1547–1549.
142. Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., Feussner, I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection // *BMC plant biology*. – 2011. – Vol. 11. – P. 1–16.

143. Laporte, J., Woodgate, S. L., Davies, S. J., Serwata, R., Gouveia, A., Nates, S. F. Poultry meat meal: a valuable source of the partial replacement of fish meal in aquafeeds // *International Aquafeed*. – 2009. – Vol. 12(2). – P. 12–17.
144. Lavens, P., Sorgeloos, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture // *FAO Fisheries Technical Paper* – 1996. – No. 361. – P. 79–250.
145. Lee Chang, K. J., Nichols, C. M., Blackburn, S. I., Dunstan, G. A., Koutoulis, A., Nichols, P. D. Comparison of *Thraustochytrids* *Aurantiochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp., and *Ulkenia* sp. for production of biodiesel, long-chain omega-3 oils, and exopolysaccharide // *Marine biotechnology*. – 2014. – Vol. 16. – P. 396–411.
146. Leblond, J. D., Evans, T. J., Chapman, P. J. The biochemistry of dinoflagellate lipids, with particular reference to the fatty acid and sterol composition of a *Karenia brevis* bloom // *Phycologia*. – 2003. – Vol. 42(4). – P. 324–331.
147. Leblond, J. D., Chapman, P. J. Lipid class distribution of highly unsaturated long chain fatty acids in marine dinoflagellates // *Journal of Phycology*. – 2000. – Vol. 36(6). – P. 1103–1108.
148. Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., Ruan, R. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 291. – P. 121934.
149. Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds // *Amino acids*. – 2009. – 37. – P. 43–53.
150. Liang, Y., Maeda, Y., Yoshino, T., Matsumoto, M., Tanaka, T. Profiling of fatty acid methyl esters from the oleaginous diatom *Fistulifera* sp. strain JPCC DA0580 under nutrition-sufficient and-deficient conditions // *Journal of applied phycology*. – 2014. – Vol. 26. – P. 2295–2302.
151. Lin, C. Y., Lin, B. Y. Fatty Acid Characteristics of *Isochrysis galbana* Lipids Extracted Using a Microwave-Assisted Method // *Energies*. – 2015. – Vol. 8(2). – P. 1154–1165.
152. Liu, W. Y., Fang, L., Feng, X. W., Li, G. M., Gu, R. Z. In vitro antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of peptides derived from corn

gluten meal // European Food Research and Technology. – 2020. – Vol. 246. – P. 2017–2027.

153. Long, J., Jia, J., Gong, Y., Han, D., Hu, Q. Assessment of Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production from Filamentous Microalga *Tribonema aequale*: From Laboratory to Pilot-Scale Study // Marine Drugs. – 2022. – Vol. 20(6). – P. 343.

154. Low, K. L., Idris, A., Yusof, N. M. Novel protocol optimized for microalgae lutein used as food additives // Food chemistry. – 2020. – Vol. 307. – P. 125631.

155. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Journal of biological chemistry. – 1951. – Vol. 193(1). – P. 265–275.

156. Lu, J., Takeuchi, T. Spawning and egg quality of the tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw *Spirulina* throughout three generations // Aquaculture. – 2004. – Vol. 234. – P. 625–640.

157. Lu, J., Yoshizaki, G., Sakai, K., Takeuchi, T. Acceptability of raw *Spirulina platensis* by larval tilapia *Oreochromis niloticus* // Fisheries Science. – 2002. – Vol. 68. – P. 51–58.

158. Lu, Q., Li, H., Xiao, Y., Liu, H., et al. A state-of-the-art review on the synthetic mechanisms, production technologies, and practical application of polyunsaturated fatty acids from microalgae // Algal Research. – 2021. – Vol. 55. – P. 102281.

159. Luengo, E., Martínez, J. M., Bordetas, A., Álvarez, I., Raso, J. Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris* // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2015. – Vol. 29. – P. 15–22.

160. Lund, I., El Kertaoui, N., Izquierdo, M. S., Dominguez, D., Hansen, B. W., Kestemont, P. The importance of phospholipids combined with long-chain PUFA in formulated diets for pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae // British Journal of Nutrition. – 2018. – Vol. 120(6). – P. 628–644.

161. Lutfi, E., Berge, G. M., Baeverfjord, G., Sigholt, T., Bou, M., Larsson, T., Morkore, T., Evensen, O., Sissener, N. H., Rosenlund, G., Sveen, L., Ostbye, T. K., Ruyter

B. Increasing dietary levels of the *n*-3 long-chain PUFA, EPA and DHA, improves the growth, welfare, robustness and fillet quality of Atlantic salmon in sea cages // *British Journal of Nutrition*. – 2023. – Vol. 129(1). – P. 10–28.

162. Ma, K., Bao, Q., Wu, Y., Chen, S., Zhao, S., Wu, H., Fan, J. Evaluation of microalgae as immunostimulants and recombinant vaccines for diseases prevention and control in aquaculture // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 590431.

