

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

На правах рукописи

КУЗЬМИН ДЕНИС ВЛАДИМИРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ПО ПОЛУЧЕНИЮ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
ИЗ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук,
профессор РАН
Буздин Антон Александрович

Долгопрудный - 2024

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР. СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, БАЗИРУЮЩЕЙСЯ НА НОВЫХ ПОДХОДАХ К ПОЛУЧЕНИЮ ЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ СОЕДИНЕНИЙ С ВЫСОКОЙ ДОБАВОЧНОЙ СТОИМОСТЬЮ	
1.1 Обзор и краткая систематика микроводорослей	19
1.2 Биотехнологический потенциал фотосинтезирующих микроорганизмов	22
1.2.1 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник белка	25
1.2.2 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник липидов	25
1.2.3 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник полисахаридов	28
1.2.4 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник пигментов	29
1.2.5 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник витаминов	31
1.2.6 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник биологически активных молекул	32
1.2.6.1 Противоопухолевые соединения	32
1.2.6.2 Антимикробные соединения	33
1.2.6.2.1 Грибы-сателлиты фототрофов, как источник антибиотиков	34
1.2.6.3 Антиоксиданты	42
1.2.7 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник биотоплива	46
1.2.8 Фотосинтезирующие микроорганизмы в биологической очистке водоемов и почв	49
1.2.9 Другие области применения фототрофных микроорганизмов	50
1.3 Факторы, влияющие на скорость роста биомассы	51
1.4 Способы культивирования микроводорослей	57
1.5 Подходы для повышения эффективности штаммов-продуцентов	62
1.5.1 Ненаправленный мутагенез	64
1.5.2 Направленный мутагенез	66
1.5.3 Методы обратной генетики и синтетической биологии	67
1.6 Высокопроизводительный скрининг штаммов	68
1.7 Технологические платформы в биомедицине	78
1.7.1 Технологические платформы в биомедицинской сфере	79
1.7.1.1 Клеточная терапия 2.0	80
1.7.1.2 Генная терапия	84
1.7.1.3 Технология разработки РНК-вакцин	86
1.7.1.4 Искусственный интеллект и метод машинного обучения	88
1.7.1.5 Системы направленного транспорта лекарств	90
1.7.2 Технологические платформы в промышленной биотехнологии	93
1.7.2.1 Концепция биорафинирования для технологических платформ	95
1.7.2.2 Универсальный штамм-продуцент как модель биотехнологической	

платформы	97
1.7.2.3 Технологические платформы в Российской Федерации как коммуникативный инструмент	99
1.8 Технологическая платформа на основе фотосинтезирующих микроорганизмов	102
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	106
2.1 Молекулярная идентификация, культивирование и химический анализ штаммов микроводорослей	106
2.1.1 Культивирование, идентификация и химический анализ штамма <i>Bracteacoccus bullatus</i> MZ-Ch11	106
2.1.1.1 Выделение и культивирование <i>Bracteacoccus bullatus</i> MZ-Ch11	106
2.1.1.2 Молекулярный анализ <i>Bracteacoccus bullatus</i> MZ-Ch11	107
2.1.1.3 Определение общего содержания липидов в биомассе микроводорослей	108
2.1.1.4 Определение ацилглицеридов в биомассе микроводорослей	108
2.1.1.5 Анализ состава жирных кислот в биомассе микроводорослей	109
2.1.1.6 Проточная цитофлуориметрия и флуоресцентная микроскопия	110
2.1.1.7 Анализ данных	110
2.1.2 Культивирование, идентификация и химический анализ биомассы штаммов <i>Vischeria magna</i> SBV108 и <i>Mallomonas furtiva</i> SBV13	111
2.1.2.1 Молекулярная идентификация штамма <i>V. magna</i> SBV108	111
2.1.2.2 Молекулярная идентификация штамма <i>M. furtiva</i> SBV13	111
2.1.2.4 Культивирование микроводорослей	113
2.1.2.6 Оценка жизнеспособности лиофилизата микроводорослей	115
2.1.2.7 Определение содержания фукоксантина в биомассе микроводорослей	116
2.1.2.8 Определение содержания эйкозапентаеновой кислоты и других жирных кислот в биомассе микроводорослей	117
2.1.2.9 Определение содержания белка в биомассе микроводорослей	118
2.1.2.10 Определение содержания жиров в биомассе микроводорослей	118
2.1.3 Исследование новых кормов для красной тилапии <i>Oreochromis mossambicus</i> × <i>Oreochromis niloticus</i> из биомассы микроводорослей	119
2.1.3.1 Приготовление тестовых кормов	119
2.1.4 Выращивание красной тилапии	120
2.1.4.1 Контроль параметров воды	120
2.1.4.2 Химический анализ кормов и рыбы	121
2.1.4.3 Оценка ростовых характеристик и показателей эффективности кормления	121
2.2 Синтез и изучение активности производных антибиотиков на основе триазеноиндола	123
2.2.1 Культуры эукариотических клеток	123
2.2.2 Среды для культивирования эукариотических клеток	124
2.2.3 Синтез производных триазеноиндола	124
2.2.3.1 Синтез прекурсора 1	124
2.2.3.2 Синтез прекурсора 2	125
2.2.3.3 Синтез прекурсора 3	125
2.2.3.4 Синтез прекурсора 4	126

2.2.3.5 Синтез соединений BX-SI001, 003, 005, 010, 016, 055	126
2.2.3.6 Синтез соединений BX-SI019, 020, 021, 027	127
2.2.3.7 Синтез соединений BX-SI035, 036, 037, 038, 039, 040, 043, 044, 045, 048	127
2.2.3.8 Синтез соединений BX-SI057, 058	127
2.2.4 Определение растворимости в воде	128
2.2.5 Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК)	128
2.2.6 Исследование цитотоксичности синтезированных веществ	129
2.2.7 Оценка стабильности в искусственных желудочном и кишечном соках	130
2.2.8 Оценка проникновения через клеточный барьер <i>in vitro</i>	131
2.2.9 Определение стабильности в микросомах печени	131
2.2.10 Оценка ингибирования активности изоформ цитохрома P450	132
2.2.11 Оценка стабильности в плазме крови крыс и человека	132
2.2.12 Оценка связывания с белками плазмы	133
2.2.13 Исследование потенциальной кардиотоксичности вследствие блокады hERG	134
2.2.14 Токсикологические исследования на животных: однократная острая токсичность на крысах	134
2.2.14.1 Лабораторные животные	134
2.2.14.2 Способ введения и выбор доз	135
2.2.14.3 Регистрация эффектов острой токсичности	136
2.2.14.4 Патоморфологические исследования	138
2.2.14.5 Анализ данных	139
2.3 Скрининг цитотоксичности экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий	140
2.3.1 Получение экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий для исследования активация сигнальных путей и изучения цитотоксичности	140
2.3.2 Культивирование эукариотических клеток для исследования активация сигнальных путей и изучения цитотоксичности экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий	141
2.4 Биоинформатический анализ активации клеточных сигнальных путей при воздействии экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий	141
2.4.1 Анализ уровня активации сигнальных путей	142
2.4.2 Визуализация результатов статистического тестирования методом Volcano plot	143
2.4.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов	143
2.5 МТТ-тест клеток HL-60, обработанных экстрактами из биомассы микроводорослей и цианобактерий	144
2.5.1 Гемолитический тест	144
2.6 Выделение и очистка криптофицина-1 из экстракта биомассы цианобактерии	147
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	148
3.1 Отбор перспективных штаммов-продуцентов липидов, полиненасыщенных омега-3 жирных кислот и каротиноидов	148
3.2 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов липидов	149
3.3 Оптимизация продуктивности штамма <i>Bracteacoccus bullatus</i> MZ-Ch11	152

3.4 Изучение жирнокислотного профиля штамма <i>Bracteacoccus bullatus</i> MZ-Ch11	155
3.5 Определение биотехнологического потенциала штамма <i>Bracteacoccus bullatus</i> MZ-Ch11	157
Выводы по разделу	158
3.6 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов фукоксантина	159
3.7 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов эйкозапентаеновой кислоты	174
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАССЫ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В АКВАКУЛЬТУРЕ	181
4.1 Фотосинтезирующие микроорганизмы как перспективный корм для аквакультуры	181
4.2 Приготовление тестовых кормов на основе биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов	182
4.3 Оценка ростовых характеристик и показателей эффективности кормления мальков красной тилапии	184
4.4 Химический анализ кормов и мяса красной тилапии	186
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ВЕЩЕСТВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ	190
5.1 Проблема устойчивости бактерий к антимикробным препаратам	190
5.2 Поиск антимикробных соединений из фотосинтезирующих микроорганизмов	191
5.3 Дизайн и синтез библиотеки соединений-модификаций BX-SI001	192
5.4 Определение антимикробной активности и цитотоксичности оригинального соединения BX-SI001 и его модификаций	195
5.5 Определение фармакокинетических свойств вещества BX-SI043	199
5.5.1 Исследование стабильности субстанции BX-SI043 в микросомах печени (крыс и человека)	200
5.5.2 Исследование стабильности субстанции BX-SI043 в желудочном и кишечном соках	201
5.5.3 Изучение способности субстанции BX-SI043 ингибировать основные изоформы цитохрома CYP450 печени человека	202
5.5.4 Исследование стабильности BX-SI043 в плазме крови и связывания с белками плазмы (крыс, человека)	203
5.5.5 Определение проницаемости и активного транспорта субстанции BX-SI043 на модели Caco-2/Pgr	205
5.5.6 Исследование потенциальной кардиотоксичности субстанции BX-SI043	206
5.6 Исследование острой токсичности соединения BX-SI043 <i>in vivo</i>	206
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ШИРОКОМАСШТАБНОГО СКРИНИНГА IN SILICO ЭКСТРАКТОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ	212
6.1 Проблема существующих подходов к поиску новых противоопухолевых молекул из фотосинтезирующих микроорганизмов	212
6.2 Технология Онкобокс	213
6.3 Моделирование влияния экстрактов фотосинтезирующих микроорганизмов на жизнеспособность клеток опухолевой линии HL-60 на основе транскриптомных данных	215
6.4 Изучение влияния экстрактов на жизнеспособность клеток опухолевой линии HL-60	

in vitro	218
6.5 Изучение цитотоксического эффекта экстракта биомассы <i>Nostoc</i> sp.	219
ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ	230
7.1 Типологизация существующих подходов к изучению фотосинтезирующих микроорганизмов	230
7.1.1 Модель известный штамм - известный продукт	230
7.1.2 Модель новый штамм - известный продукт	231
7.1.3 Модель известный штамм - новый продукт	233
7.1.4 Модель новый штамм - новый продукт	234
7.2 Интегральная модель платформы для изучения биотехнологического потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов	235
ВЫВОДЫ	240
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	242
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	244
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	248
ПРИЛОЖЕНИЯ	296

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Фотосинтезирующие микроорганизмы (эукариотические микроводоросли, цианобактерии и аноксигенные фоторофные бактерии) - это одноклеточные или колониальные организмы, обитающие как в пресноводных, так и солоноводных и морских водоемах, использующие световую энергию и превращающие воду и диоксид углерода в органические вещества (Demirel, Z. et al. 2018).

Микроводоросли обладают значительным биотехнологическим потенциалом, так как являются одними из самых быстрорастущих фотосинтезирующих микроорганизмов на Земле (Olasehinde, T. A. et al. 2017), (Rozenberg, J. M. et al. 2024). Их культивирование требует относительно небольшого объема воды и может осуществляться на территориях, непригодных для сельского хозяйства. Кроме того, рост биомассы микроводорослей сопровождается поглощением углекислого газа и выделением кислорода (Demirel, Z. et al. 2018).

Микроводоросли способны синтезировать широкий спектр различных соединений, таких как белки, углеводы, липиды, витамины, пигменты и другие. Более 1000 биологически активных веществ были выделены из микроводорослей. Среди них соединения, обладающие антиоксидантными, антибактериальными, противовирусными, противоопухолевыми, регенерирующими, гипотензивными, нейропротекторными и иммуностимулирующими эффектами (Gürlek, C. et al. 2019). Биопродукты из микроводорослей могут быть крайне востребованы в различных отраслях: сельское хозяйство, химическая промышленность, энергетика, фармакология и медицина (Bhattacharjee M. 2016).

Тем не менее, получение новых биопродуктов из фотосинтезирующих микроорганизмов сталкивается с рядом проблем:

- ограниченность понимания фундаментальных аспектов метаболизма микроводорослей, требующего применения новых комплексных междисциплинарных подходов;
- сфокусированность на оптимизации свойств известных промышленных штаммов микроводорослей или поиск нового штамма, но в качестве продуцента известного коммерчески успешного биопродукта;

- отсутствие универсальных протоколов культивирования, связанное с огромным числом видов и разнообразием занимаемых экологических ниш;
- низкая воспроизводимость скорости роста и продуктивности штамма в лабораторных и промышленных условиях культивирования.

В связи с этим актуальным является поиск комплексных рентабельных подходов для обнаружения, идентификации и промышленного культивирования микроводорослей-продуцентов ценных соединений.

Такие задачи требуют разработки новых подходов как с точки зрения организации научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, так и с точки зрения промышленного производства.

Ответом на существующие ограничения научно-исследовательского процесса может стать внедрение платформенных решений, интегрирующих в себя различные методы и позволяющие более эффективно решать поставленные задачи. В рамках этого подхода биотехнологические платформы определяются как совокупность технологий, методов и инструментов, которые используются для разработки и производства биопродуктов. Эти платформы могут включать в себя различные подходы, такие как генетическая инженерия, клеточные технологии, методы микробиологии и биохимии (Deep-dive into platform biotech companies: phenotypes, business models, destinations. URL: <https://biodraft.substack.com/p/deep-dive-into-platform-biotech-companies>).

С точки зрения решаемой задачи важнейшими характеристиками биотехнологических платформ являются:

1. Многофункциональность: платформы могут использоваться для разработки различных продуктов - от биотоплива до вакцин. В отличие от традиционных подходов, когда весь процесс настроен на получение одного конкретного продукта, платформенные решения позволяют создавать множество новых соединений, обеспечивая непрерывный поток инноваций.

2. Инновационность: легко интегрируют в себя передовые методы и инструменты, такие как, например, CRISPR для редактирования генома и машинное обучение для анализа больших данных.

3. Гибкость: платформы могут быть адаптированы к различным источникам (известными ранее или неисследованным штаммам) и искомым продуктам (биотопливо и фармацевтические препараты).

4. Междисциплинарность: биотехнологические платформы развиваются на стыке различных дисциплин, таких как микробиология, биохимия, генная инженерия и биоинформатика.

С точки зрения промышленного использования микроводорослей существующие технологические решения разделяются на два типа: ориентированные на низкомаржинальные продукты - использование непосредственно биомассы (флокулянты, кормовые добавки); ориентированные на высокомаржинальные продукты - выделение биологически активных веществ (антиоксиданты, полиненасыщенные жирные кислоты). В тоже время, более перспективным подходом является объединение всех этапов переработки биомассы в непрерывную цепочку, ориентированную на последовательное извлечение целого спектра биопродуктов различной добавочной стоимости (по аналогии с нефтепереработкой). Для достижения экономической эффективности процессы промышленного производства продуктов из биомассы микроводорослей должны отличаться устойчивостью, гибкостью, низкими энергетическими затратами и легкостью адаптации к различным характеристикам штаммов.

Степень разработанности темы исследования

Микроводоросли используют в промышленной биотехнологии уже более пятидесяти лет, при этом потенциал этих микроорганизмов остается в значительной степени не раскрытым как с точки зрения источника новых биологически активных молекул, так и с точки зрения максимизации выхода целевого продукта.

На сегодняшний день для изучения в лабораторных условиях доступно порядка 4500 видов микроводорослей. При этом промышленно культивируется лишь несколько десятков штаммов (Sinetova, M.A. et al. 2020). Большая часть исследований посвящена оптимизации свойств уже известных штаммов-продуцентов. Как правило, речь идет о создании клонотеки мутантов, среди которых путем массового скрининга по определенному генетическому или фенотипическому признаку отбирается лучший. Параллельно с этим проводятся работы по оптимизации условий промышленного культивирования с целью повышения выхода целевого метаболита: минерального состава среды, интенсивности и режима освещения, конструкции фотобиореактора и др.

Для получения оригинальных метаболитов из известных штаммов-продуцентов обычно проводят радикальное изменение параметров культивирования. Под действием экстремальных внешних факторов пластичный метаболизм микроводорослей переключается на синтез оригинальных молекул. Крайне редко удается обнаружить новый дикий штамм-продуцент биологически активных молекул (Georgianna, D. R. et al. 2012). Для этого часто применяют широкомасштабный скрининг культуральной среды или экстрактов оригинальных микроводорослей.