163. Ma, Y. A., Cheng, Y. M., Huang, J. W., Jen, J. F., Huang, Y. S., Yu, C. C. Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae // *Bioprocess and biosystems engineering*. – 2014. – Vol. 37. – P. 1543–1549.

164. Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N. M., Prates, J. A. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review // *Livestock science*. – 2017. – Vol. 205. – P. 111–121.

165. Maehre, H. K., Edvinsen, G. K., Eilertsen, K. E., Elvevoll, E. O. Heat treatment increases the protein bioaccessibility in the red seaweed dulse (*Palmaria palmata*), but not in the brown seaweed winged kelp (*Alaria esculenta*) // *Journal of applied phycology*. – 2016. – Vol. 28. – P. 581–590.

166. Maltsev, Y., Gusev, E., Maltseva, I., Kulikovskiy, M., Namsaraev, Z., Petrushkina, M., Filimonova, A., Sorokin, B., Golubeva, A., Butaeva, G., Khrushchev, A., Zotko, N., Kuzmin, D. Description of a new species of soil algae, *Parietochloris grandis* sp. nov., and study of its fatty acid profiles under different culturing conditions // *Algal research*. – 2018. – Vol. 33. – P. 358–368.

167. Mamaeva, A., Namsaraev, Z., Maltsev, Y., Sorokin, B. et al. Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in *Bracteacoccus bullatus* cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations // *Journal of Applied Phycology*. – 2018. – Vol. 30. – P. 2237–2246.

168. Manikan, V., Nazir, M. Y. M., Kalil, M. S., Isa, M. H. M., Kader, A. J. A., Yusoff, W. M. W., Hamid, A. A. A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters // *Algal Research*. – 2015. – Vol. 9. – P. 40–47.

169. Marella, T. K., Tiwari, A. Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 307. – P. 123245.
170. Makridis, P., Costa, R. A., Dinis, M. T. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii* // *Aquaculture*. – 2006. – Vol. 255(1-4). – P. 76–81.
171. Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., Southgate, P. C. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae // *Aquaculture*. – 2006. – Vol. 257(1-4). – P. 491–503.
172. Marques, A., Dhont, J., Sorgeloos, P., Bossier, P. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically grown brine shrimp *Artemia franciscana* // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 2004. – Vol. 312(1). – P. 115–136.
173. Matos, A. P., Feller, R., Moecke, E. H. S., de Oliveira, J. V., Junior, A. F., Derner, R. B., Sant'Anna, E. S. Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2016. – Vol. 93. – P. 963–972.
174. Miyashita, K., Hosokawa, M. Fucoxanthin in the management of obesity and its related disorders // *Journal of Functional Foods*. – 2017. – Vol. 36. – P. 195–202.
175. Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R., Guerra, P. and Lopes da Silva, T. *Cryptothecodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review // *Journal of applied phycology*. – 2009. – Vol. 21. – P. 199–214.
176. Moheimani, N. R., Vadiveloo, A., Ayre, J. M., Pluske, J. R. Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent // *Algal research*. – 2018. – Vol. 35. – P. 362–369.
177. Molina Grima, E., Sánchez Pérez, J. A., García Camacho, F. et al. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1994. – Vol. 41. – P. 23–27.

178. Monte, J., Bernardo, J., Sá, M., Parreira, C., Galinha, C. F., Costa, L., Casanovas, C., Brazinha, C., Crespo, J. G. Development of an integrated process of membrane filtration for harvesting carotenoid-rich *Dunaliella salina* at laboratory and pilot scales // *Separation and Purification Technology*. – 2020. – Vol. 233. – P. 116021.
179. Moreno, V. J., de Moreno, J. E., Brenner, R. R. Biosynthesis of unsaturated fatty acids in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* // *Lipids*. – 1979. – Vol. 14(1). – P. 15–19.
180. Muller-Feuga, A. Microalgae for aquaculture: the current global situation and future trends // *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. – 2013. – P. 613–627.
181. Mustafa, M. G., Nakagawa, H. A review: Dietary benefits of algae as an additive in fish feed // *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. – 1995. – Vol. 47. – P. 155–162.
182. Nagappan, S., Nakkeeran, E. Biorefinery: A Concept for Co-producing Biofuel with Value-Added Products // *Environmental Chemistry for a Sustainable World*. – 2020. – Vol. 45. – P. 23-52.
183. Nagappan, S., Kumar Verma, S. Co-production of biodiesel and alpha-linolenic acid (omega-3 fatty acid) from microalgae, *Desmodesmus* sp. MCC34 // *Energy Sources Part A*. – 2018. – Vol. 40(24). – P. 2933–2940.
184. Nagappan, S., Das, P., AbdulQuadir, M., Thaher, M., Khan, S., Mahata, C., Al-Jabri, H., Vatland, A. K., Kumar, G. Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture // *Journal of Biotechnology*. – 2021. – Vol. 341. – P. 1–20.
185. Niccolai, A., Zittelli, G. C., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility // *Algal Research*. – 2019. – Vol. 42. – P. 101617.
186. Nidhina, N., Muthukumar, S. P. Antinutritional factors and functionality of protein-rich fractions of industrial guar meal as affected by heat processing // *Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 173. – P. 920–926.

187. Nogueira, N., Nascimento, F. J., Cunha, C., Cordeiro, N. Nannochloropsis gaditana grown outdoors in annular photobioreactors: Operation strategies // Algal Research. – 2020. – Vol. 48. – P. 101913.
188. Norsker, N. H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., Wijffels, R. H. Microalgal production – a close look at the economics // Biotechnology advances. – 2011. – Vol. 29(1). – P. 24–27.
189. Oliver, L., Dietrich, T., Marañón, I., Villarán, M. C., Barrio, R. J. Producing omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of sustainable sources and future trends for the EPA and DHA market // Resources. – 2020. – Vol. 9(12). – P. 148.
190. Ovando, C. A., Carvalho, J. C. D., Vinícius de Melo Pereira, G., Jacques, P., Soccol, V. T., Soccol, C. R. Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from Spirulina: A review // Food reviews international. – 2018. – Vol. 34(1). – P. 34–51.
191. Pan, J., Muppaneni, T., Sun, Y., Reddy, H. K., Fu, J., Lu, X., Deng, S. Microwave-assisted extraction of lipids from microalgae using an ionic liquid solvent [BMIM][HSO₄] // Fuel. – 2016. – Vol. 178. – P. 49–55.
192. Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L., Chew, B. P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans // Nutrition & metabolism. – 2010. – Vol. 7. – P. 1–10.
193. Pasquet, V., Cherouvrier, J.-R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J.-M., Berard, J.-B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J.-P., Picot, L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction // Process Biochemistry. – 2011. – Vol. 46. – No. 1. – P. 59–67.
194. Pasquet, V., Chérouvrier, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J. P., Picot, L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction // Process Biochemistry. – 2011. – Vol. 46(1). – P. 59–67.
195. Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E. et al. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // Aquaculture International. – 2007. – Vol. 15. – P. 1–9.

196. Patova, E. N., Novakovskaya, I. V., Sivkov, M. D. Cyanobacteria and Algae in Biological Soil Crusts of Frost Boils in the Mountainous Tundra of the Nether-Polar Urals // *Eurasian Soil Science*. – 2023. – Vol. 56. – P. 184–197.
197. Patterson, D., Gatlin III, D. M. Evaluation of whole and lipid-extracted algae meals in the diets of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) // *Aquaculture*. – 2013. – Vol. 416. – P. 92–98.
198. Pelletier, N., Tyedmers, P. Life cycle assessment of frozen tilapia fillets from Indonesian lake-based and pond-based intensive aquaculture systems // *Journal of Industrial Ecology*. – 2010. – Vol. 14(3). – P. 467–481.
199. Peltomaa, E., Hällfors, H., Taipale, S. J. Comparison of Diatoms and Dinoflagellates from Different Habitats as Sources of PUFAs // *Marine Drugs*. – 2019. – Vol. 17(4). – P. 233.
200. Pernet, F., Tremblay, R., Demers, E., Roussy, M. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system // *Aquaculture*. – 2003. – Vol. 221(1-4). – P. 393–406.
201. Petrushkina, M., Gusev, E., Sorokin, B., Zotko, N., Mamaeva, A., Filimonova, A., Kulikovskiy, M., Maltsev, Y., Yampolsky, I., Guglya, E., Vinokurov, V., Namsaraev, Z., Kuzmin, D. Fucoxanthin production by heterokont microalgae // *Algal Research*. – 2017. – Vol. 24. – P. 387–393.
202. Pico, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 43. – P. 84–99.
203. Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., Reina, G. G. B., Señoráns, F. J., Ibáñez, E. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris* // *LWT-Food Science and Technology*. – 2012. – Vol. 46(1). – P. 245–253.
204. Pogorzelska, E., Godziszewska, J., Brodowska, M., Wierzbicka, A. Antioxidant potential of *Haematococcus pluvialis* extract rich in astaxanthin on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigerated storage // *Meat science*. – 2018. – Vol. 135. – P. 54–61.