Отдельной проблемой по-прежнему является выделение и идентификация вещества, ответственного за тот или иной биологический эффект (антибактериальный, противоопухолевый, противовоспалительный и др.). Большая часть исследований ограничивается описанием эффектов той или иной фракции (водной или спиртовой, к примеру), что связано с высокими рисками для исследователя: большие денежные и временные затраты, вероятность переоткрыть известную молекулу.

Кроме того, значения продуктивности, получаемые в лабораторных условиях, как правило, не коррелируют с выходом целевого вещества при промышленном культивировании.

На сегодняшний день предсказательная *in silico* аналитика по новым перспективным продуцентам сводится к поиску филогенетически близких штаммов (на основе анализа последовательностей генов 18S рРНК) или анализу научных публикаций и патентов.

На текущем этапе развития биотехнологии микроводорослей большинство предприятий, как правило, сосредоточены на получении монопродукта из биомассы. Вследствие этого разрабатываются технологии, оптимизированные для получения максимальной прибыли от реализации лишь этого вещества.

Цель и задачи исследования

Цель работы - создание биотехнологической платформы для получения биологически активных соединений из фотосинтезирующих микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. изучение биохимического состава штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов продуцентов биотехнологически значимых продуктов;
2. изучение влияния условий культивирования (освещенность и состав среды культивирования) на накопление липидов и пигментов для отдельных представителей микроводорослей;
3. оценка продуктивности выделенных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов в условиях полупромышленного культивирования;
4. изучение возможности использования биомассы выделенных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов в аквакультуре;
5. изучение антимикробных веществ, продуцируемых фотосинтезирующими микроорганизмами;
6. разработка методов широкомасштабного скрининга экстрактов фотосинтезирующих микроорганизмов для выявления биологически активных молекул.

Научная новизна работы

Впервые выделен и охарактеризован наиболее эффективный штамм-продуцент коммерчески значимого антиоксиданта фукоксантина. Определены оптимальные условия культивирования *Mallomonas furcivata* SBV13, позволяющие достичь уровень удельного содержания фукоксантина 26,6 мг/г.

Впервые выделен и охарактеризован наиболее эффективный штамм-продуцент омега-3 эйкозапентаеновой жирной кислоты (ЭПК) - *Vischeria magna* SBV108. Определены оптимальные условия культивирования *Vischeria magna* SBV108, позволяющие достичь содержания ЭПК 46,1 мг/г. Согласно проведенному анализу литературы, *Vischeria magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом ЭПК среди пресноводных и почвенных микроводорослей по показателю удельного содержания (мг/г) в условиях интенсивного культивирования.

Разработан прототип стартерного корма для выращивания мальков красной тилляпии на основе Supreme-15 (Alltech Coppens) и биомассы микроводорослей *Mallomonas furcivata* SBV13 и *Vischeria magna* SBV108. Показано, что добавление 10 % по весу биомассы *Vischeria magna* SBV108, богатой омега-3 эйкозапентаеновой кислотой, улучшает конверсию корма, ростовые характеристики малька, эффективность использования белка и энергии более чем на 20 %.

Впервые из культуральной жидкости микроводоросли *Dunaliella salina* в консорциуме с гетеротрофными микроорганизмами выделен и охарактеризован антибиотик нового класса - этил-3-[(4-метил-пиперазин-1-ил)диазенил]-1H-индол-2-карбоксилат, эффективный против метицилин-резистентного золотистого стафилококка. Разработана методика химического синтеза исходной молекулы (BX-SI001), проведена hit-to-lead оптимизация и доклинические исследования лучшего производного BX-SI043.

Впервые для определения биологической активности и поиска молекулярных мишеней экстрактов из биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов использована технология Онкобокс. Ранее данная платформа использовалась только для предсказания эффективности таргетной противоопухолевой терапии на основе данных транскриптома онкопациента. Потенциал предиктивной аналитики данной технологии был валидирован в отношении цитотоксической активности тотальных экстрактов биомассы микроводорослей и цианобактерий.

При помощи этой технологии разработаны и верифицированы новые подходы для масштабного скрининга экстрактов биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов,

включающие предсказательную аналитику содержания биологически активных соединений.

Предложена оригинальная модель биотехнологической платформы, которая позволяет: осуществлять предсказательную аналитику содержания биологически активных соединений в экстрактах микроорганизмов на основе транскриптомных данных; идентифицировать активные метаболиты; выполнять химическую модификацию метаболитов для улучшения их свойств; осуществлять биотехнологическое производство в полупромышленном масштабе.

Теоретическая значимость и практическая значимость работы.

Выделен и охарактеризован новый штамм зеленой микроводоросли *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11, содержание и состав липидов в котором делает его эффективным сырьем для производства биодизельного топлива. Биодизель является перспективной альтернативой традиционным ископаемым видам топлива благодаря своей экологической чистоте, возобновляемости и способности снижать выбросы парниковых газов по сравнению с традиционными ископаемыми видами топлива. Было показано, что при культивировании в условиях азотного и/или фосфорного голодания происходит увеличение содержания липидов с 17 % до 59 % от сухой биомассы.

B.bullatus MZ-Ch11 превосходит все ранее описанные маслянистые зеленые водоросли и сопоставим с наиболее эффективным промышленным продуцентом липидов *Nannochloropsis oceanica* - 64,3 % сухой биомассы (Mandal, S. et al. 2009), (Wan, C. et al. 2013).

Разработан регламент полупромышленного культивирования *B.bullatus* MZ-Ch11 в закрытом панельном фотобиореакторе Lumian AGS с суммарным полезным объемом до 260 л. Показано, что при двухнедельном культивирования в условиях десятикратного снижения и полного отсутствия в среде нитратов и фосфатов, соответственно, волюметрический выход липидов достигал 80 мг/л/день.

Обнаружен и охарактеризован новый штамм-продуцент коммерчески значимого антиоксиданта фукоксантина *Mallomonas furtiva* SBV13, определены оптимальные условия культивирования, позволяющие достичь содержания фукоксантина 26,6 мг/г сухой биомассы. Благодаря своим антиоксидантным свойствам, фукоксантин активно используется в космецевтике (по уходу за кожей) и нутрицевтике (функциональные добавки).

Разработан регламент полупромышленного культивирования *Mallomonas furtiva* SBV13 в закрытом панельном фотобиореакторе Lumian AGS с суммарным полезным

объемом до 260 л. Показано, что при интенсивности освещения 120 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$, температурном диапазоне от 16 °С до 30 °С, нейтральных рН, концентрации нитратов и фосфатов от 5 до 10 и от 0,5 до 5 ммоль/л, соответственно, волюметрический выход фукоксантина составил 3,7 мг/л/день. Полученные значения сопоставим с аналогичными величинами для волюметрического выхода фукоксантина при полупромышленном и промышленном культивировании *P. tricornutum* (от 7 до 12 мг/л/день) (Guler, B. A. et al. 2019), (Megía-Hervás, I. et al. 2020). На сегодняшний день фукоксантин чаще всего выделяют из бурых водорослей, таких как *Fucus vesiculosus* и *Laminaria japonica*. Однако, содержание этого пигмента в макроводорослях редко превышает 2 % от сухого веса, варьируя от 172 до 720 мг/г.

Анализ литературных данных, а также изучение собственной коллекции микроводорослей (более 200 штаммов, включающих 14 классов) позволил показать, что наиболее перспективными для промышленного производства фукоксантина являются три группы микроводорослей: диатомовые (содержание фукоксантина до 21,67 мг/г сухой массы), *Chrysophyceae* (до 26,6 мг/г сухой массы) и *Prymnesiophyceae* (до 18,23 мг/г сухого веса).

Сравнительный анализ *Mallomonas furcivata* SBV13 с другими промышленными продуцентами фукоксантина (*Phaeodactylum tricornutum* и *Isochrysis aff. Galbana*) показал его преимущества как с точки зрения продуктивности фукоксантина (мг/г сухой биомассы), так и с точки зрения скорости накопления биомассы (г сухой биомассы/ л культуральной среды) (Guler, B. A. et al. 2019).

Охарактеризован новый пресноводный штамм-продуцент омега-3 эйкозапентаеновой кислотой (ЭПК) - *Vischeria magna* SBV108. Эйкозапентаеновая кислота - это полиненасыщенная жирная кислота класса омега-3, обладающая важным значением для здоровья человека, особенно для сердечно-сосудистой системы.

Анализ существующих данных позволяет утверждать, что *Vischeria magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом среди всех почвенных и пресноводных микроводорослей. Содержание ЭПК в биомассе *Vischeria magna* SBV108 составляет 46,1 мг/г сухого веса. Среди солоноводных штаммов только для *Nannochloropsis oceanica* CY2 показано большее содержание ЭПК - 55,7 мг/г сухого веса (Chen C.-Y. et al. 2013).

Показано, что в условиях культивирования *Vischeria magna* SBV108 в закрытом панельном фотобиореакторе Lumian AGS с суммарным полезным объемом до 260 л волюметрическая продуктивность составляет 13,4 мг/л/день. Согласно этим данным, волюметрическая продуктивность *Vischeria magna* SBV108 превышает таковую для *Nannochloropsis oceanica* CY2 почти на 30 % (Chen, C. Y. et al. 2018) и находится в

диапазоне полученных ранее значениях для различных штаммов и условий культивирования (конструкция и полезный объем фотобиореактор): 5,7 - 650 мг/л/день. (Benavides, A. M. S. et al. 2013), (Chen, Y. C. et al. 2015), (Chen, C. Y. et al. 2018), (Nogueira, N. et al. 2020), (Cheng-Wu, Z. et al. 2001).

Поиск новых пресноводных продуцентов ЭПК имеет большое практическое значение, так как их выращивание часто требует меньших затрат на инфраструктуру, пресноводные системы могут быть проще в эксплуатации и менее подвержены коррозии.

В рамках докторской диссертации проведена разработка и тестирование стартерного корма для аквакультуры на основе Supreme-15 (Alltech Coppens) и биомассы микроводорослей-продуцентов эйкозапентаеновой кислоты и фукоксантина. Разработанный прототип корма не менее чем на 20 % эффективнее коммерческих аналогов по всем значимым параметрам: конверсия корма, ростовые характеристики малька, эффективность использования белка и др.

Результаты работы демонстрируют, что микроводоросли, такие как *Vischeria magna* SBV108 и *Mallomonas furcivata* SBV13, могут служить альтернативными источниками белка и полиненасыщенных жирных кислот для аквакультуры. Показано, что добавление 10 % микроводорослей, биомасса которых обогащена эйкозапентаеновой кислотой, более чем на 20 % улучшает показатели роста и эффективность кормления мальков красной тилапии. Исследование биохимических свойств других штаммов микроводорослей может привести к созданию более эффективных и сбалансированных кормов. Результаты работы подчеркивают важность использования микроводорослей как перспективного ингредиента для кормов в аквакультуре, что может привести к улучшению производительности и устойчивости сектора в целом.

Из культуральной жидкости микроводорослей *Dunaliella salina*, зараженных нитчатый грибом *Streptomyces sp.*, выделено оригинальное соединение этил-3-[(4-метилпиперазин-1-ил)дiazенил]-1H-индол-2-карбоксилат (BX-SI001), обладающее антимикробной активностью против ряда грамположительных бактерий, включая метициллин-резистентный золотистый стафилококк (Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*).

Метициллин-резистентный золотистый стафилококк входит в тройку наиболее смертоносных бактерий, став причиной гибели более 100 000 человек в 2019 году (Ranjbar, R. et al. 2022). В России доля устойчивых к антибиотикам штаммов золотистого стафилококка на протяжении последних 10 лет сохраняется в среднем на уровне 40 %.

Соединение BX-SI001 является новым классом антибиотиков и относится к группе 3-триазеноиндолов. Ранее активность 3-триазеноиндолов была изучена против различных

микобактерий, в том числе против их мультирезистентных штаммов. Замещенные 3-триазеноиндолы показали высокую *in vitro* активность против изониазид-резистентного штамма *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium avium* (Патент RU 2724334 С1.2020).

Получена химическая модификация оригинального соединения - ВХ-SI043 (этил-6-фтор-3-[пирролидин-1-ил-азо]-1Н-индол-2-карбоксилат), обладающая высокой активностью (диапазон минимальных ингибирующих концентраций 0,125-0,5 мг/л) в отношении 41 штамма MRSA с множественной лекарственной устойчивостью и относительно низкой цитотоксичностью *in vitro* (индекс селективности 76). Соединение ВХ-SI043 обладает низкой токсичностью при внутрижелудочном (> 600 мг/кг) введении крысам. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 вещество ВХ-SI043 можно отнести к 3-му классу умеренно опасных веществ и рекомендовать для дальнейшего исследования эффективности на крысах на модели инфекции кожи и мягких тканей, вызванной MRSA.

Новизна технических решений подтверждена 3 патентами РФ.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Биотехнологическая платформа, позволяющая: (1) проводить широкомасштабный скрининг экстрактов микроорганизмов; (2) делать предсказательную аналитику содержания биологически активных соединений в экстрактах; (3) идентифицировать активные метаболиты; (4) проводить их биотехнологическое получение в полупромышленном масштабе; (5) проводить химическую модификацию метаболитов с целью улучшения их свойств.

2. Валидированная методика определения биологической активности и поиска молекулярных мишеней экстрактов из фотосинтезирующих микроорганизмов с помощью технологии Онкобокс.

3. Разработанный на основе метаболита микроводоросли *Dunaliella salina* антибиотик нового класса эффективен против метицилин-резистентного золотистого стафилококка. Доклинические исследования острой токсичности на крысах позволяют отнести соединение к третьему классу токсичности (умеренно токсичному).

4. *Mallomonas furtiva* SBV13 штамм-продуцент, коммерчески значимого антиоксиданта фукоксантина, содержит 26,6 мг фукоксантина/г сухой биомассы, что является наибольшей известной концентрацией этого соединения в биомассе.

5. *Vischeria magna* SBV108, штамм-продуцент омега-3 полиненасыщенной жирной кислоты (ЭПК), содержит 46,1 мг ЭПК/г сухой биомассы, что является наибольшей известной концентрацией среди пресноводных микроводорослей.

6. Использование микроводорослей *Vischeria magna* SBV108 и *Mallomonas furcivata* SBV13 в составе стартового корма для мальков красной тилапии позволило не менее чем на 20 % повысить эффективность корма по сравнению с коммерческим аналогом по наиболее значимым параметрам: конверсия корма, ростовые характеристики малька, эффективность использования белка и энергии.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является обобщением результатов теоретических и экспериментальных исследований, выполненных в период с 2013 по 2024 гг. автором непосредственно и в сотрудничестве с коллегами. Личный вклад автора включает постановку целей и задач исследований; разработку методологии проведения исследований; планирование и участие в проведении экспериментов; анализ полученных экспериментальных данных и их сопоставление с мировыми данными; подготовку научных отчетов и рукописей; обобщение результатов, формулировку выводов. Определение жирнокислотного и пигментного составов биомассы микроводорослей осуществлялось на базе Кафедры физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина» (г. Москва). Эксперименты по выращиванию красной тилапии выполнялись на базе кафедры Аквакультуры и водных биоресурсов ФГБУ ВО Астраханского Государственного Технологического Университета (АГТУ) (г. Астрахань). Получение синтетических аналогов субстанции VX-SI001 проводили на базе Отдела биомолекулярной химии ГНЦ ИБХ РАН (г. Москва). Изучение фармакокинетических показателей субстанции VX-SI043 *in vitro* проводили совместно с ООО «НИИ ХимРар» (г. Москва). Изучение острой токсичности лидирующей субстанции VX-SI043 *in vivo* проводили совместно с ООО «Институт доклинических исследований» (Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский).

Апробация результатов

Материалы диссертации доложены и обсуждены на многочисленных отечественных и международных научно-практических мероприятиях:

- VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 18-20 марта 2014 года);
- XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 09-12 февраля 2015 года);

- 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 Starup 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);
- V международная конференция для технологических предпринимателей Starup Village 2017 (г. Москва, 06-07 июня 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);
- 20-я Российская агропромышленная выставка «Золотая осень» (г. Москва, 10-13 октября 2018 года);
- 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever (г. Прага (Чехия), 07-12 июля 2018 года);
- XXXI зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 11-14 февраля 2019 года);
- Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 25-27 февраля 2019 года);
- Международная промышленная выставка «Иннопром» (г. Екатеринбург, 07-10 июля 2024 г.).