205. Popovich, C. A., Faraoni, M. B., Sequeira, A., Daglio, Y., Martín, L. A., Martínez, A. M., Damiani, M. C., Matulewicz, M. C., Leonardi, P. I. Potential of the marine diatom *Halamphora coffeaeformis* to simultaneously produce omega-3 fatty acids, chrysolaminarin and fucoxanthin in a raceway pond // *Algal Research*. – 2020. – Vol. 51. – P. 102030.
206. Posten, C., Schaub, G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--a process view // *Journal of Biotechnology*. – 2009. – Vol. 142(1). – P. 64–9.
207. Powers, S. K., DeRuisseau, K. C., Quindry, J., Hamilton, K. L. Dietary antioxidants and exercise // *Journal of Sports Sciences*. – 2004. – Vol. 22. – P. 81–94.
208. Prabha, S. P., Nagappan, S., Rathna, R., Viveka, R., Nakkeeran, E. Blue biotechnology: a vision for future marine biorefineries // *In Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts*. – 2020. – P. 463–480.
209. Praveenkumar, R., Lee, K., Lee, J., Oh, Y. K. Breaking dormancy: an energy-efficient means of recovering astaxanthin from microalgae // *Green Chemistry*. – 2015. – Vol. 17(2). – P. 1226–1234.
210. Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F. O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – P. 1823–1829.
211. Raji, A. A., Jimoh, W. A., Bakar, N. A., Taufek, N. M., Muin, H., Alias, Z., Razak, S. A., et al. Dietary use of *Spirulina* (*Arthrospira*) and *Chlorella* instead of fish meal on growth and digestibility of nutrients, amino acids and fatty acids by African catfish // *Journal of Applied Phycology*. – 2020. – Vol. 32. – P. 1763–1770.
212. Rajput, A., Singh, D. P., Khatkar, J. S., Swatch, G. K., Singh, Y. Evaluation of growth and carotenoid production by a green microalga *Scenedesmus quadricauda* PUMCC 4.1. 40. under optimized culture conditions // *Journal of Basic Microbiology*. – 2022. – Vol. 62(9). – P. 1156–1166.
213. Rebollosa-Fuentes, M. M., Navarro-Pérez, A., García-Camacho, F., Ramos-Miras, J. J., Guil-Guerrero, J. L. Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis* // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2001. – Vol. 49(6). – P. 2966–2972.

214. Renaud, S. M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures // *Aquaculture*. – 2002. – Vol. 211(1-4). – P. 195–214.
215. Rinanti, A., Karden, E., Astuti, D. I., Dewi, K. Integrated vertical photobioreactor system for carbon dioxide removal using phototrophic microalgae // *Nigerian Journal of Technology*. – 2013. – Vol. 32(2). – P. 225–232.
216. Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., Rashid, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2018. – Vol. 92. – P. 394–404.
217. Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor // *Biotechnology and bioengineering*. – 2009. – Vol. 102(1). – P. 100–112.
218. Rogers, J. N., Rosenberg, J. N., Guzman, B. J., Oh, V. H., Mimbela, L. E., Ghassemi, A., Betenbaugh, M. J., Oyler, G. A., Donohue, M. D. A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algal biofuel production at commercial scales // *Algal research*. – 2014. – Vol. 4. – P. 76–88.
219. Rousch, J. M., Bingham, S. E., Sommerfeld, M. R. Changes in fatty acid profiles of thermo-intolerant and thermo-tolerant marine diatoms during temperature stress // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 2003. – Vol. 295(2). – P. 145–156.
220. Rozenberg, J. M., Sorokin, B. A., Mukhambetova, A. N., Emelianova, A. A., Kuzmin, V. V., Belogurova-Ovchinnikova, O. Y., Kuzmin, D.V. Recent advances and fundamentals of microalgae cultivation technology // *Biotechnology Journal*. – 2024. – Vol. 19(3). – P. 2300725.
221. Ryckebosch, E., Bruneel, C., Muylaert, K., Foubert, I. Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids // *Lipid Technology*. – 2012. – Vol. 24(6). – P. 128–130.

222. Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., Murray, P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis* // *Bioresource technology*. – 2013. – Vol. 128. – P. 118–124.
223. Samaee, S. M., Atashbar Kangarloei, B., Noori, F., Estévez, A. An endeavor to find starter feed alternatives and techniques for zebrafish first-feeding larvae: The effects on viability, morphometric traits, digestive enzymes, and expression of growth-related genes // *Zebrafish*. – 2021. – Vol. 18(1). – P. 73–91.
224. Samuelsen, T. A., Oterhals, Å., Kousoulaki, K. High lipid microalgae (*Schizochytrium* sp.) inclusion as a sustainable source of n-3 long-chain PUFA in fish feed – Effects on the extrusion process and physical pellet quality // *Animal Feed Science and Technology*. – 2018. – Vol. 236. – P. 14–28.
225. San Pedro, A., González-López, C. V., Acién, F. G., Molina-Grima, E. Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors // *Bioresource technology*. – 2014. – Vol. 169. – P. 667–676.
226. Santigosa, E., Brambilla, F., Milanese, L. Microalgae oil as an effective alternative source of EPA and DHA for gilthead seabream (*Sparus aurata*) aquaculture // *Animals*. – 2021. – Vol. 11(4). – P. 971.
227. Sarker, P. K. Microorganisms in fish feeds, technological innovations, and key strategies for sustainable aquaculture // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11(2). – P. 439.
228. Sarker, P. K., Hosokawa, H. Effect of phytase on growth and phosphorus utilization in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) // *International Journal of Recirculating Aquaculture*. – 2009. – Vol. 10(1). – P. 25–41.
229. Sarker, P. K., Fournier, J., Boucher, E., Proulx, E., de la Noüe, J., Vandenberg, G. W. Effects of low phosphorus ingredient combinations on weight gain, apparent digestibility coefficients, non-fecal phosphorus excretion, phosphorus retention and loading of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Animal feed science and technology*. – 2011. – Vol. 168(3-4). – P. 241–249.
230. Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Lanois, A. J., Livesey, E. D., Bernhard, K. P., Coley, M. L. Towards Sustainable Aquafeeds: Complete Substitution of Fish Oil with

Marine Microalga *Schizochytrium* sp. Improves Growth and Fatty Acid Deposition in Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11. – P. e0156684. (a).

231. Sarker, P. K., Gamble, M. M., Kelson, S., Kapuscinski, A. R. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients // *Aquaculture Nutrition*. – 2016. – Vol. 22. – P. 109–119. (b).

232. Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Bae, A. Y., Donaldson, E., Sitek, A. J., Fitzgerald, D. S., Edelson, O. F. Towards sustainable aquafeeds: Evaluating substitution of fishmeal with lipid-extracted microalgal co-product (*Nannochloropsis oculata*) in diets of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13(7). – P. e0201315.

233. Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd_Allah, E. F. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine // *Saudi journal of biological sciences*. – 2019. – Vol. 26(4). – P. 709–722.

234. Satoh, S., Poe, W. E., Wilson, R. P. Effect of supplemental phytate and/or tricalcium phosphate on weight gain, feed efficiency and zinc content in vertebrae of channel catfish // *Aquaculture*. – 1989. – Vol. 80(1-2). – P. 155–161.

235. Serrano, E., Simpfendorfer, R., Medina, A., et al. Partially replacing fish oil with microalgae (*Schizochytrium limacinum* and *Nannochloropsis oceanica*) in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in saltwater with reference to growth performance, muscle fatty acid composition and liver ultrastructure // *Aquaculture Research*. – 2021. – Vol. 52(9). – P. 4401–4413.

236. Shakeri, A., Soheili, V., Karimi, M., Hosseini, S. A., Fazly Bazzaz, B. S. Biological activities of three natural plant pigments and their health benefits // *Journal of Food Measurement and Characterization*. – 2018. – Vol. 12. – P. 356–361.

237. Shapira, N., Weill, P., Sharon, O., Loewenbach, R., Berzak, O. n-3 PUFA fortification of high n-6 PUFA farmed tilapia with linseed could significantly increase dietary contribution and support nutritional expectations of fish // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2009. – Vol. 57. – P. 2249–2254.

238. Sharma, S. A., Surveswaran, S., Arulraj, J., Velayudhannair, K. Bromelain enhances digestibility of Spirulina-based fish feed // *Journal of Applied Phycology*. – 2021. – Vol. 33(2). – P. 967–977.
239. Shepherd, C. J., Jackson, A. J. Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets // *Journal of fish biology*. – 2013. – Vol. 83(4). – P. 1046–1066.
240. Shi, Z., Li, X. Q., Chowdhury, M. K., Chen, J. N., Leng, X. J. Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus gibelio* // *Aquaculture*. – 2016. – Vol. 460. – P. 37–44.
241. Shields, R. J. Larviculture of marine finfish in Europe // *Aquaculture*. – 2001. – Vol. 200(1-2). – P. 55–88.
242. Sigurdson, G. T., Tang, P., Giusti, M. M. Natural colorants: Food colorants from natural sources // *Annual review of food science and technology*. – 2017. – Vol. 8(1). – P. 261–280.
243. Silva, S. C., Ferreira, I. C., Dias, M. M., Barreiro, M. F. Microalgae-derived pigments: A 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25(15). – P. 3406.
244. Simonazzi, M., Pozzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Samorì, C., Pistocchi, R. Use of waste carbon dioxide and pre-treated liquid digestate from biogas process for *Phaeodactylum tricornutum* cultivation in photobioreactors and open ponds // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 292. – P. 121921.
245. Sinetova, M. A., Sidorov, R. A., Starikov, A. Y., Voronkov, A. S., Medvedeva, A. S., Krivova, Z. V., Pakholkova, M. S., Bachin, D. V., Bedbenov, V. S., Gabrielyan, D. A., Zayadan, B. K. Assessment of the biotechnological potential of cyanobacterial and microalgal strains from IPPAS culture collection // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2020. – Vol. 56. – P. 794–808.
246. Škaloud, P., Kynčlová, A., Benada, O., Kofroňová, O., Škaloudová, M. Toward a revision of the genus *Synura*, section *Petersenianae* (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species // *Phycologia*. – 2012. – Vol. 51. – P. 303–329.