Публикации

По результатам, полученным в диссертационной работе, опубликованы 9 публикаций в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, входящих в перечень

изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, Российского индекса научного цитирования, а также индексируемых «Web of Science» и «Scopus». В изданиях, входящих в список журналов «Web of Science» первого квартиля (Q1) опубликовано 3 статьи, входящих в список журналов второго квартиля (Q2) - 6 статей. Опубликовано 1 глава в монографии, зарегистрировано 3 патента РФ.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, семи глав, заключения, списка литературы из 566 наименований, 10 приложений. Общий объем диссертации составляет 306 страниц, включает 58 рисунков и 45 таблиц.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР. СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, БАЗИРУЮЩЕЙСЯ НА НОВЫХ ПОДХОДАХ К ПОЛУЧЕНИЮ ЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ СОЕДИНЕНИЙ С ВЫСОКОЙ ДОБАВОЧНОЙ СТОИМОСТЬЮ

1.1 Обзор и краткая систематика микроводорослей

Биологический термин «водоросли» («algae») охватывает обширную и разнообразную группу первичных фототрофов, включая прокариотические организмы, такие как цианобактерии (традиционно, сине-зеленые водоросли) и собственно микроводоросли, которые относятся к эукариотам (золотистые, диатомовые, желто-зеленые, красные, эвгленовые, динофитовые, зеленые и другие микроскопические водоросли). Многие микроводоросли способны переключаться на гетеротрофный и миксотрофный типы питания, а также выживать в условиях отсутствия кислорода. Цианобактерии и микроводоросли широко распространены в природе и обитают практически во всех экологических нишах: морских, солоноватых и пресных водоемах, горячих источниках, льдах, почве, литосфере и воздухе. Входя в состав различных экосистем, они взаимодействуют с другими живыми компонентами через широкий спектр прямых и косвенных межвидовых отношений. Водоросли имеют огромное значение в биосфере. Они являются первичными продуцентами органики в Мировом океане. Сейчас известно, что на долю Мирового океана выпадает половина всего производства первичной продукции, выражающаяся в количестве фиксированного углерода. С водорослей начинаются практически все морские и пресноводные трофические цепочки. На долю водорослей приходится как минимум половина всей кислородной продукции биосферы (это намного больше, чем вклад наземных лесов).

Водоросли различаются по размеру: от микрометров до нескольких десятков метров. Более крупные - макроводоросли, обычно видны невооруженным глазом. Самые маленькие - микроводоросли, представляют собой одноклеточные микроскопические организмы, которые могут встречаться отдельно или в колониях.

Согласно современной классификации микроводоросли относятся к четырем из семи царств (Рисунок 1).

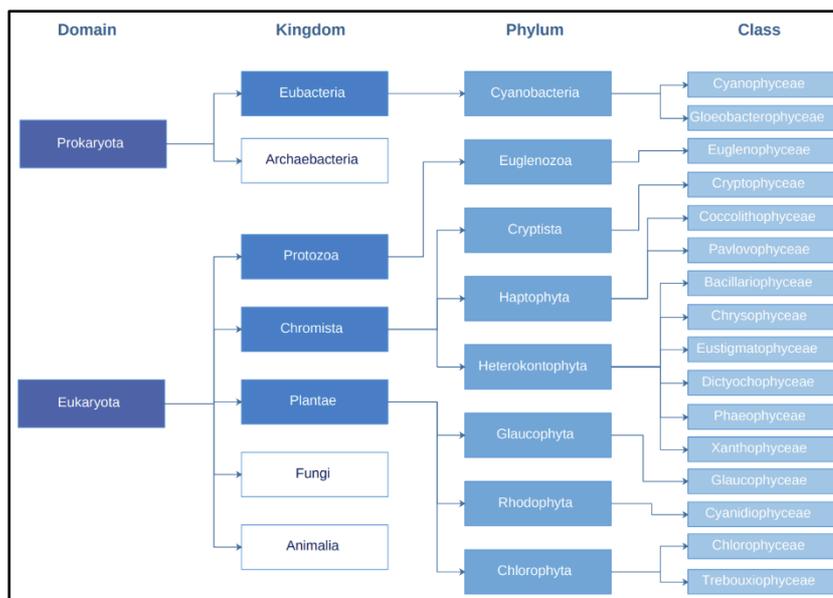


Рисунок 1 - Систематика микроводорослей и цианобактерий (Ruggiero, M. A. et al. 2015).

Внутри этой группы фотосинтетические микроорганизмы можно разделить на эукариотические, включающие следующие типы: *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Glaucophyta*, *Heterokontophyta*, *Haptophyta*, *Cryptista*, *Euglenozoa* и прокариотические, которые еще называют сине-зелеными микроводорослями или цианеями (*Cyanobacteria*) (Dolganyuk, V. et al. 2020). По отсутствию оформленного ядра цианеи относятся к бактериям, а по наличию хлорофилла и способности синтезировать молекулярный кислород - объединяются в функциональную группу к растениям (Stark, M. et al. 2012).

Традиционно микроводоросли классифицируют в соответствии с типом их фотосинтетических пигментов. К примеру, красные водоросли содержат хлорофиллы a, b и d, каротины, ксантофилы, а также пигменты из группы билипротеинов: синие - фикоцианин и аллофикоцианин, красный - фикоэритрин. Однако современная систематика учитывает и другие критерии, среди которых цитологические и морфологические признаки, биохимический состав клеточной стенки и продуктов запасания. К примеру, для зеленых микроводорослей характерно многообразие форм: одноклеточные, нитчатые, колониальные. У представителей этой группы представлены все типы дифференциации слоевища: монадная, коккоидная, пальмеллоидная, нитчатая, пластинчатая, сифональная. В качестве запасющих веществ микроводоросли способны накапливать широкий спектр различных соединений (Metting, F. B. et al. 1996):

- красные микроводоросли - флоридский крахмал,
- зелёные микроводоросли - инулинподобные фруктозолигосахариды,

- криптофитовые микроводоросли и динофлагелляты - α -(1-4)-глюкан,
- золотистые - липиды или хризоламинарин,
- диатомовые - хризоламинарин,
- эвгленовые и примнезиальные микроводоросли - парамилон: β -(1-3)-d -глюкан.

Ключевую роль в систематике сегодня играют методы молекулярной идентификации (Groendahl, S. et al. 2017). В последнее время все чаще применяют полуавтоматическую или полностью автоматизированную классификацию с использованием проточного цитометра в сочетании с методами компьютерного зрения и машинного обучения (Drews, P. et al. 2013). Классификация этой группы микроорганизмов сложна, и таксономия часто подвергается пересмотрам вследствие развития методов молекулярной филогении (Palinska, K. A. et al. 2014).

По оценкам экспертов, всего насчитывается от 200 до 800 тысяч видов микроводорослей и цианобактерий (Guiry, M. D. 2012). В настоящее время в базе данных Algaebase (Listing the World's Algae. 2024. URL: <https://www.algaebase.org/>) описано 176 тысяч видовых и внутривидовых названий. Микроводоросли способны быстро расти и жить в широком диапазоне экологических ниш (Dolganyuk, V. et al. 2020).

В то время как подавляющее большинство видов микроводорослей относится к домену *Eukaryota* и распределено по семи основным типам, в домене *Prokaryota* существует только один тип микроводорослей, объединенных под названием цианобактерии. При этом по числу видов цианобактерии крайне многочисленны и сопоставимы с зелеными и охрофитовыми микроводорослями (Venkatesan, J. et al. 2015). При том что цианобактерии демонстрируют огромное биоразнообразие, геном лишь небольшой части описанных видов был секвенирован (Dvorak, P. et al. 2017). Эти микроорганизмы могут быть одноклеточными (*Chroococcus*) или многоклеточными (*Arthrospira*), быть почти бесцветными или интенсивно пигментированными, автотрофными или гетеротрофными, психрофильными или термофильными, ацидофильными или алкалофильными, планктонными или барофильными, обитающими в пресной воде или морской среде, включая гиперсоленые среды (солончаки). Они представляют собой филогенетически связанную группу эволюционно древних фототрофных грамотрицательных бактерий (Garcia-Pichel, F. 2009). Цианобактерии не содержат хлоропластов и способны накапливать крахмал и липиды. Цианобактерии также называют сине-зелеными водорослями из-за присутствия хлорофилла и фикоцианина, расположенных в мембранных пузырьках, называемых тилакоидами, которые придают клеткам синеватый цвет, когда присутствуют в достаточно высоких концентрациях. В отличие от эукариотических организмов, цианобактерии размножаются вегетативным, бесполом путем, половое размножение у них

полностью отсутствует. Наиболее распространенным способом размножения среди цианей является обычное бинарное деление. Кроме того, у них есть определенные специализированные структуры, такие как акинеты, гормогонии, гормоцисты и споры, которые частично участвуют в процессе размножения (Dvorak, P. et al. 2017).

1.2 Биотехнологический потенциал фотосинтезирующих микроорганизмов

Фотосинтезирующие микроорганизмы могут рассматриваться как ценный биологический ресурс, в связи с чем в последние годы их изучению уделяется особое внимание. Из-за большого видового разнообразия микроводорослей, их высокой метаболической пластичности и значительно различающихся условий культивирования их реальный биотехнологический потенциал до сих пор не раскрыт. Их значение для глобальной биоэкономики определяется возможностью применения продуктов на основе биомассы микроводорослей в самых разных сферах: от сельского хозяйства до медицины, от биотоплива до иммуностимуляторов (de Morais, M. G., et al. 2015), (Thajuddin, N. et al. 2005) (Таблица 1).

Таблица 1 - Области применения фотосинтезирующих микроорганизмов.

Вид микроводорослей	Фармацевтика	Косметика	Пища	Материалы	Корм	Удобренность	Биотопливо	Источники
<i>Nannochloropsis</i>	+	+			+	+	+	(Zilliges, Y. et al. 2014), (Boyle, N. R. et al. 2017), (Dineshkumar, R. et al. 2018), (Zuñiga, C. et al. 2018), (Sathasivam, R., et al. 2019), (Señoráns, M. et al. 2020), (Polaris Market Research. 2024. URL: https://www.polarismarketresearch.com/)
<i>Chlorella</i>	+	+	+	+	+	+	+	(Oliver, L. et al. 2020)
<i>Dunaliella</i>	+				+			(Rastogi, R. P. et al. 2017)

<i>Isochrysis</i>	+				+			(Señoráns, M. et al, 2020), (Polaris Market Research. 2024. URL: https://www.polarismarketresearch.com/)
<i>Phaeodactylum</i>	+							(Bwapwa, J. K. et al. 2017)
<i>Haematococcus</i>	+	+			+			(Yoon, B. K. et al. 2018)
<i>Cryptocodinium</i>	+							(McWilliams, A. 2018)
<i>Scenedesmus</i>	+	+		+		+	+	(Dineshkumar, R., et al. 2018), (Sathasivam, R. et al. 2019), (Onen Cinar, S. et al. 2020)
<i>Muriellopsis</i>	+							(Oliver, L. et al. 2020)
<i>Neochloris</i>				+				(Dixon, C. et al. 2018)
<i>Schizochytrium</i>					+			(Dineshkumar, R. et al. 2018)
<i>Chlamydomonas</i>								(Ronga, D. et al. 2019)
<i>Pavlova</i>			+					(Soares, A. T. et al. 2016)
<i>Tetraselmis</i>			+					(Zanella, L. et al. 2020)
<i>Stichococcus</i>			+					(Zanella, L. et al. 2020)

Биологически активные вещества из микроводорослей обладают антиоксидантным, антибактериальным, противовирусным, противоопухолевым, регенерирующим, гипотензивным, нейропротекторным и иммуностимулирующим действием. Биомасса микроводорослей является перспективным источником как пищевых, так и функциональных добавок (Таблица 2).

Таблица 2 - Содержание различных продуктов в фотосинтезирующих микроорганизмах.

Вид продуктов	Вид микроводорослей	Концентрация	Источники
Фармацевтические продукты		% от сухой биомассы	
	<i>Nannochloropsis</i>	12,74 ± 1,84	(Ryckebosch, E. et al. 2014)

Эйкозопентаеновая кислота (ЭПК)	<i>Isochrysis</i>	12,74 ± 1,84	(Ryckebosch, E. et al. 2014)
	<i>Phaeodactylum</i>	22,4 - 31,4	(Hamilton, M. L. et al. 2015)
Докозагексаеновая кислота (ДГК)	<i>Cryptocodinium</i>	до 43,5	(Pierre, G. et al. 2019)
Бета-каротин	<i>Chlorella</i>	0,1 - 2,0	(Berman, G. J. et al. 2014)
	<i>Chlamydomonas</i>	0,1 - 2,0	(El-Mekkawi, S. A. et al. 2019)
	<i>Dunaliella</i>	до 14	(Olaizola, M. 2008)
Астаксантин	<i>Haematococcus</i>	3,8	(Ambati, R. R. et al. 2019)
	<i>Chlorococcum</i>	0,2	(Pierre, G. et al. 2019)
	<i>Neochloris</i>	0,6	(Pierre, G. et al. 2019)
Косметические продукты		г/л культуральной среды	
Полисахариды	<i>Chlorella</i>	1,8 г/л	(Pierre, G. et al. 2019)
	<i>Botryococcus</i>	до 1,8 г/л	(Pierre, G. et al. 2019)
Пищевые добавки		% от сухой биомассы	
Белки	<i>Chlorella</i>	51 - 58	(Andrade, L. M. et al. 2018)
Витамины		мг/кг сухого веса	
Рибофлавин (В2)	<i>Pavlova</i>	до 50	(Ambati, R. R. et al. 2019)
Пантотеновая кислота (В5)	<i>Tetraselmis</i>	37,7	(Ambati, R. R. et al. 2019)
Пиридоксин (В6)	<i>Stichococcus</i>	17	(Ambati, R. R. et al. 2019)
Кобаламин (В12)	<i>Chlorella</i>	0,6	(Paniagua, M. et al, 2015)
	<i>Dunaliella</i>	0,7	(Paniagua, M. et al, 2015)

На настоящем этапе развития отрасли большинство предприятий по биопереработке микроводорослей, как правило, сосредоточены на получении одного конкретного компонента из биомассы. Вследствие этого, разрабатываются технологии, оптимизированные для получения максимальной прибыли от реализации лишь этого вещества. При этом в базовой постановке задачи по разработке технологий целесообразно рассматривать вопрос о выращивании биомассы с таким соотношением целевых компонентов, которые можно эффективно извлечь современными методами в порядке убывания их стоимости.

1.2.1 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник белка

Фотосинтезирующие микроорганизмы могут быть рассмотрены как перспективный источник белка. Общее содержание полипептидов колеблется от 30 % до 70 % от сухого веса в зависимости от вида микроводорослей (Ejike, C. E.C.C. et al. 2017). Белок накапливается как в цитоплазме, так и в хлоропластах (пиреноид и фикобилипротеины). У цианобактерий основным местом запасания белка являются тилакоиды (Safi, C. et al. 2014).

Аминокислотный состав белков микроводорослей достаточно разнообразен и по биологической ценности не уступает белкам животного происхождения (Barka, A. et al. 2016). Аминокислотный состав *Arthrospira platensis* включает лейцин, валин, изолейцин, фенилаланин, метионин, цистеин и тирозин. Белки микроводорослей *Porphyridium cruentum*, *Haematococcus pluvialis* и *Nannochloropsis gaditana* содержат аспарагиновую кислоту, треонин, серин, глутаминовую кислоту, глицин, аланин, цистеин и валин. В белках диатомовых микроводорослей основными аминокислотами являются серин, аланин, аргинин, лейцин, глицин, аспартат и треонин. А в биомассе *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii* и *Scenedesmus obliquus* незаменимые аминокислоты цистеин и аргинин составляют около 44,7 % от всех аминокислот (Templeton, D. W. et al. 2015), (Lim, A. S. et al. 2018a). Биомасса штаммов родов *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Porphyridium*, *Isochrysis*, и *Nannochloropsis* богата метионином, который отсутствует в большинстве растительных источников белка (Wan, L. et al. 2019).

1.2.2 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник липидов

Фотосинтезирующие микроорганизмы являются продуцентами различных липидов: триацилглицериды, фосфолипиды, гликолипиды или фитостеролы, содержание которых колеблется от 20 % до 50 % от сухого веса. В составе липидов могут встречаться различные жирные кислоты длиной от 12 до 24 углеродных атомов. Кроме того, микроводоросли способны синтезировать моно- и полиненасыщенные жирные кислоты. Микроводоросли используют липиды в качестве источника энергии, строительных компонентов внешних и внутренних мембран, витаминов, сигнальных молекул и др. (Sprague, M. et al. 2017).

Содержание липидов, наличие и положение двойных связей в углеродной цепи жирных кислот варьирует от штамма к штамму и в значительной мере зависит от условий культивирования. К примеру, одни и те же микроводоросли в условиях слабого освещения будут накапливать полярные липиды, а в условиях интенсивного освещения и недостатка

азота и фосфора - нейтральные. Первые будут преимущественно включаться в мембрану, тогда как вторые оставаться в цитоплазме.