247. Skrede, A., Mydland, L. T., Ahlstrøm, Ø., Reitan, K. I., Gislerød, H. R., Øverland, M. Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals // *Journal of Animal and Feed Sciences*. – 2011. – Vol. 20(1). – P. 131–142.
248. Skrede, A., Berge, G. M., Storebakken, T., Herstad, O., Aarstad, K. G., Sundstøl, F. Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon // *Animal Feed Science and Technology*. – 1998. – Vol. 76(1-2). – P. 103–116.
249. Sluijs, I., Cadier, E., Beulens, J. W. J., Spijkerman, A. M. W., Van der Schouw, Y. T. Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. – 2015. – Vol. 25(4). – P. 376–381.
250. Snow, A. M., Ghaly, A. E. The nutritive value of wastewater grown barley and its utilization in fish feed // *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. – 2007. – Vol. 2. – No. 3. – P. 168–183.
251. Soares, A. T., da Costa, D. C, Vieira, A. A. H., Antoniosi Filho, N. R. Analysis of major carotenoids and fatty acid composition of freshwater microalgae // *Heliyon*. – 2019. – Vol. 5(4). – P. e01529.
252. Sommer, T. R., D'Souza, F. M. L., Morrissy, N. M. Pigmentation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis* // *Aquaculture*. – 1992. – Vol. 106. – P. 63–74.
253. Sørensen, M., Morken, T., Kosanovic, M., Øverland, M. Pea and wheat starch possess different processing characteristics and affect physical quality and viscosity of extruded feed for Atlantic salmon // *Aquaculture Nutrition*. – 2011. – Vol. 17(2). – P. e326–e336.
254. Sorokin, B., Gusev, E., Namsaraev, Z., Emelianova, A., Patova, E., Novakovskaya, I., Vinokurov, V. and Kuzmin, D. Effect of microalgae feed supplementation on growth performance and feeding efficiency of tilapia fry // *Journal of Applied Phycology*. – 2024. – P. 1–14;
255. Sørensen, M., Berge, G. M., Reitan, K. I., Ruyter, B. Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—Effect on nutrient

digestibility, growth and utilization of feed // *Aquaculture*. – 2016. – Vol. 460. – P. 116–123.

256. Spinelli, J., Houle, C. R., Wekell, J. C. The effect of phytates on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium // *Aquaculture*. – 1983. – Vol. 30(1-4). – P. 71–83.

257. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. Commercial applications of microalgae // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2006. – Vol. 101(2). – P. 87–96.

258. Sprague, M., Dick, J. R., Tocher, D. R. Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006–2015 // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 21892.

259. Stoneham, T. R., Kuhn, D. D., Taylor, D. P., Neilson, A. P., Smith, S. A., Gatlin, D. M., Chu, H. S. S., O’Keefe, S. F. Production of omega-3 enriched tilapia through the dietary use of algae meal or fish oil: Improved nutrient value of fillet and offal // *PloS One*. – 2018. – Vol. 13. – P. e0194241.

260. Suárez-Jiménez, G. M., López-Saiz, C. M., Ramírez-Guerra, H. E., Ezquerro-Brauer, J. M., Ruiz-Cruz, S., Torres-Arreola, W. Role of Endogenous and Exogenous Tocopherols in the Lipid Stability of Marine Oil Systems: A Review // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17.

261. Suetsuna, K., Chen, J. R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* // *Marine Biotechnology*. – 2001. – Vol. 3. – P. 305–309.

262. Sun, H., Wang, Y., He, Y., Liu, B., Mou, H., Chen, F., Yang, S. Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry // *Marine Drugs*. – 2023. – Vol. 21. – P. 82.

263. Sun, Y. X., Liu, T., Dai, X. L., Zheng, Q. S., Hui, B. D., Jiang, Z. F. Treatment with lutein provides neuroprotection in mice subjected to transient cerebral ischemia // *Journal of Asian natural products research*. – 2014. – Vol. 16(11). – P. 1084–1093.

264. Sundell, K., Berge, G. M., Ruyter, B., Sundh, H. Low Omega-3 Levels in the Diet Disturbs Intestinal Barrier and Transporting Functions of Atlantic Salmon Freshwater and Seawater Smolts // *Frontiers in Physiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 883621.
265. Tadesse, Z., Boberg, M., Sonesten, L., Ahlgren, G. Effects of algal diets and temperature on the growth and fatty acid content of the cichlid fish *Oreochromis niloticus* L. – A laboratory study // *Aquatic Ecology*. – 2003. – Vol. 37. – P. 169–182.
266. Tacon, A. G. J. et al. The Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp; a Training Manual. 1: The Essential Nutrients // *FAO Government Cooperative Programme*. – 1987. – P. 126.
267. Tacon, A. G., Hasan, M. R., Metian, M. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects // *FAO Fisheries and Aquaculture technical paper*. – 2011. – Vol. 1. – P. 564.
268. Taipale, S., Peltomaa, E., Salmi, P. Variation in ω -3 and ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids Produced by Different Phytoplankton Taxa at Early and Late Growth Phase // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10(4). – P. 559.
269. Takahashi, K. Studies on genera *Mallomonas* and *Synura*, and other plankton in freshwater with the electron microscope. VIII. On three new species of Chrysophyceae // *Botanical Magazine*. – 1972. – Vol. 85. – P. 293–302.
270. Takeuchi, T., Lu, J., Yoshizaki, G., Satoh, S. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw *Spirulina*. // *Fisheries Science*. – 2002. – Vol. 68. – P. 34–40.
271. Tan, J. S., Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., Show, P. L. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids // *Bioengineered*. – 2020. – Vol. 11(1). – P. 116–129.
272. Tatke, P., Jaiswal, Y. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research // *Research Journal of Medicinal Plants*. – 2011. – Vol. 5(1). – P. 21-31.
273. Tavakoli, K., Pour-Aboughadareh, A., Kianersi, F., Poczai, P., Etminan, A., Shooshtari, L. Applications of CRISPR-Cas9 as an Advanced Genome Editing System in Life Sciences // *BioTech (Basel)*. – 2021. – Vol. 10(3). – P. 14.