Многие микроводоросли способны накапливать коммерчески значимые полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), предшественником которых является насыщенная пальмитиновая кислота (Villarruel-Lopez, A. et al. 2017). Наиболее важными омега-3-полиненасыщенными жирными кислотами являются альфа-линоленовая кислота (АЛК), эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) и докозагексаеновая кислота (ДГК). Организм человека практически не способен синтезировать эти жирные кислоты. Омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты необходимы человеку для нормального развития центральной нервной системы, снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний, обладают противовоспалительными и др. эффектами (Bellou, S. et al. 2014).

Большинство микроводорослей с высоким содержанием омега-3-полиненасыщенные жирных кислот относятся к морским видам, например, *Schizochytrium sp.* и *Nannochloropsis sp.* Однако пресноводные виды, например, *Desmodesmus sp.*, также могут быть рассмотрены в качестве продуцента ЭПК и ДГК-кислот (Sprague, M. et al. 2017), (Ferreira, G. F. et al. 2019). Тем не менее доказано, что пресноводные штаммы микроводорослей накапливают ПНЖК менее эффективно.

Поскольку человеческий организм не способен вырабатывать ряд незаменимых жирных кислот, их необходимо получать с пищей или в составе различных пищевых добавок. Пищевые добавки часто получают из рыбы и рыбьего жира. Однако, было показано, что многие виды жирной рыбы могут содержать следы тяжелых металлов, вызывающие нейротоксические эффекты. В связи с возросшим в современном мире интересом к вегетарианской и веганской диете, микроводоросли могут стать альтернативным источником этих пищевых добавок.

В зависимости от условий культивирования состав жирных кислот в одних и тех же видах микроводорослей может варьировать. Например, в одной из работ было изучено влияние фотопериода на жирнокислотный профиль микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus obliquus* (Scharff, H. et al. 2017). Авторы обнаружили, что более продолжительные фотопериоды (24:0, 22:2, 20:4) могут снижать синтез α -линоленовой кислоты и повышать синтез линолевой кислоты. В других исследованиях был получен частично обратный результат: содержание линолевой и α -линоленовой кислот увеличивалось вместе с увеличением интенсивности освещения (Sarat Chandra, T. et al. 2017).

При изучении влияния различных концентрациях железа и CO₂ на содержание липидов и их жирнокислотный состав у микроводоросли *Chlorella vulgaris* Beij было

показано, что наиболее интенсивный рост биомассы (460 ± 10 мг/л) наблюдался при концентрации железа - $4,8 \times 10^{-5}$ моль/л и при концентрации CO_2 - 2 %. В тоже время, максимальное содержание липидов ($27 \pm 0,8$ %) при той же концентрации углекислого газа - было при меньшем содержании железа ($2,4 \times 10^{-5}$ моль/л) (Liu, J. et al. 2018).

В другом исследовании на модели микроводоросли *Dunaliella salina* было показано, что увеличение концентрации атмосферного CO_2 с 0,01 % до 12,0 % приводит к 20-кратному повышению содержания липидов в биомассе (Ramírez-López, C. et al. 2016).

Минеральный состав культуральной среды может оказывать значительное влияние на качественный и количественный состав липидов. В экспериментах с *Chlorella vulgaris* было показано, что, варьируя содержание нитрата натрия, бикарбоната аммония, гептагидрата сульфата магния, дигидрофосфата калия, дикалийфосфата и диаммонийфосфата, можно повысить содержание липидов на 85 %, с одновременным увеличением продуктивности биомассы на 40 % (Josephine, A. et al. 2015). Также было показано, что азотное голодание способствует синтезу большего количества ненасыщенных жирных кислот, чем насыщенных.

Результаты исследований состава жирных кислот различных микроводорослей и цианобактерий приведены в Таблице 3. (Bellou, S. et al. 2014), (Abd El Baky, H. H. et al. 2014), (Josephine, A. et al. 2015), (Ramírez-López, C. et al. 2016), (Sprague, M. et al. 2017), (Scharff, H. et al. 2017), (Sarat Chandra, T. et al. 2017), (Choi, Y. K. et al. 2017), (Liu, J. et al. 2018), (Ferreira, G. F. et al. 2019).

Таблица 3 - Результаты исследования жирнокислотного состава липидной фракции различных микроводорослей и цианобактерий.

Жирные кислоты *	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Botryococcus braunii</i>	<i>Neochloris cohaerens</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
C14:0	$1,15 \pm 0,03$	$2,21 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,01$	-	-
C14:1	-	-	-	$2,38 \pm 0,07$	$2,39 \pm 0,07$
C15:0	-	$10,92 \pm 0,34$	$0,13 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,02$	$1,05 \pm 0,03$
C16:0	$13,65 \pm 0,47$	-	$20,48 \pm 0,61$	$17,25 \pm 0,51$	$16,18 \pm 0,48$
C16:1	$1,23 \pm 0,03$	$5,04 \pm 0,15$	$2,79 \pm 0,08$	-	$1,71 \pm 0,05$
C16:2	$1,84 \pm 0,05$	$2,76 \pm 0,08$	-	$3,13 \pm 0,09$	-
C16:3	-	$4,93 \pm 0,14$	$0,21 \pm 0,01$	-	$37,87 \pm 1,13$
C17:0	$2,19 \pm 0,06$	$21,54 \pm 0,70$	$0,15 \pm 0,01$	$1,64 \pm 0,04$	$4,34 \pm 0,12$
C17:1	-	-	-	$21,28 \pm 0,63$	$0,59 \pm 0,01$

C18:0	38,51 ± 1,21	-	42,97 ± 1,31	42,81 ± 1,28	-
C18:1	16,79 ± 0,55	14,68 ± 0,44	-	-	22,26 ± 0,66
C18:2	7,02 ± 0,20	-	8,03 ± 0,23	6,29 ± 0,21	8,27 ± 0,25
C18:3	1,47 ± 0,04	6,42 ± 0,12	3,06 ± 0,09	1,73 ± 0,04	3,78 ± 0,10
C20:0	1,22 ± 0,03	7,18 ± 0,21	4,44 ± 0,13	-	-
C22:0	-	4,29 ± 1,84	-	-	0,52 ± 0,01
C22:5	1,12 ± 0,03	-	0,38 ± 0,01	1,31 ± 0,03	1,49 ± 0,04
C22:6	7,87 ± 0,23	17,51 ± 0,51	-	-	-
C24:0	-	-	15,19 ± 0,48	-	0,56 ± 0,01
C24:1	-	-	0,23 ± 0,01	0,68 ± 0,02	-

* данные приведены как % от общего количества липидов, C14:0 - миристиновая кислота, C14:1 - миристолеиновая кислота, C15:0 - пентадекановая кислота, C16:0 - пальмитиновая кислота, C16:1 - пальмитолеиновая кислота, C16:2 - гексадекадиеновая кислота, C16:3 - гексадекатриеновая кислота, C17:0 - гептадекановая кислота, C17:1 - цис-10-гептадеценная кислота, C18:0 - стеариновая кислота, C18:1 - олеиновая кислота, C18:2 - линолевая кислота, C18:3 - линоленовая кислота, C20:0 - арахиновая кислота, C22:0 - бегеновая кислота, C22:5 - докозапентаеновая кислота, C22:6 - докозагексаеновая кислота, C24:0 - лигноцериновая кислота, C24:1 - нервоновая кислота.

1.2.3 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник полисахаридов

Полисахариды микроводорослей находят применение в фармацевтике и косметологии (в основном экзополисахариды), а также в качестве сырья для производства биоэтанола (в основном внутриклеточный крахмал) (Dixon, C. et al. 2018). В Таблице 4 приведено содержание углеводов в биомассе различных штаммов микроводорослей.

Таблица 4 - Содержание углеводов в биомассе различных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов.

Фотосинтезирующие микроорганизмы	Содержание углеводов (% от сухого веса)
<i>Botryococcus braunii</i>	27,36 ± 0,76
<i>Haematococcus pluvialis</i>	21,95 ± 0,74
<i>Scenedesmus obliquus</i>	13,69 ± 0,34
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	15,34 ± 0,51
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	12,48 ± 0,34
<i>Neochloris cohaerens</i>	12,58 ± 0,34
<i>Chlorella vulgaris</i>	12,23 ± 0,33

Один из гетерополисахаридов, выделенных из биомассы *Chlorella sp.*, продемонстрировал значительную антиоксидативную активность. Этот гетерополисахарид был обогащен остатками рамнозы, арабинозы, глюкозы и галактозы (Song, H. et al. 2018).

Показано, что полисахариды из микроводоросли *Chlorella sorokiniana* индуцируют секрецию интерлейкина 12, который активирует естественные клетки-киллеры и способствуют дифференцировке Т-хелперов. Ряд полисахаридов из микроводорослей обладают противовирусной и противоопухолевой активностями (Chou, N. T. et al. 2012).

Авторы другого исследования выделили и идентифицировали водорастворимые полисахариды из микроводоросли *Chlorella vulgaris*, обладающие активностью против ряда фитопатогенов (El-Naggar, N. EA. et al. 2020).

При этом свойства большинства полисахаридов микроводорослей до конца не изучены. Было исследовано 166 видов морских микроводорослей и цианобактерий с целью выявления штаммов, продуцирующих оригинальные экзополисахариды (Gaignard, C. et al. 2019). В результате исследователи выделили сорок пять штаммов, продуцирующих оригинальные и ранее не изученные экзополисахариды.

1.2.4 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник пигментов

Микроводоросли содержат различные типы пигментов: каротиноиды, ксантофиллы, фикобилины и хлорофиллы. При этом содержание различных каротиноидов и хлорофилла в микроводорослях обычно выше, чем у высших растений (Koller, M. et al. 2014).

Каротиноиды могут накапливаться в строме хлоропласта или цитоплазме в виде масляных капель. Каротиноиды в отличие от хлорофиллов поглощают свет в сине-зеленой области 350-550 нм. Это особенно важно для водных морских и океанических видов водорослей, которые в их естественной среде хорошо обеспечены сине-зеленым, но не красным светом вследствие его сильного поглощения водной средой (Koller, M. et al. 2014). В сине-зеленой области спектра каротиноиды более эффективны в собирании света, чем хлорофиллы, что определяется их высокой концентрацией и эффективной миграцией энергии на хлорофилл. Кроме того, каротиноиды защищают клетки микроводорослей от действия свободных радикалов. Основными каротиноидами микроводорослей являются β -каротин, ликопин, астаксантин, зеаксантин, виолаксантин и лютеин. При этом наиболее изученным среди них являются β -каротин, лютеин и астаксантин (D'Alessandro, E. B. et al. 2016).

Содержание каротиноидов в микроводорослях не более 0,5 % от сухого веса, но при определенных условиях может увеличиваться более чем в 40 раз (Mulders, K. J.M., et al. 2013).

Фикобилины (фикоцианин и фикоэритрин) обнаружены в строме хлоропластов цианобактерий, красных водорослей, глаукофитовых и некоторых криптофитовых. Отношение количества фикоэритринов и фикоцианинов зависит от спектрального состава света в среде обитания водорослей: преобладание зелёного света в освещении при росте на глубине вследствие поглощения водой красного участка спектра ведет к синтезу поглощающего в этом участке спектра фикоэритрина, при достаточном красном освещении у поверхности воды преобладает синтез фикоцианинов. Фикобилины хорошо растворимы в воде и широко используются в качестве пищевых красителей в промышленности и в качестве флуоресцентных маркеров в научных исследованиях (Koller, M. et al. 2014).

Хлорофиллы - это жирорастворимые зеленые пигменты микроводорослей, с помощью которого они улавливают энергию солнечного света и осуществляют фотосинтез (Cuellar-Bermudez, S. P. et al. 2015). Содержание хлорофилла в микроводорослях колеблется от 0,5 % до 1,0 % от сухого веса, в основном это хлорофилл *a*, однако некоторые микроводоросли, например, динофита, также содержат хлорофилл *b* и *c* (D'Alessandro, E. B. et al. 2016).

Для получения большего количества пигментов проводятся исследования по увеличению продуктивности микроводорослей. Было показано, что микроводоросли *Chlorella protothecoides* и *Chlorella vulgaris* адаптируются к интенсивному освещению (400 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) путем накопления ксантофильных пигментов, главным образом, зеаксантина (Grudzinski, W. et al. 2016). Другие исследователи изучали влияние стрессовых условий на выход каротина у микроводоросли *Dunaliella salina* и оценивали антиоксидантную и цитотоксическую активность полученных экстрактов. Стрессовые условия были созданы путем изменения концентраций минеральных солей, азота и температуры. Самый высокий выход β -каротина ($115,5 \pm 0,4$ мкг/мл) был получен при концентрации NaCl и KNO_3 - 2,5 М и 0,5 г/л, соответственно (Singh, P. et al. 2016), (Sathasivam, R. et al. 2018).

Помимо этого, ряд исследователей пытается повысить эффективность экстракции пигментов из биомассы микроводорослей. На примере *Desmodesmus sp.* было продемонстрировано, что выход лютеина и β -каротина из биомассы может быть существенно повышен за счет комбинации методов ультразвуковой экстракции и применения различных растворителей (Soares, A. T. et al. 2016). Предварительное воздействие импульсными электрическими полями на *Nannochloropsis oceanica* и

последующая экстракция сверхкритическим CO₂ приводила к значительному увеличению выхода исследуемых пигментов (Pataro, G. et al. 2019).

1.2.5 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник витаминов

Фотосинтезирующие микроорганизмы также являются источником целой группы витаминов: А, В1, В2, В6, В12, С, Е, биотина, фолиевой кислоты, пантотеновой кислоты и др. Например, *Isochrysis galbana* является коммерчески значимым источником витаминов А и Е, фолиевой, никотиновой и пантотеновой кислот, биотина, тиамина, рибофлавина, пиридоксина, кобаламина (Mulders, K. JM. et al. 2013).

Витамин В12 содержится в продуктах животного происхождения и отсутствует в растительных продуктах. Дефицит витамина В12 часто наблюдается у людей, придерживающихся веганской или вегетарианской диеты. Показано, что микроводоросли *Chlorella sp.* и *Pleurochrysis carterae* могут стать дополнительным источником витамина В12 (Kumudha, A. et al. 2015).

Ряд микроводорослей способны синтезировать витамин Е, например, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros calcitrans* и *Porphyridium cruentum*. При этом, содержание этого витамина в биомассе может быть значительно выше, чем у высших растений (Santiago-Morales, I. S. et al. 2018).

Ввиду достаточно небольшого эффективности выделения витаминов предпринимаются многочисленные попытки увеличения удельной продуктивности микроводорослей. В экспериментах на *Skeletonema marinoi* было показано, что с увеличением интенсивности ультрафиолетового излучения содержание витамина С в микроводорослях увеличивается (Smerilli, A. et al. 2017). Используя ультразвук и различные растворители, удалось повысить эффективность экстракции биологически активных веществ (витаминов Е, В, С и пигментов) из биомассы *Haematococcus pluvialis* и *Phaeodactylum tricornutum* до 80 % (Papadaki, S. et al. 2017).

1.2.6 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник биологически активных молекул

1.2.6.1 Противоопухолевые соединения

Фотосинтезирующие микроорганизмы представляют собой многообещающий источник противоопухолевых соединений, которые могут быть использованы в качестве природных средств для борьбы с раком. Исследования показывают, что различные виды микроводорослей содержат биоактивные соединения, обладающие цитотоксическими и антипролиферативными свойствами.

Противоопухолевые свойства экстрактов из биомассы микроводорослей могут иметь различную природу (Abd El-Nack, M. E. et al. 2019). К примеру антиоксиданты, содержащиеся в микроводорослях, могут нейтрализовать свободные радикалы, что снижает окислительный стресс и последующее повреждение ДНК клеток.

На сегодняшний день показано, что альгинаты, фукоидан, зостерин, уникальные сульфатированные полисахариды и пептиды микроводорослей обладают противоопухолевой активностью (Galasso, C. et al. 2019). Была описана антипролиферативная активность полисахаридов водоросли *Porphyridium cruentum* (Gardeva, E. et al. 2009). В частности, 10 мг/кг экстракта смогли снизить *in vivo* рост миелоидной опухоли у хомяков. Тем не менее, при обработке 100 мкг/мл экстракта полисахарида первичная культура этих опухолевых клеток показала высокий процент смертности.