274. Tavakoli, S., Regenstein, J. M., Daneshvar, E., Bhatnagar, A., Luo, Y., Hong, H. Recent advances in the application of microalgae and its derivatives for preservation, quality improvement, and shelf-life extension of seafood // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2022. – Vol. 62(22). – P. 6055–6068.
275. Tibaldi, E., Zittelli, G. C., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M. R., Poli, B. M. Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp.(T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives // *Aquaculture*. – 2015. – Vol. 440. – P. 60–68.
276. Tibbetts, S. M., Yasumaru, F., Lemos, D. In vitro prediction of digestible protein content of marine microalgae (*Nannochloropsis granulata*) meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Algal Research*. – 2017. – Vol. 21. – P. 76–80.
277. Tocher, D. R., Agaba, M., Hastings, N., Bell, J. G., Dick, J. R., Teale, A. J. Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2001. – Vol. 24. – P. 309–320.
278. Tonon, T., Harvey, D., Larson, T. R., Graham, I. A. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae // *Phytochemistry*. – 2002. – Vol. 61(1). – P. 15–24.
279. Tulli, F., Chini Zittelli, G., Giorgi, G., Poli, B. M., Tibaldi, E., Tredici, M. R. Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets // *Journal of aquatic food product technology*. – 2012. – Vol. 21(3). – P. 188–197.
280. Tzima, S., Georgiopoulou, I., Louli, V., Magoulas, K. Recent advances in supercritical CO₂ extraction of pigments, lipids and bioactive compounds from microalgae // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28(3). – P. 1410.
281. Ullah, Z., Ahmed, G., un Nisa, M., Sarwar, M. Standardized ileal amino acid digestibility of commonly used feed ingredients in growing broilers // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. – 2016. – Vol. 29(9). – P. 1322.

282. Usup, G., Hamid, S. Z., Chiet, P. K., Wah, C. K., Ahmad, A. Marked differences in fatty acid profiles of some planktonic and benthic marine dinoflagellates from Malaysian waters // *Phycologia*. – 2008. – Vol. 47(1). – P. 105–111.
283. Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., León, R. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynthesis research*. – 2015. – Vol. 125. – P. 423–436.
284. Varelas, V. Food wastes as a potential new source for edible insect mass production for food and feed: A review // *Fermentation*. – 2019. – Vol. 5(3). – P. 81.
285. Venkata Subhash, G., Chugh, N., Iyer, S., Waghmare, A., Musale, A. S., Nandru, R., Dixit, R. B., Gaikwad, M. S., Menon, D., Thorat, R., Kumar, G. R. K. Application of in vitro protein solubility for selection of microalgae biomass as protein ingredient in animal and aquafeed // *Journal of Applied Phycology*. – 2020. – Vol. 32. – P. 3955–3970.
286. Venou, B., Alexis, M. N., Fountoulaki, E., Haralabous, J. Performance factors, body composition and digestion characteristics of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed pelleted or extruded diets // *Aquaculture Nutrition*. – 2009. – Vol. 15(4). – P. 390–401.
287. Villaró, S., Ciardi, M., Morillas-España, A., Sánchez-Zurano, A., Acién-Fernández, G., Lafarga, T. Microalgae derived astaxanthin: Research and consumer trends and industrial use as food // *Foods*. – 2021. – Vol. 10(10). – P. 2303.
288. Vizcaíno, A. J., Rodiles, A., López, G. et al. Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass // *Fish Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 44. – P. 661–677.
289. von Danwitz, A., Schulz, C. Effects of dietary rapeseed glucosinolates, sinapic acid and phytic acid on feed intake, growth performance and fish health in turbot (*Psetta maxima* L.) // *Aquaculture*. – 2020. – Vol. 516. – P. 734624.
290. Waite, R., Beveridge, M., Brummett, R., Castine, S., Chaiyawannakarn, N., Kaushik, S., Mungkung, R., Nawapakpilai, S., Phillips, M. Improving productivity and environmental performance of aquaculture // *WorldFish*. – 2014. – P. 1–60.