Сульфатированные полисахариды *Tribonema sp.* индуцировали апоптоз клеток линии HepG (рак печени) (Chen, X. et al. 2019b). В другой работе были изучены противоопухолевые эффекты эфиров различных жирных кислот и спирта из штамма *Phaeodactylum tricornutum Bohlin*. Суспензионная опухолевая клеточная линия лейкемии человека HL-60 оказалась ожидаемо более чувствительной по сравнению с адгезионной линией аденокарциномы легкого A549. Противоопухолевый эффект различных неочищенных микроводорослевых экстрактов в экспериментах *in vitro* описывают для многих штаммов (Jabeen, A. et al. 2017).

Было показано наличие цитостатической активности у водных экстрактов ряда морских микроводорослей против опухолевых клеточных линий человека, включая рак легкого, простаты, желудка, молочной и поджелудочной желез (Somasekharan, S. P. et al. 2016). *In vitro* экстракт микроводорослей проявил выраженную антиколониобразующую активность. Кроме того, он был более токсичен для неадгезивных клеток (выращенных в

суспензии), чем для адгезивных клеток. Ряд соединений способны останавливать процессы миграции и инвазии опухолевых клеток в кровяное русло.

1.2.6.2 Антимикробные соединения

Фотосинтезирующие микроорганизмы синтезируют различные биологически активные молекулы, обладающие антибактериальными, противовирусными и противогрибковыми свойствами. Особый интерес представляют молекулы, синтезируемые микроводорослями, обитающими в экстремальных условиях - к примеру, в условиях высокой солёности. Конкурируя с другими микроорганизмами за ресурсы, микроводоросли выделяют во внешнюю среду различные соединения, часть из которых выполняют защитную функцию и обладает антибактериальным эффектом (Falaise, C. et al. 2016).

Известно, что среди зеленых микроводорослей, водные или метанольные и этанольные экстракты, полученные из *Chlamydomonas reinhardtii*, проявляют ингибирующую активность против *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* (Abedin, R. M. A. et al. 2008). Аналогичную противомикробную активность показали водные или метанольные и гексанольные экстракты *Chroococcus dispersus* (Ghasemi, Y. et al. 2007). Экстракт, полученный смесью метанола и хлороформа из биомассы *Dunaliella salina*, оказался активным против нескольких патогенных бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* и *Enterobacter aerogenes* (Kilic, S. et al. 2018).

Среди красных микроводорослей известна активность фикобилипротеинов *Porphyridium aeruginum* в отношении *S. aureus*, *S. pyogenes* (Najdenski, H. M. et al. 2013), метанольного экстракта *Porphyridium purpureum* - в отношении *B. subtilis* и *E. coli* (Mudimu, O. et al. 2014) и экзополисахаридов *Rhodella reticulata* - в отношении *S. aureus*, *B. cereus*, *S. pyogenes* (Najdenski, H. M. et al. 2013).

У диатомовых водорослей известно о противомикробной активности липидных фракций, содержащих ненасыщенные жирные кислоты (триглицериды и докозапентаеновая кислота) из *Chaetoceros muelleri* - в отношении *B. subtilis*, *S. aureus* и *E. coli* (del Pilar Sánchez-Saavedra, M. et al. 2010), эйкозапентаеновой кислоты, пальмитолеиновой и гексадекатриеновой кислоты из *Phaeodactylum tricornutum* - в отношении *B. cereus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA (Desbois, A. P. et al. 2008) и экстрактов различных органических растворителей из *Skeletonema*

costatum - в отношении *S. aureus*, *Staphylococcus peoria*, *S. fecalis*, *S. pyogenes* (Duff, D. C. et al. 1966).

1.2.6.2.1 Грибы-сателлиты фототрофов, как источник антибиотиков

В последнее время внимание исследователей привлекают морские актиномицеты-сателлиты микроводорослей. Водоросли обеспечивают актиномицеты питательными веществами, в то время как актиномицеты, могут выделять в окружающую среду различные биологически активные вещества, обеспечивая защиту водорослей (Sharma, S. et al. 2020). Из морских актиномицетов, ассоциированных с водорослями выделено более 400 новых соединений, которые обладают противоопухолевой, антибактериальной, антиоксидантной и инсектицидной активностью, что позволяет рассматривать их в качестве перспективного источника новых биологически активных молекул (Carroll, A. R. et al. 2023).

Согласно литературным данным, морские актиномицеты-сателлиты представлены 22 родами, относящимися к 11 семействам (Таблица 5).

Таблица 5 - Список родов актинобактерий, ассоциированных с морскими водорослями.

Водоросли	Актинобактерии-сателлиты	Ссылки
Бурые водоросли	<i>Amycolatopsis</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Isoptericola</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Labeledella</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Nocardioopsis</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sanguibacter</i> , <i>Streptomyces</i>	(Wiese, J., et al. 2009), (Leiva, S., et al. 2015), (Girão, M. et al. 2019)
Красные водоросли	<i>Brachybacterium</i> , <i>Citricoccus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Salinibacterium</i> , <i>Streptomyces</i>	(Wiese, J., et al. 2009)
Зелёные водоросли	<i>Agrococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Nocardioopsis</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Salinibacterium</i> , <i>Salinispora</i> , <i>Streptomyces</i>	(Wiese, J., et al. 2009), (Yu, W. et al. 2023)
Другие водоросли	<i>Aeromicrobium</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Amycolatopsis</i> , <i>Labeledella</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Phycicola</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Salinispora</i> , <i>Streptomyces</i>	(Lee, S. D. 2008), (Yu, W. et al. 2023)

Наиболее изученной биологической активностью актиномицетов, связанных с морскими водорослями, является антибактериальная активность. Только за период с 2015 по 2019 годы более 35 новых антимикробных алкалоидов было выделено из морских грибов (Willems, T. et al. 2020). Среди них соединения, обладающие активностью против грамм-положительных и грамма-отрицательных бактерий. Несколько соединений продемонстрировали высокую противогрибковую активность (Jin, L. et al. 2016), (Liu, Z. et al. 2020), (Xu, K. et al. 2020). Было показано, что более 30 видов актиномицетов, ассоциированных с морскими бурыми водорослями *Laminaria saccharina*, способны проявлять антимикробную активность против *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus lentus* и антигрибковую активность против *Candida albicans* (Wiese, J., et al. 2009).

Обобщенные результаты исследований биологической активности экстрактов морских актиномицетов приведены в Таблице 6.

Таблица 6 - Различные виды биологически активных веществ из штаммов актиномицетов, ассоциированных с морскими водорослями.

Водоросль	Источник	Актиномицет	Биологическая активность	Ссылка
Бурые водоросли				
<i>Analipus japonicus</i> (Harvey) Wynne	Хоккайдо, Япония	<i>Streptomyces</i> sp. YM5-799	Fe-хелатирующая активность	(Matsuo, Y. et al. 2011)
<i>Carpodesmia tamariscifolia</i>	Атлантическое побережье Марокко	<i>Streptomyces albidoflavus</i> KC180	антибактериальная активность	(Katif, C. et al. 2022)
<i>Cystoseira baccata</i>	Кантабрийское море	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> M-27	антибактериальная активность; противогрибковая активность	(Braña, A. F. et al. 2015)
		<i>Streptomyces carnosus</i> M-40	антибактериальная активность; противогрибковая активность; противовоспалительное действие; противотуберкулезное действие	
<i>Dictyota</i> sp.	Колумбийское и Карибское море	<i>Streptomyces</i> sp. PNM-9	антибактериальная активность	(Betancur, L. A. et al. 2020)

Водоросль	Источник	Актиномицет	Биологическая активность	Ссылка
<i>Fucus</i> sp.	Береговая линия Беджая, Алжир	<i>Streptomyces sundarbansensis</i> WR1L1 S8	антибактериальная активность	(Djinni, I. et al. 2013)
<i>Laminaria japonica</i>	Побережье Кореи	<i>Streptomyces coelestis</i> PK206-15	противообрастающая активность	(Cho, J. Y. et al. 2012)
<i>Lobophora variegata</i>	Карибский бассейн	неопознанный актиномицет CNC-837	противовоспалительная активность	(Jiang, Z.-D. et al. 1999)
<i>Pelvetia canaliculata</i>	Пляж Сонмиани, Карачи, Пакистан	<i>Kocuria marina</i> CMG S2	антибактериальная активность; противогрибковая активность	(Uzair, B. et al. 2018)
<i>Sargassum arnaudianum</i>	Красное море у побережья Хургады, Египет	<i>Nocardiosis</i> sp. AS23C	антибактериальная активность	(Eliwa, E. M. et al. 2019)
<i>Sargassum myriocystum</i>	Тамил Наду, Рамешварам, Индия	<i>Streptomyces</i> sp. SNJASM6	антибактериальная активность; α -амилаза; эмульгирующая активность с твином 20, кокосовым маслом и ксилитом	(Anand, J., et al. 2019), (Javee, A. et al. 2020)
<i>Styopodium zonale</i>	Багамские острова	<i>Micromonospora</i> sp. CNY-010	цитотоксичность	(Kim, M. C. et al. 2018)
<i>Turbinaria ornata</i> or <i>Sargassum wightii</i>	Тамил Наду, Рамешварам, Индия	<i>Nocardiosis</i> sp. GRG1	антибактериальная активность	(Rajivgandhi, G. et al. 2016)
		<i>Nocardiosis</i> sp. GRG2	антибактериальная активность	(Rajivgandhi, G. et al. 2016)
		<i>Nocardiosis</i> sp. GRG3	флокулирующая активность; сорбция тяжелых металлов	(Rajivgandhi, G. et al. 2021)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Побережье Кореи	<i>Streptomyces atrovirens</i> PK288-21	антибактериальная активность	(Cho, J. Y. et al. 2012)
		<i>Streptomyces praecox</i> 291-11	противообрастающая активность	(Cho, J. Y. et al. 2012)
		<i>Streptomyces violaceoruber</i> SCH-09	противообрастающая активность	(Hong, S. L. et al. 2013)
Зелёные водоросли				

Водоросль	Источник	Актиномицет	Биологическая активность	Ссылка
<i>Caulerpa racemosa</i>	Тамил Наду, Рамешварам, Индия	<i>Nocardiosis</i> sp. DMS 2	антибактериальная активность	(Rajivgandhi, G. N. et al. 2020)
<i>Caulerpa pataxifolia</i>	Тамил Наду, Рамешварам, Индия	неопознанный актиномицет DMS 3	антибактериальная активность	(Rajivgandhi, G., et al. 2018)
<i>Enteromorpha compressa</i>	Восточное море Кореи	<i>Micrococcus</i> sp. GNUM-08124	активность агаразы	(Choi, H. J. et al. 2011)
<i>Enteromorpha prolifera</i>	Пляж Чжанцяо, Шаньдун, Китай	<i>Streptomyces</i> sp. OUCMDZ-3434	ингибирование α -глюкозидазы; цитотоксичность; противовирусная активность	(Chen, Z. et al. 2016), (Liu, H. et al. 2017)
		<i>Streptomyces</i> sp. OUCMDZ-3436	антибактериальная активность	(Du, Y. et al. 2018)
<i>Ulva conglobata</i>	Восточно-Китайское море	<i>Streptomyces</i> sp. ZZ502	-	(Zhang, X. et al. 2019)
<i>Ulva pertusa</i>	Южно-Китайское море, Гуандун, Китай	<i>Streptomyces</i> sp. HZP-2216E	антибактериальная активность; цитотоксичность	(Zhang, X. et al. 2017)
<i>Ulva</i> sp.	Кантабрийское море, Педренья	<i>Streptomyces althioticus</i> MSM3	антибактериальная активность; цитотоксичность	(Braña, A. F. et al. 2019)
Красные водоросли				
<i>Laurencia glandulifera</i>	Залив Зумбери, Аттика, Греция	<i>Streptomyces ambofaciens</i> BI0048	гербицидная активность; антибактериальная активность	(Rab, E. et al. 2017)

Описанные выше актиномицеты, ассоциированные с морскими водорослями, проявляют разнообразную биологическую активность: антибактериальную, противогрибковую, противоопухолевую, противовоспалительную и даже гербицидную. Большинство штаммов *Streptomyces* spp. были сателлитами бурых и зеленых водорослей.

Отдельно стоит отметить нитчатые грибы *Aspergillus*, ассоциированные с зелеными морскими водорослями. Было показано, что *Aspergillus nidulans* Winter G. является источником широкой палитры метаболитов, таких как терпеноиды, бензофеноны, стеринны, алкалоиды, ксантоны и поликетиды. В ряде работ из *A. nidulans* были выделены разнообразные хинолиновые алкалоиды, демонстрирующие цитотоксическую и

антипролиферативную активность на моделях опухолевых клеточных линий L-929 и K-562 (Scherlach, K. et al. 2006), (Li, Q. et al. 2020), (An, C.-Y. et al. 2013a). На модели 36 опухолевых клеточных линий была показана цитотоксическая активность алкалоида эминдол DA, выделенного из гриба, ассоциированного с зелеными водорослями (среднее значение IC₅₀ составило 5,5 мкг/мл) (Sanchez, J. F. et al. 2011) (Таблица 7).

Таблица 7 - Биологическая активность метаболитов *Aspergillus nidulans*.

Название соединения	Вид биологической активности	Бактериальный штамм/опухолевая клеточная линия	Биологическая активность (МИК/ИК ₅₀)		Ссылка на исследование
			Активность экстракта	Активность контрольного соединения	
Изоэкостеригматоцистин	Антимикробная	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	(Yang, S.-Q. et al. 2018)
		<i>Edwardsiella ictarda</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	(Lu, F. et al. 2020)
Стеригматоцистин	Антимикробная	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
Версиколорин С	Антимикробная	<i>Escherichia coli</i>	1,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	(Yang, S.-Q. et al. 2018)
		<i>Micrococcus luteus</i>	32,0 г/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio anguillarum</i>	4,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio alginolyticus</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Edwardsiella ictaluri</i>	8,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	
Изоверсиколорин С	Антимикробная	<i>Escherichia coli</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	(Yang, S.-Q. et al. 2018)
		<i>Micrococcus luteus</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio vulnificus</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 8,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio alginolyticus</i>	1,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Edwardsiella ictaluri</i>	4,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	

Название соединения	Вид биологической активности	Бактериальный штамм/опухолевая клеточная линия	Биологическая активность (МИК/ИК ₅₀)		Ссылка на исследование
			Активность экстракта	Активность контрольного соединения	
Виолацеол I	Антимикробная	<i>Bacillus subtilis</i>	13,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 6,3 мкг/мл	(Ninomiya, A. et al. 2022)
Виолацеол II	Антимикробная	<i>Bacillus subtilis</i>	50 мкг/мл	Хлорамфеникол 6,3 мкг/мл	
Диорцинол	Антимикробная	<i>Bacillus subtilis</i>	100,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 6,3 мкг/мл	
Кордиол С	Антимикробная	<i>Bacillus subtilis</i>	100,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 6,3 мкг/мл	
Гибеллулин А	Антимикробная	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	4,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	(Lu, F. et al. 2020)
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	4,0 мкг/мл	Амфотерицин В 0,5 мкг/мл	
		<i>Edwardsiella ictarda</i>	2,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	
		<i>Edwardsiella tarda</i>	4,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Escherichia coli</i>	8,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio alginolyticus</i>	8,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Vibrio harvey</i>	4,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
Аспохинолон Е	Цитотоксичность	HL-60	29,15 мкМ	cis-platin 3,22 мкМ	(Li, Q. et al. 2020)
		A549	3,50 мкМ	cis-platin 13,17 мкМ	
		MCF-7	24,50 мкМ	cis-platin 22,96 мкМ	
Глулизин А	Антимикробная	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	(Yang, S.-Q. et al. 2018)
Эместрин		T47D	1,8 мкг/мл	-	(Nursid, M. et al. 2012)
		HepG2	4,2 мкг/мл	-	
		C28	2,6 мкг/мл	-	
		HeLa	13,8 мкг/мл	-	
Эместрин В		T47D	0,16 мкг/мл	-	(Nursid, M. et al. 2015)
		HeLa	1,56 мкг/мл	-	

Название соединения	Вид биологической активности	Бактериальный штамм/опухолевая клеточная линия	Биологическая активность (МИК/ИК ₅₀)		Ссылка на исследование
			Активность экстракта	Активность контрольного соединения	
		WiDr	1,02 мкг/мл	-	
3,3'-Дииндолилметан	Антимикробная	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	(Lu, F. et al. 2020)
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	64,0 мкг/мл	Амфотерицин В 0,5 мкг/мл	
		<i>Edwardsiella tarda</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
Терреквинон А	Антимикробная	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	(Lu, F. et al. 2020)
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2,0 мкг/мл	Амфотерицин В 0,5 мкг/мл	
		<i>Edwardsiella tarda</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Escherichia coli</i>	2,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio alginolyticus</i>	2,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Vibrio harvey</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл)	
19-Гидроксипенитрем А	Антимикробная	<i>Escherichia coli</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	(Zhang, P. et al. 2015b)
		<i>Edwardsiella tarda</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 16,0 мкг/мл	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio anguillarum</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
19-Гидроксипенитре Е	Антимикробная	<i>Escherichia coli</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	(Zhang, P. et al. 2015b)
		<i>Edwardsiella tarda</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 16,0 мкг/мл	
Пенитрем А	Антимикробная	<i>Escherichia coli</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	(Zhang, P. et al. 2015b)
		<i>Edwardsiella tarda</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 16,0 мкг/мл	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio anguillarum</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	

Название соединения	Вид биологической активности	Бактериальный штамм/опухолевая клеточная линия	Биологическая активность (МИК/ИК ₅₀)		Ссылка на исследование
			Активность экстракта	Активность контрольного соединения	
Аспернидин G	Цитотоксичность	HL-60	28,75 мкМ	cis-platin 3,22 мкМ	(Li, Q. et al. 2020)
		MCF-7	28,31 мкМ	cis-platin 22,96 мкМ	
		SW-480	21,67 мкМ	cis platin 18,01 мкМ	
Аспернидин H	Цитотоксичность	HL-60	15,81 мкМ	cis-platin 3.22 мкМ	(Li, Q. et al. 2020)
		A549	33,03 мкМ	cis-platin 13,17 мкМ	
		SMMC-7721	17,17 мкМ	cis-platin 12,65 мкМ	
		MCF-7	17,80 мкМ	cis-platin 22,96 мкМ	
		SW-480	4,77 мкМ	cis-platin 18,01 мкМ	
Эмерифенолицин E	Цитотоксичность	HeLa	4,77 мкМ	Адриамицин	(Zhou, H. et al. 2016)
		A549	12,04 мкМ	Адриамицин	
		HCT-116	33,05 мкМ	Адриамицин	
Нидутерпеноид A	ER α ингибиторы	MCF-7	11,42 мкМ	-	(Li, Q. et al. 2019)
(7Z,9Z,17Z)-,2 α ,3 β -dihydroxypregna-7,9,17 (20)-trien-18-al	Цитотоксичность	PC12	7,34 мкМ	Доксорубицин 5,71 мкМ	(Li, Q. et al. 2022)
Микроперфуранон	Антимикробная	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	32,0 мкг/мл	Амфотерицин В 0,5 мкг/мл	(Lu, F. et al. 2020)
		<i>Edwardsiella ictarda</i>	4,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	
		<i>Edwardsiella tarda</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Escherichia coli</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio harvey</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
	Антимикробная	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	64,0 мкг/мл	Амфотерицин В 0,5 мкг/мл	(Lu, F. et al. 2020)

Название соединения	Вид биологической активности	Бактериальный штамм/опухолевая клеточная линия	Биологическая активность (МИК/ИК ₅₀)		Ссылка на исследование
			Активность экстракта	Активность контрольного соединения	
9-Гидроксимикроперфуранон		<i>Edwardsiella tarda</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Escherichia coli</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio harvey</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
Курвуларин	Антимикробная	<i>Edwardsiella ictarda</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	(Lu, F. et al. 2020)
6-((S,3E,5E)-5,7-Dimethyl-2-oxoнопа-3,5-dien-1-yl)-2,4-dihydroxy-3-methylbenzaldehyde	Ингибирование липоксигеназы-1	Соевая липоксигеназа 1	97,2 мкМ	-	(Somoza, L. et al. 2021)
Леканоровая кислота	Антимикробная	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	(Lu, F. et al. 2020)
		<i>Edwardsiella ictarda</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 2,0 мкг/мл	
		<i>Escherichia coli</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio harvey</i>	8,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл)	
Апероксид А	Антимикробная	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл)	(Lu, F. et al. 2020)
		<i>Edwardsiella tarda</i>	16,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	
		<i>Vibrio harveyi</i>	32,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 1,0 мкг/мл	
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	64,0 мкг/мл	Хлорамфеникол 0,5 мкг/мл	

1.2.6.3 Антиоксиданты

Фотосинтезирующие микроорганизмы часто подвергаются воздействию активных форм кислорода, генерирующих свободные радикалы. Для защиты от свободных радикалов микроводоросли образуют различные антиоксиданты: каротиноиды, фенольные и азотистые соединения и др. (Sathasivam, R. et al. 2018).

Каротиноиды - это жирорастворимые пигменты, имеющие красный, коричневый, желтый или оранжевый цвета. Каротиноиды являются полиненасыщенными соединениями терпенового ряда, их молекулы представляют собой полиеновую цепь, содержащую четыре изопреноидных остатка, по концам которой расположены циклогексановые кольца или алифатические изопреноидные остатки. По химической структуре каротиноиды делятся на два класса: каротины и ксантофиллы.

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. Наиболее ценными для коммерческой точки зрения являются β -каротин, астаксантин, фукоксантин и лютеин.

Бета-каротин является прекурсором витамина А и обладает оранжево-желтым цветом. Микроводоросли рода *Dunaliella* могут накапливать до 14 % β -каротина в сухой массе, благодаря чему являются одним из важнейших природных продуцентов данного соединения (Spolaore et al., 2006). Противовоспалительный эффект β -каротина может быть объяснен ингибированием транскрипции генов интерлейкинов-1 β , -6 и -12, а также ряда воспалительных цитокинов (Andrade, L. M. et al. 2018).

Астаксантин - метаболит β -каротина, который придает характерный красный цвет многим морским организмам, включая креветки и лосось. Исследования показывают, что антиоксидантная активность астаксантина превышает таковую у витамина Е в 1000 раз (Catanzaro, E. et al. 2020). Различные штаммы микроводорослей, такие как *Haematococcus pluvialis*, *Chlorococcum sp.* и *Chlorella zofingiensis* могут накапливать до 5 % астаксантина в сухой массе в стрессовых условиях (Villaro et al., 2021).

Оранжевый пигмент фукоксантин является одним из наиболее распространенных каротиноидов (10 % от общего количества) и повсеместно распространен в морских экосистемах. Молекула фукоксантина содержит сопряженные двойные связи, а также гидроксильные, карбонильные и эпоксидные группы (Sun et al., 2023). Основным источником коммерческого фукоксантина являются макроводоросли, такие как: *Laminaria japonica*, *Eisenia bicyclis*, *Undaria pinnatifida* и *Hijikia fusiformis*. Среди микроводорослей - промышленных штаммов-продуцентов фукоксантина обычно рассматривают *Phaeodactylum tricornutum* и *Isochrysis*. Содержание фукоксантина в биомассе может достигать порядка 10-12 мг/г сухого веса. При этом выход фукоксантина в значительной степени зависит от способа культивирования: автотрофное или миксотрофное выращивание, трубчатый или панельный фотобиореактор и др. (Mulders, K. J. et al. 2014).

Показано, что профиль накапливаемых каротиноидов может существенно меняться в ответ на создание стрессовых условий (Faraloni, C. et al. 2017). Примеры микроводорослей

- эффективных продуцентов коммерчески значимых каротиноидов, приведены в Таблице 8.

Таблица 8 - Стресс-факторы, стимулирующие синтез каротиноидов фотосинтезирующими микроорганизмами.

Вид фотосинтезирующих микроорганизмов	Каротиноиды	Стресс-факторы
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Асатаксантин; кантаксантин; лютеин	Интенсивное освещение Азотное голодание
<i>Dunaliella salina</i>	β-каротин	Интенсивное освещение Высокая температура
<i>Scenedesmus sp.</i>	Лютеин; β-каротин	Интенсивное освещение Нехватка питательных веществ
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Диатоксантин; фукоксантин	Интенсивное освещение Дефицит питательных веществ
<i>Isochrysis sp.</i>	Диатоксантин; фукоксантин	Интенсивное освещение Дефицит питательных веществ
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Зеаксантин; лютеин	Интенсивное освещение Анаэробия

Промышленное получение каротиноидных пигментов из биомассы микроводорослей - сложная технологическая задача, включающая стадии масштабного культивирования, экстракции и очистки (Рисунок 2) (Ambati, R.R. et al. 2019).

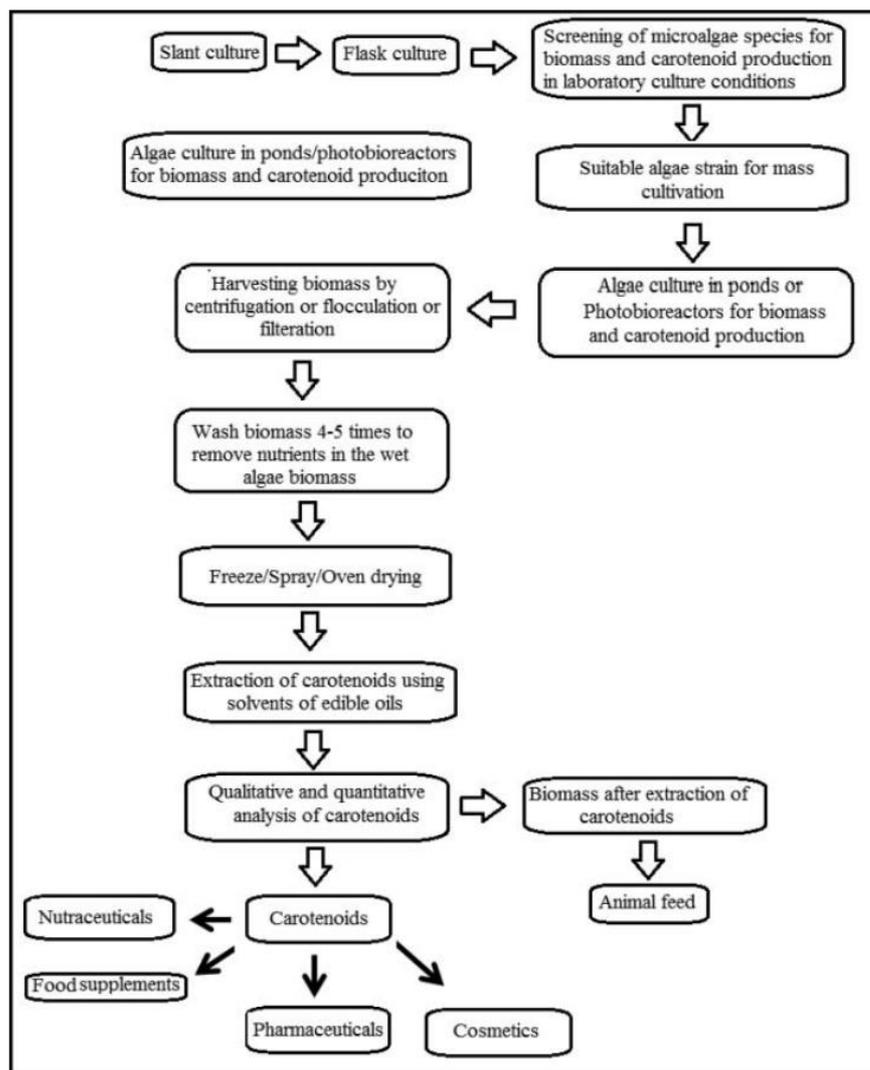


Рисунок 2 - Технология получения каротиноидных пигментов микроводорослей для коммерческого применения.

Выбор подходящего метода экстракции зависит от конкретного вида водорослей (McMillan, J. R. et al. 2013). К примеру, для экстракции астаксантина из биомассы *Haematococcus pluvialis* используют систему растворителей додекана и метанола. Эффективность такой экстракции может достигать 80 % - 85 % (Kang, W. H. et al. 2020). В тоже время 95 %-ная эффективность извлечения фукоксантина из биомассы *Isochrysis galbana* достигается при экстракции этанолом (Kim, S. M. et al. 2012).

В ряде экспериментов была установлена высокая корреляция между антиоксидантной активностью и содержанием фенольных соединений в экстрактах - в связи с этим можно предположить, что антиоксидантная активность микроводорослей частично может быть обусловлена синтезом фенольных соединений (Gürlek, C. et al. 2019). В тоже время относительно низкое содержание полифенолов в экстрактах

микроводорослей делает их мало привлекательными источниками для промышленного использования. Кроме того, эффективная экстракция фенолов требует применения токсичных органических растворителей.

В настоящее время ученые придерживаются мнения о том, что противовоспалительный эффект экстрактов микроводорослей также может быть связан с фикоцианином, который ингибирует образование провоспалительных цитокинов, в частности фактора некроза опухоли альфа, а также снижает выработку простагландина E2, подавляет экспрессию циклооксигеназы-2 (Khanra, S. et al. 2018).

В недавних работах было предложено использовать цианобактерии (например, *Nostoc*, *Anabaena*) как перспективный источник антиоксидантов для коммерческого использования (Blagojević, D. et al. 2018).

1.2.7 Фотосинтезирующие микроорганизмы как источник биотоплива

Ископаемое топливо является невозобновляемым ресурсом, и его запасы стремительно истощаются на фоне растущих потребностей человечества. По мнению многих экспертов и специалистов в области энергетики, при текущих темпах потребления запасы нефти могут исчерпаться в течение 40 лет, природного газа - за 60 лет, угля - на протяжении 170 лет, а урана-235 - всего за 10 лет.

Биотопливо - это топливо, получаемое из органических материалов, таких как растительность, древесина, отходы сельского хозяйства и животноводства, а также микроорганизмы. В эпоху революции возобновляемых источников энергии биотопливо рассматривается как одна из перспективных замен традиционному ископаемому топливу.

Существуют различные виды биотоплива, включая первое поколение (1G), второе поколение (2G) и третье поколение (3G) биотоплива.

К биотопливу первого поколения (1G) относят топливо, получаемое из биомассы пищевых сельскохозяйственных культур или сельскохозяйственных продуктов. Примером может быть биоэтанол из кукурузы или зерна. Промышленное производство биотоплива первого поколения требует больших сельскохозяйственных площадей, что приводит к сокращению территорий для выращивания продуктов питания (Mobin, S. MA. et al. 2018). К примеру, в ЕС только за 2020 год 3,3 млн тонн пшеницы и 6,5 млн тонн кукурузы ушло на производство биотоплива. Кроме того, массовое выращивание культур, используемых как сырье для биотоплива 1G (кукуруза, сахарный тростник, подсолнечник, рапс и др.)

может негативно сказываться на разных экосистемах, так как требует большого объема воды, удобрений и пр.

Биотопливо второго поколения (2G) получают из отходов деревообработки, животноводства и пищевой промышленности. Ключевым сырьем являются целлюлоза и лигнин. Основной плюс биотоплива второго поколения - отсутствие необходимости использовать сельскохозяйственные земли для его производства. Тем не менее, производство биотоплива второго поколения с экономической точки зрения является неэффективным, так как требует создания дорогостоящих технологических цепочек (Dragone, G. et al. 2010).

Биотопливо третьего поколения (3G) получают из биомассы микроводорослей с высоким содержанием липидов (до 70 % сухого веса). При определенных условиях культивирования содержание жирных кислот в биомассе микроводорослей может достигать 80 % сухого веса. Микроводоросли могут быть источником различных видов биотоплива, включая бионефть, биодизель и биоэтанол (Chisti, Y. 2007). Наиболее распространенным является биодизельное топливо, получаемое путем переэтерификации липидов микроводорослей с метиловым спиртом в мягких условиях (Nigam, P. S. et al. 2011).

Основные преимущества использования микроводорослей для получения биотоплива следующие:

- 1) высокая скорость роста биомассы;
- 2) высокая продуктивность липидов;
- 3) для культивирования не требуется высококачественных сельскохозяйственных земель;
- 4) биомасса по потенциальному энергетическому выходу в 8 - 25 раз превосходит пальмовое масло и в 40 - 120 раз - рапсовое;
- 5) биотопливо не содержит серы, нетоксично и хорошо поддается биодegradации;
- 6) выход липидов из биомассы составляет 11400-95000 л/га, то есть на порядок больше, у других сельскохозяйственных культур (Клюс, В. П. 2008).

На Рисунке 3 представлена подробная блок-схема производства биотоплива из микроводорослей.