291. Wan, A. H., Davies, S. J., Soler-Vila, A., Fitzgerald, R., Johnson, M. P. Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. *Reviews in Aquaculture*. – 2019. – Vol. 11(3). – P. 458–492.
292. Wang, Y., Xu, Z., Bach, S. J., McAllister, T. A. Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain // *Animal Feed Science and Technology*. – 2008. – Vol. 145(1/4). – P. 375–395.
293. Wang, F., Yang, Y. H., Han, Z. Z., Dong, H. W., Yang, C. H., Zou, Z. Y. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) // *Aquaculture International*. – 2009. – Vol. 17. – P. 143–157.
294. Wang, S., Lan, C., Wang, Z., Wan, W., Zhang, H., Cui, Q., Song, X. Optimizing eicosapentaenoic acid production by grafting a heterologous polyketide synthase pathway in the thraustochytrid *Aurantiochytrium* // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 68(40). – P. 11253–11260.
295. Wang, X., Fosse, H. K., Li, K., Chauton, M. S., Vadstein, O., Reitan, K. I. Influence of nitrogen limitation on lipid accumulation and EPA and DHA content in four marine microalgae for possible use in aquafeed // *Frontiers in Marine Science*. – 2019. – Vol. 6. – P. 95.
296. Wee, J. L., Fasone, L. D., Sattler, A., Starks, W. W., Hurley, D. L. ITS/5.8S DNA sequence variation in 15 isolates of *Synura petersenii* Korshikov (Synurophyceae) // *Nova Hedwigia Beiheft*. – 2001. – Vol. 122. – P. 245–258.
297. White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., Taylor, J. W. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics // *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. – 1990. – P. 315–322.
298. Wickramasuriya, S. S., Yi, Y. J., Yoo, J., Kang, N. K., Heo, J. M. A review of canola meal as an alternative feed ingredient for ducks // *Journal of animal science and technology*. – 2015. – Vol. 57. – P. 1–9.

299. Withers, N. W., Fiksdahl, A., Tuttle, R. C., Liaaen-Jensen, S. Carotenoids of the Chrysophyceae // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. – 1981. – Vol. 68. – P. 345–349.
300. Fish To 2030. Prospects for Fisheries and Aquaculture // The World Bank. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://hdl.handle.net/10986/17579>
301. Wu, M. T., Chou, H. N., Huang, C. J. Dietary fucoxanthin increases metabolic rate and upregulated mRNA expressions of the PGC-1 α network, mitochondrial biogenesis and fusion genes in white adipose tissues of mice // *Marine drugs*. – 2014. – Vol. 12(2). – P. 964–982.
302. Wynn, J., Behrens, P., Sundararajan, A., Hansen, J., Apt, K. Production of single cell oils by dinoflagellates. In *Single cell oils* // AOCS press. – 2010. – P. 115–129.
303. Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., Zhang, C. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita* // *Marine Drugs*. – 2013. – Vol. 11(7). – 2667-2681.
304. Xia, S., Gao, B., Fu, J., Xiong, J., Zhang, C. Production of fucoxanthin, chrysolaminarin, and eicosapentaenoic acid by *Odontella aurita* under different nitrogen supply regimes // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2018. – Vol. 126(6). – P. 723–729.
305. Yan, X., Hoek, T. A., Vale, R. D., Tanenbaum, M. E. Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo // *Cell*. – 2016. – Vol. 165(4). – 976–989.
306. Yao, L., Gerde, J. A., Lee, S. L., Wang, T., Harrata, K. A. Microalgae lipid characterization // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2015. – Vol. 63(6). – P. 1773–1787.
307. Yap, B. H., Crawford, S. A., Dumsday, G. J., Scales, P. J., Martin, G. J. A mechanistic study of algal cell disruption and its effect on lipid recovery by solvent extraction // *Algal Research*. – 2014. – Vol. 5. – P. 112–120.
308. Yoshida, H., Yanai, H., Ito, K., Tomono, Y., Koikeda, T., Tsukahara, H. and Tada, N. Administration of natural astaxanthin increases serum HDL-cholesterol and adiponectin in subjects with mild hyperlipidemia // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 209(2). – P. 520–523.

309. Yu, R., Cao, H., Huang, Y., Peng, M., Kajbaf, K., Kumar, V., Tao, Z., Yang, G., Wen, C. The effects of partial replacement of fishmeal protein by hydrolysed feather meal protein in the diet with high inclusion of plant protein on growth performance, fillet quality and physiological parameters of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze) // *Aquaculture research*. – 2020. – Vol. 51(2). – P. 636–647.
310. Zarekarizi, A., Hoffmann, L. and Burritt, D., 2019. Approaches for the sustainable production of fucoxanthin, a xanthophyll with potential health benefits // *Journal of applied phycology*. – 2019. – Vol. – 31. – P. 281–299.
311. Zhang, H., Gong, P., Cai, Q., Zhang, C., Gao, B. Maximizing fucoxanthin production in *Odontella aurita* by optimizing the ratio of red and blue light-emitting diodes in an auto-controlled internally illuminated photobioreactor // *Bioresource Technology*. – 2022. – Vol. 344(Pt B). – 126260.
312. Zhou, R., Zhou, R., Zhang, X., Fang, Z., Wang, X., Speight, R., Wang, H., Doherty, W., Cullen, P. J., Ostrikov, K. K., Bazaka, K. High-Performance Plasma-Enabled Biorefining of Microalgae to Value-Added Products // *ChemSusChem*. – 2019. – 12(22). – P. 4976–4985.
313. Zhou, Z., Ringø, E., Olsen, R. E., Song, S. K. Dietary effects of soybean products on gut microbiota and immunity of aquatic animals: a review // *Aquaculture Nutrition*. – 2018. – Vol. 24(1). – P. 644–665
314. Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., Feussner, I. Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms // *Progress in lipid research*. – 2018. – Vol. 70. – P. 1–16.