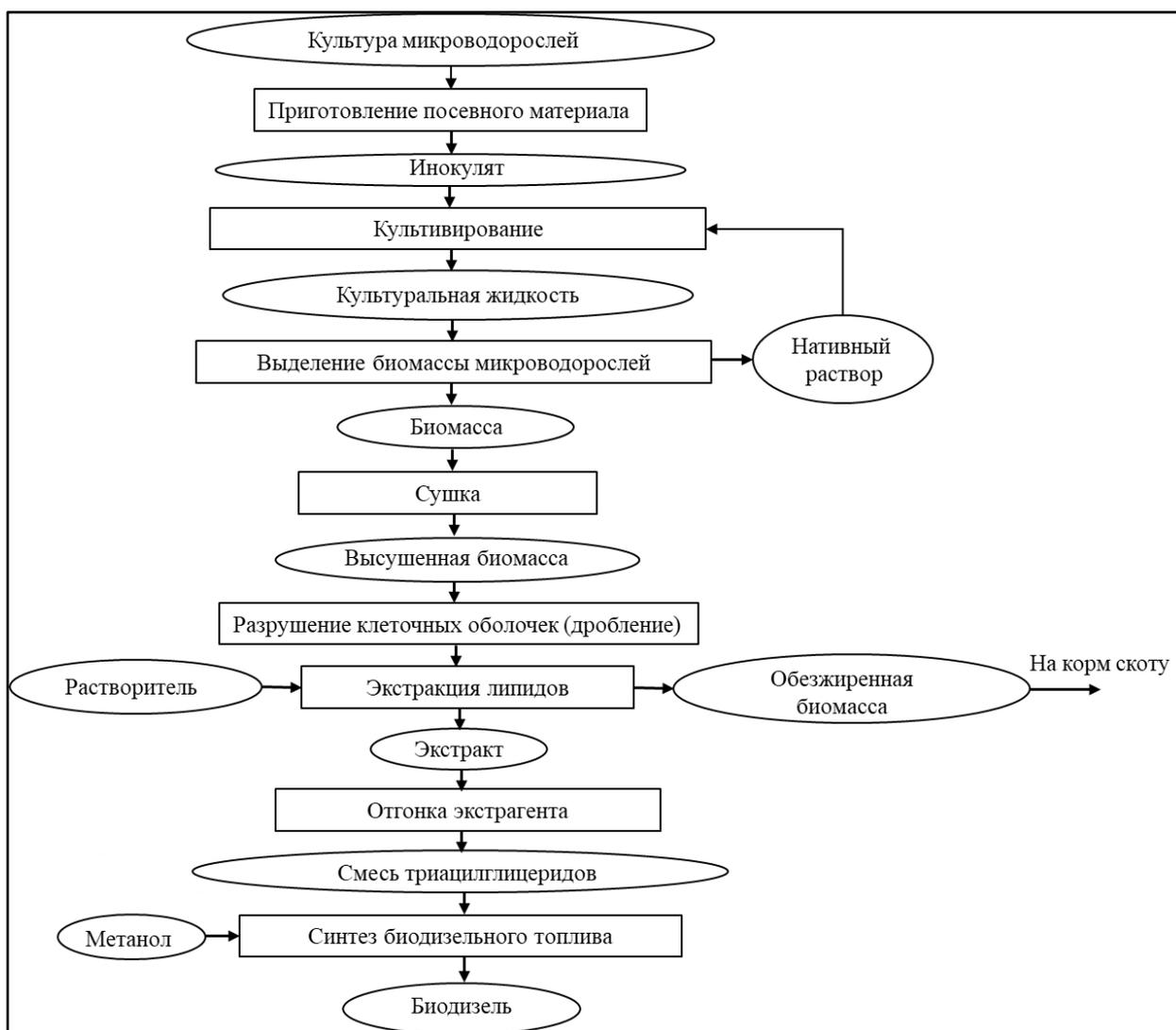


Рисунок 3 - Технологическая схема производства биотоплива из микроводорослей.

Для крупномасштабного производства данного вида биотоплива необходимо использование новых штаммов микроводорослей с более высоким содержанием липидов и скоростью накопления биомассы. Отсутствие экономически обоснованной технологии культивирования, позволяющей получать промышленно значимые объемы маслосодержащей биомассы микроводорослей, и технологии переработки получаемого сырья является ключевым стоп-фактором промышленного использования биотоплива третьего поколения.

1.2.8 Фотосинтезирующие микроорганизмы в биологической очистке водоемов и почв

В последнее время большое внимание привлек еще один аспект применения микроводорослей в хозяйственной жизни человека - экологический. С учетом экономической эффективности наиболее перспективным считают использование водорослей для очистки сточных вод предприятий пищевой промышленности, рыбоводных хозяйств, животноводческих ферм, птицефабрик, боен (Ленова, Л. И. и др. 1990).

Положительную роль сине-зеленых микроводорослей обуславливает суммарное действие нескольких существенных факторов: улучшение кислородного режима за счет фотосинтетической аэрации, улучшение условий существования водной микрофлоры, аккумуляция загрязнителей и выделение биологически активных метаболитов. Культивирование микроводорослей на сточных водах, с одной стороны, позволяет осуществлять биологическую очистку воды, с другой стороны - получать дешевую биомассу, богатую белками, витаминами и пр. (Таубаев, Т. Т. 1980).

Доказана способность ряда сине-зеленых водорослей гидролизовать ациланилидный гербицид пропанил, превращая его в 3,4-дихлоранилин, быстрее разрушаемый бактериями. Существуют данные о том, что альго-бактериальные ценозы способствуют разрушению мазута, продуктов органического синтеза и прочих ксенобиотиков, попадающих в природные водоемы в результате деятельности человека (Янкевич, М. И. 2002). Водоросли для очистки сточных вод успешно применяют в США, Японии, Германии.

Применение активных штаммов микроорганизмов-деструкторов, выделение и использование устойчивых к загрязненным водам микроводорослей позволило создать новую комплексную биотехнологию очистки и восстановления экосистем водоемов и почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Эти технологии позволяют проводить биоремедиацию водоемов и почв, подвергнутых систематическому аварийному загрязнению в течение многих лет нефтепродуктами и другими токсикантами. Рассчитано, что очистка сточных вод биологическими методами, в первую очередь, с помощью водорослей, стоит в 100 раз дешевле, чем физико-химическими, при этом за счет механической очистки из воды удаляется до 30 %, физико-химической - до 40 %, а биологической - до 80 % органических загрязнителей, в связи с чем микроводоросли для очистки сточных вод успешно и эффективно используются во многих странах мира (Романенко, В. Д. 1999).

Одним из наиболее эффективных способов очистки воды является биофлокуляция. Сущность этой разработки заключается в применении специально выращенной

биокультуры для оздоровления водных экосистем. В отличие от известных методик, применяется микроводоросль, находящаяся в неактивном состоянии, поскольку в качестве флокулянта используются физико-химические свойства биомассы. В отличие от синтетических флокулянтов, биофлокулянт дешевле и может быть произведен в неограниченном количестве на месте его потребления. Способ очистки сточных вод биофлокуляцией в 5 раз дешевле всех известных способов очистки, что обуславливает возможность снижения затрат, повышения эффективности и стабильности работы, улучшения качества очистки вод от взвешенных примесей, распределенных в больших объемах воды. Биофлокуляция позволяет в процессе очистки больших объемов загрязненных вод одновременно выращивать культуру водоросли. Данный способ очистки пригоден для применения в горнодобывающей промышленности, в отдаленных от коммуникаций районах, что может обеспечить стабильность процесса очистки вне зависимости от климатических факторов и колебаний в расходах сточных вод (Новиков, О. Н. и др. 2005).

1.2.9 Другие области применения фототрофных микроорганизмов

Микроводоросли используются для получения разнообразных продуктов из нативной и переработанной альгомассы (Пульц, О. 2000). В некоторых регионах мира исторически сложилась традиция использования в пищевых целях определенных видов водорослей. Сегодня во всех странах мира разрешено употребление в пищу следующих видов: *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella sorokiniana*, *Dunaliella salina*; регионально разрешены: *Nostoc pruniforme* (в странах юго-восточной Азии), в США - *Aphanizomenon flosaquae* (Минюк, Г. С. и др. 2008).

Широк спектр применения микроводорослей в сельском хозяйстве. В качестве кормовых добавок в животноводстве и птицеводстве используются водоросли родов *Chlorococcum*, *Spirogyra*, *Scenedesmus*, *Nostoc*, *Navicula*, *Nitzschia* и др. Такие добавки оказывают выраженное положительное влияние: у животных повышается иммунитет, возрастают их вес, плодовитость и выживаемость молоди, у птиц - увеличиваются размеры яиц, усиливается яйценоскость и интенсивность окраски яичного желтка. Вследствие этого в США фермерские хозяйства для выращивания крупного рогатого скота и птицы обеспечены водорослевыми водоемами, в которых отходы животноводства утилизируются водорослями, в результате чего 40 % азота из сточных вод снова поступает в биомассу водорослей и поедается животными (Вассер, С.П. и др. 1989). Кроме того, применение

суспензии хлореллы и *Scenedesmus* в шелководстве способствует ускорению развития гусениц тутового шелкопряда, а также увеличивает его жизнеспособность и урожайность коконов (Горюнова, С. В. и др. 1969).

1.3 Факторы, влияющие на скорость роста биомассы

Критической характеристикой любого промышленного штамма является скорость роста биомассы и накопление целевого метаболита. Для микроводорослей оба этих параметра зависят от освещенности, состава питательной среды, температуры, pH, способа культивирования и др. (Рисунок 4) (Villarruel-Lopez, A. et al. 2017).



Рисунок 4 - Основные факторы, влияющие на продуктивность микроводорослей.

Рост микроводорослей как фотосинтезирующих организмов зависит от интенсивности освещения, длины световой волны и фотопериода (Iasimone, F., et al. 2018). Интенсивность освещения напрямую связана с фотохимической фазой фотосинтеза. Фотосинтез усиливается с увеличением интенсивности освещения до тех пор, пока не достигнет максимальной величины в точке насыщения (da Fontoura, J. T. et al. 2017). Избыток света приводит к фотоингибированию - светоиндуцируемому повреждению фотосистемы II, что в свою очередь замедляет реакцию восстановления NADP^+ до NADPH .

Фотоингибирование может быть динамичным или хроническим в зависимости от продолжительности избыточного освещения (Nikolaou, A. et al. 2016). При этом, в процессе культивирования свет может распределяться неравномерно, в результате чего одна часть клеток может находиться в тени, а другая испытывать фотоингибирование. В связи с этим, конструкция ряда фотобиореакторов предполагает размещение источника света непосредственно в толще культуры. При этом источник света может быть как искусственным, так и естественным - собственно солнечный свет.

Как правило, микроводоросли используют свет с длиной волны от 400 до 700 нм и интенсивности от 800 до 1000 Вт/м² (Zhang, X. et al. 2015a). Длины волн, поглощаемые микроводорослями, различаются в зависимости от вида. Например, зеленые микроводоросли поглощают световую энергию для фотосинтеза с помощью хлорофиллов в качестве основного поглощающего пигмента энергии света в диапазоне 450-475 нм и 630-675 нм и каротиноидов в качестве вспомогательного пигмента, поглощающего световую энергию в диапазоне 400-550 нм (Blair, M. F. et al. 2014).

В исследованиях на *Dunaliella salina* было показано, что наибольшая продуктивность биомассы и каротиноидов (β -каротина и лютеина) достигается при комбинации 75 % красного света (длина волны около 700 нм) и 25 % синего света (длина волны около 400 нм) (Fu, W. et al. 2013).

Кроме того, на примере различных видов морских и пресноводных микроводорослей было показано, что продолжительность освещения влияет на интенсивность фотосинтеза, скорость роста и деления клеток, потребление углекислого газа. Практически всегда перечисленные параметры были выше при чередовании фазы освещения и затемнения. Так, например, скорость роста *Chlamydomonas reinhardtii* повышалась до 40 % при смене световой и темновой фаз даже каждые 20 секунд (Takache, H. et al. 2015).

Однако в настоящее время нет единого объяснения зависимости продуктивности микроводорослей от длины фотопериода (Chew, K. W. et al. 2018). Возможно, при длительном освещении в клетках накапливаются продукты, способные ингибировать фотосинтез - отрицательная обратная связь. При этом в темновой фазе может происходить расщепление или выведение этих соединений, что будет снова активировать фотосинтез.

Культуральная среда микроводорослей должна содержать неорганические элементы, и прежде всего азот и фосфор, концентрация которых может варьировать в зависимости от конкретного вида. Азот является вторым после углерода макроэлементом, составляя от 1 % до 14 % от сухой массы. Азот может поглощаться в виде неорганических солей NO₃, NO₂, NO и NH₄, а в некоторых случаях в виде N₂ или в органической форме в составе мочевины и даже аминокислот. Снижение концентрации азота в процессе

культивирования переключает метаболизм микроводорослей на синтез липидов и полисахаридов.

Содержание фосфора в сухой биомассе микроводорослей может составлять от 0,05 % до 3,3 % (de Alva, M. S. et al. 2018). Обычно в растворенном виде фосфор присутствует в различных формах: ортофосфат, полифосфат, пирофосфат и метафосфат. Для роста микроводорослям также необходимы микроэлементы, основными среди которых являются магний, сера, железо, а также кальций, натрий, хлор, цинк, медь, молибден, марганец, бор и кобальт (Markou, G. et al. 2014).

Ограничение питательных веществ - голодание по азоту и фосфору - оказывает непосредственное влияние на фотосинтез, скорость роста и деления, а также синтез биологически активных веществ (Kadkhodaei, S. et al. 2015). Высокая интенсивность освещения вместе с ограничением содержания азота или фосфора приводят к увеличению липидной фракции и стимулируют накопление триацилглицеринов. В условиях низкой освещенности накапливаются в основном полярные липиды (фосфолипиды и гликолипиды), которые структурно и функционально связаны с клеточными мембранами. При этом рост клеток в таких замедляется. Однако есть исключения, например, диатомовые водоросли, у которых содержание липидов не меняется даже при длительном азотном голодании (Camacho-Rodríguez, J. et al. 2015).

Стресс, вызванный дефицитом питательных веществ, также приводит к образованию свободных радикалов в клетке и изменению содержания антиоксидантов. В нормальных условиях микроводоросли синтезируют первичные каротиноиды, такие как хлорофиллы, β -каротиноиды и др. В ответ на возникновение свободных радикалов происходит преобразование первичных каротиноидов во вторичные с последующим накоплением их вне хлоропластов (Goiris, K. et al. 2015). В многочисленных экспериментах было показано, что увеличение интенсивности и продолжительности освещения приводит к снижению плотности хлорофилла (Nurachman, Z. et al. 2015).

В условиях низкой освещенности и дефицита азота *Haemotococcus phuvialis* способен преобразовывать пигмент зеаксантин в коммерчески значимый антиоксидант - астаксантин (Camacho-Rodríguez, J. et al. 2015).

Для получения 1 кг биомассы микроводорослям требуется от 1,8 до 2,0 кг CO_2 . Учитывая это стехиометрическое соотношение, количество CO_2 , содержащегося в воздухе (0,03 %), недостаточно для высокой продуктивности культуры. Для решения этой проблемы культуральная среда должна быть обогащена углеродом, источником которого могут быть соли, такие как бикарбонат. Исследование показало, что при подаче воздуха в фотобиореактор со скоростью 600 мл/мин и содержанием CO_2 около 20 % микроводоросли

демонстрировали максимальную скорость роста (Duran, I. et al. 2018). Это указывает на возможность использования углекислого газа, возникающего в результате промышленного горения (содержание в воздухе около 5 %), в качестве источника углерода для выращивания микроводорослей.

Соленость культуральной среды является еще одним фактором, влияющим на рост и развитие микроводорослей. Особенно параметр солености критичен для выращивания пресноводных штаммов. Условно микроводоросли можно разделить на те, которые могут развиваться только в воде с низкой соленостью (максимальная соленость 0,5-5,0 г/л), в средах с умеренно соленой водой (5-18 г/л) и галофилы, которые развиваются в воде с соленостью 18-30 г/л (Mohan, S. V. et al. 2014).

Температурный оптимум для наиболее часто используемых микроводорослей, таких как *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Botryococcus*, *Scenedesmus*, *Neochloris*, *Haematococcus* и *Nannochloropsis* лежит в пределах от 15 °С до 35 °С в зависимости от штамма (Singh, S. P. et al. 2015). Продуктивность штаммов при различной температуре культивирования приведена в Таблице 9.

Таблица 9 - Влияние температуры на продуктивность биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов.

Название штамма	Продуктивность биомассы, г/л		
	27 °С	30 °С	35 °С
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,77	0,83	0,36
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,33	0,75	0,18
<i>Haematococcus pluvialis</i>	0,79	0,81	0,64
<i>Botryococcus braunii</i>	0,65	0,67	0,23
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,58	0,77	0,25
<i>Neochloris cohaerens</i>	0,68	0,72	0,55
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	0,45	0,59	0,13

При этом обнаружено, что штаммы *Asterarcys quadricellulare* и *Chlorella sorokiniana*, выделенные из почвы вблизи сталелитейного завода, не только растут при температуре 43 °С, но и устойчивы к высоким концентрациям CO₂ и NO (Varshney, P. et al. 2018). Промышленное культивирование таких термофильных микроорганизмов при высоких температурах может позволить значительно снизить контаминацию.

В целом рекомендуемая температура культивирования для получения максимального выхода биомассы различных видов микроводорослей составляет от 27 °С

до 30 °С. При повышении температуры культивирования до 35 °С выход биомассы резко снижается.

Водородный потенциал (рН) имеет важное значение при культивировании микроводорослей, поскольку он не только напрямую влияет на внутриклеточный метаболизм, но и определяет растворимость минералов и углекислого газа в среде (Qiu, R. et al. 2017). На рН культуральной среды могут влиять такие факторы, как температура и метаболическая активность клеток, количество растворенного углекислого газа, состав и буферная емкость культуральной жидкости. Различные виды микроводорослей обладают разной чувствительностью к рН питательной среды, что оказывает влияние на скорость роста. Для некоторых микроводорослей оптимальный уровень рН составляет от 6 до 8.

В ряде случаев наблюдается устойчивое накопление биомассы при чрезвычайно низких значениях рН, как, например, у микроводорослей *Chlorella protothecoides* var. *acidicola*. Оптимальным условиям роста этого штамма соответствует рН районе 2,5 единиц при температуре 30 °С (Nancuccheo, I. et al. 2012).

Использование буферных растворов уменьшает колебания рН в культуральной среде, однако является экономически не обоснованным при промышленном культивировании. Альтернативным способом снижения рН среды является аэрация/барботирование культур атмосферным воздухом (0,03 % CO₂) или воздухом, обогащенным CO₂ (Valdes, F. J. et al. 2012).

Влияние рН на продуктивность биомассы различных видов микроводорослей показан в Таблице 10. (Varshney, P., et al. 2018). Оптимальный показатель рН находится в диапазоне от 6 до 8, однако для штамма *Chlorella vulgaris* снижение рН до 4 приводит к наибольшему выходу биомассы.

Таблица 10 - Влияние рН культуральной среды на продуктивность биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов.

Название штамма	Продуктивность биомассы, г/л		
	рН=4	рН=6	рН=8
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,75	0,67	0,34
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,17	0,72	0,68
<i>Haematococcus pluvialis</i>	0,16	0,74	0,78
<i>Botryococcus braunii</i>	0,18	0,65	0,69
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,21	0,73	0,68
<i>Neochloris cohaerens</i>	0,16	0,69	0,67
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	0,18	0,78	0,76

Перемешивание культуральной среды также является важнейшим параметром для эффективного выращивания микроводорослей, так как способствует равномерному распределению питательных веществ, повышает эффективность газообмена, предотвращает температурные перепады. Кроме того, перемешивание снижает вероятность как затемнения, так и фотоингибирования за счет более равномерного распределения света между всеми клетками суспензии (Zhu, L. 2015). Это особенно важно на той стадии выращивания микроводорослей, когда культура достигает высокой плотности. Перемешивание также способствует улавливанию атмосферного CO₂ и выделению биосинтезированного кислорода, что дополнительно стимулирует фотосинтез в культуре микроводорослей (Wang, C. et al. 2018).

В Таблице 11 приведена продуктивность микроводорослей для различной продолжительности культивирования.

Таблица 11 - Влияние продолжительности культивирования на продуктивность биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов.

Название штамма	Продуктивность биомассы, г/л		
	7 дней	14 дней	21 день
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,68	0,72	0,47
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,78	0,79	0,65
<i>Haematococcus pluvialis</i>	0,64	0,69	0,37
<i>Botryococcus braunii</i>	0,75	0,80	0,29
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,76	0,79	0,52
<i>Neochloris cohaerens</i>	0,73	0,75	0,67
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	0,68	0,73	0,53

Как видно из Таблицы 11 максимальное накопление биомассы наблюдалось к 14-му дню.

В целом, скорость роста фотосинтезирующих микроорганизмов увеличивается с увеличением интенсивности перемешивания, но при превышении некоего оптимального уровня рост резко снижается, что, видимо, связано с механическим повреждением клеток. В исследовании на примере микроводоросли *Isochrysis galbana* было показано, что продуктивность биомассы при культивировании с перемешиванием в два раза выше по сравнению с культивированием без перемешивания (Sanchez, Á. et al. 2013).

В Таблице 12 приведены показатели продуктивности микроводорослей в зависимости от скорости перемешивания.

Таблица 12 - Влияние скорости перемешивания среды на продуктивность биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов.

Название штамма	Продуктивность биомассы, г/л		
	0 об/мин	50 об/мин	100 об/мин
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,24	0,66	0,32
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,39	0,62	0,42
<i>Haematococcus pluvialis</i>	0,26	0,59	0,33
<i>Botryococcus braunii</i>	0,43	0,69	0,52
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,41	0,71	0,59
<i>Neochloris cohaerens</i>	0,23	0,63	0,67
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	0,36	0,70	0,55

Из Таблицы 12 видно, что рост биомассы микроводорослей замедляется при культивировании без перемешивания. При этом многие фотосинтезирующие микроорганизмы имеют тонкую клеточную стенку и могут быть крайне чувствительны к повышенным гидродинамическим нагрузкам, что видно по меньшим показателям продуктивности при перемешивании со скоростью 100 об/мин.

1.4 Способы культивирования микроводорослей

В зависимости от источника энергии и углерода различают три способа выращивания микроводорослей: фотоавтотрофный, гетеротрофный и миксотрофный. Фотоавтотрофный - наиболее часто используемый метод, в котором источником энергии является свет (как правило солнечный), а источником углерода - углекислый газ. При гетеротрофном культивировании микроводоросли, как правило, лишены освещения, а источником энергии и углерода являются органические молекулы. Миксотрофное культивирование - это метод, сочетающий оба предыдущих подхода. Микроводоросли выращивают при освещении в среде, исходно обогащенной органикой. По мере истощения органического углерода происходит переключение с гетеротрофного на фототрофный тип питания, с ассимиляции CO₂ из атмосферного воздуха. Кроме того, в случае гетеротрофного или миксотрофного способа выращивания микроводорослей высоки риски

контаминации другими микроорганизмами (Zhan, J. et al. 2017), (Rincon, S. M. et al. 2019). В Таблице 13 отражены характеристики методов культивирования микроводорослей.

Таблица 13 - Ключевые характеристики различных методов культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов.

Метод культивирования	Источник энергии	Источник углерода	Скорость накопления биомассы	Технология культивирования	Стоимость производства биомассы
Автотрофный	Свет	Углекислый газ	Низкая	Открытый фото-биореактор	Низкая
Гетеротрофный	Органические молекулы	Органические молекулы	Высокая	Биореактор	Средняя
Миксотрофный	Свет и органические молекулы	Углекислый газ и органические молекулы	Средняя	Закрытый фото-биореактор	Высокая

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 (Рисунок 5).

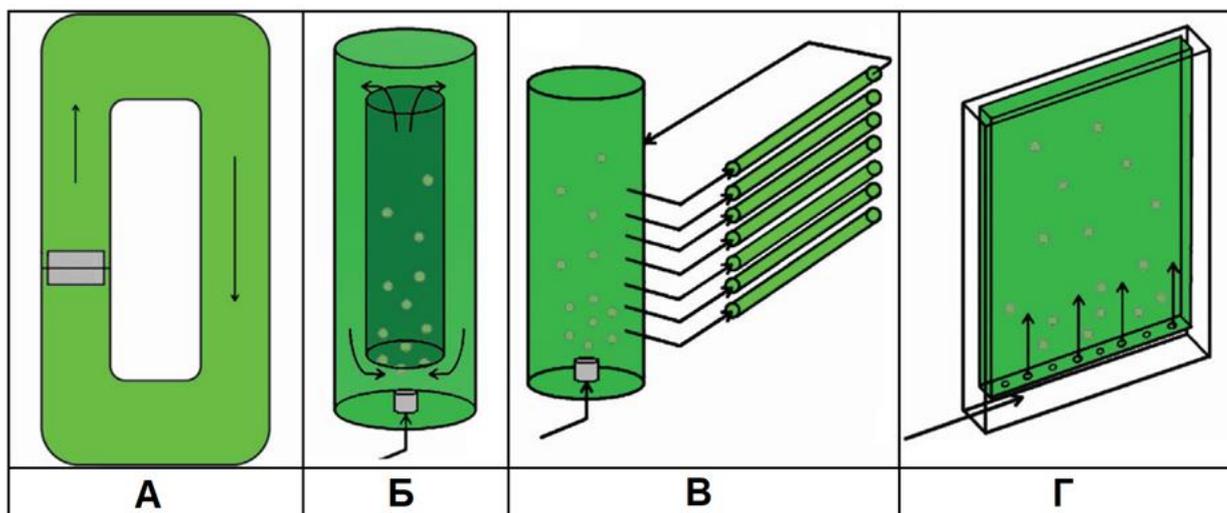


Рисунок 5 - Схематическое изображение различных систем культивирования микроводорослей. А - пруд с непрерывным движением, Б - колонный фотобиореактор с эрлифтом, В - трубчатый фотобиореактор, Г - панельный фотобиореактор.

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. C. et al. 2014), (Tan, B. Y. Q. et al. 2020).

Наиболее распространенным являются автотрофный метод культивирования, который реализуется в открытых или закрытых системах. При этом 90 % биомассы микроводорослей выращивается именно в открытых системах. Чаще всего это круглые, овальные или прямоугольные бассейны (2-10 м) небольшой глубины (15-30 см), реже - цементированные или выстланные пленкой траншеи, различной формы лотки, цистерны. Циркуляцию суспензии микроводорослей обеспечивают при помощи специального насоса, который нагнетает смесь воздуха с углекислотой в лопасти сегнерова колеса. В лопатках проделаны отверстия, через которые выходит смесь газов, разгоняющая лопасти, которые перемешивают взвесь микроводорослей (Lafarga, T. 2019).

Эти реакторы легко достраиваются, а инвестиционные и эксплуатационные затраты по масштабированию относительно невелики. К основным недостаткам систем открытого культивирования можно отнести сложность управления рядом важнейших параметров. Высокая вероятность контаминации другими микроводорослями и микроорганизмами, зависимость от погодных условий (освещенности, длины светового дня) и суточных колебаний температуры делают систему открытых прудов непригодной для крупномасштабного выращивания продуцентов высокомаржинальных продуктов (Zhan, J. et al. 2017), (Lafarga, T. 2019), (Deruyck, B. et al. 2019). Кроме того, сбор биомассы подразумевает остановку системы, что не позволяет делать культивирование непрерывным.

В свою очередь, закрытые фотобиореакторы обеспечивают возможность непрерывного культивирования и сбора биомассы более высокого качества. Благодаря использованию закрытых систем испарение жидкости сводится к минимуму, обеспечивая поддержания концентраций питательных веществ. При культивировании биомассы в закрытых фотобиореакторах контакт с окружающей средой минимален, следовательно, отсутствует опасность заражения. Перемешивание осуществляется с помощью механических или воздушных насосов. В процессе культивирования происходит накопление продуктов метаболизма клеток. Во избежание отравления культуры в некоторых фотобиореакторах предусмотрены системы отвода экзометаболитов - введение свежей питательной среды, отбор культуральной жидкости, применение мембран (Borowiak, D. et al. 2022). При этом, закрытые системы труднее масштабировать из-за их сложности конструкции и высокой стоимости, а уменьшение светопрозрачности по мере увеличения концентрации клеток является существенным ограничением (Morales-Sanchez, D. et al. 2017).

Самыми распространенными закрытыми конструкциями являются цилиндрические (барботажные и эрлифтные), плоскопанельные, трубчатые фотобиореакторы и реакторы с мешалкой. Фотобиореакторы с барботажем и эрлифтом работают по общему принципу - использование воздухораспределителя в нижней части аппарата для насыщения культуры углекислым газом и интенсификации массообмена. Однако есть и различия. Барботажный фотобиореактор представляет собой колонну, движение потока жидкости в которой осуществляется только за счет движения пузырьков, выпускаемых воздухораспределителем. Вблизи осевой области фотобиореактора из-за ослабления освещения в толще суспензии вследствие высокой концентрации клеток образуется «темная зона». Благодаря барботированию обеспечиваются циклы высокой интенсивности света, приближения к стенке и более низкой освещенности внутри колонны. При этом происходит поглощение углекислого газа, являющегося источником углерода в фотоавтотрофных культурах, и удаление образующегося кислорода, тормозящего фотосинтез. Преимущества: низкая себестоимость биомассы, простая конфигурация и хороший массообмен. Недостатки: образование «темных зон» (Narala, R. R. et al. 2016), (Borowiak, D. et. al. 2022).

Фотобиореактор с эрлифтом является усовершенствованной версией барботажного: данный тип реактора имеет внутри две взаимосвязанные зоны. Одна из них представляет собой вертикальный канал, а другая - зону распада пузырьков, что позволяет интенсифицировать циркуляцию суспензии и повышать эффективность фотосинтеза. В тнобиомассе, выращенной в эрлифтном реакторе, содержание астаксантина на 16 % больше, чем в барботажном. Также наблюдалась более высокая плотность клеток суспензии (Borowiak, D. et. al. 2022).

Трубчатые биореакторы представляют собой длинные прозрачные трубки (длиной от десятков до сотен метров) диаметром от 10 до 500 мм, изготовленные из стекла или пластика. Эти трубки организованы в вертикальные или горизонтальные сети для максимизации соотношения площади поверхности к занимаемому объему. Питательная среда и биомасса перекачиваются через систему труб с помощью насосов, а газообмен обычно осуществляется в отдельном устройстве. Среди преимуществ трубчатых реакторов можно выделить высокую эффективность использования света и относительную простоту масштабирования (Gupta, S. et al. 2015), (Johnson et al., 2006). Однако основным недостатком данного дизайна является низкая эффективность массо- и газообмена, что приводит к накоплению кислорода до уровней, вызывающих фотоингибирование. Кроме того, высокая нагрузка на насосы и сложность очистки внутренней поверхности труб от

биообрастания создают дополнительные проблемы в обслуживании и эксплуатации таких систем (Gupta, S. et al. 2015), (Tan, B. Y. Q. et al. 2020).

Панельные фотобиореакторы состоят из одной или нескольких прямоугольных емкостей 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, M. H. et al. 2006), (Norsker, N. H. et al. 2011). При использовании панелей из мягкого пластика, такие системы легко масштабируются до объемов в несколько тысяч литров (Johnson, M. H. et al. 2006). 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, M. H. et al. 2006). В Таблице 14 приведена примерная продуктивность биомассы в фотобиореакторах разных типов (Chinnasamy, S. et al. 2010).

Таблица 14 - Продуктивность в различных системах культивирования.

Тип фотобиореактора	Продуктивность, г/л/день
Фотобиореактор с барботажем	0,11 - 0,34
Фотобиореактор с эрлифтом	0,25 - 0,63
Трубчатый фотобиореактор	0,4 - 0,6

1.5 Подходы для повышения эффективности штаммов-продуцентов

Перед исследователями, работающими, изучающими биотехнологический потенциал фотосинтетических микроорганизмов, стоит ряд как фундаментальных, так и прикладных задач:

1. поиск новых штаммов-потенциальных продуцентов ценных соединений;
2. улучшение свойств имеющихся промышленных штаммов-продуцентов;
3. изучение влияния условий культивирования на содержание целевых метаболитов в клетках;

4. совершенствование систем культивирования микроводорослей для снижения затрат и увеличения выхода ценного продукта;
5. внедрение замкнутых производственных циклов, максимально полное использование полезных компонентов;
6. оценка экологических, экономических и медицинских рисков масштабирования производства.

Масштабный поиск оригинальных продуцентов при текущих методологических подходах имеет ряд существенных ограничений (Georgianna, D. R. et al. 2012), в связи с чем большая часть работ направлена на дальнейшее совершенствование биотехнологических свойств известных промышленных штаммов. Идеальный промышленный штамм должен сочетать высокую скорость роста биомассы, накопление ценного продукта, простоту и дешевизну культивирования. Некоторые дикие штаммы удовлетворяют одному или двум из этих критериев, но добиться оптимальной продуктивности путем простого перебора диких микроорганизмов практически невозможно.

Микроорганизмы, используемые в индустриальной биотехнологии, корректнее называть «клеточными фабриками» - искусственно созданными системами, в основе которых лежит в значительной степени модифицированные метаболические пути микроорганизма, позволяющие преобразовать возобновляемый субстрат в продукты, имеющие промышленное значение (Lee, S. Y. et al. 2019). Все методы создания штаммов можно разделить на две группы. Это рациональный дизайн, часто называемый метаболической инженерией, который подразумевает целенаправленную реорганизацию геномов. Метаболическая инженерия возможна при наличии знаний о метаболических путях биосинтеза нужного вещества, о регуляции этого пути и сопряженных с ним реакций в метаболической сети. Вторая группа методов, которую можно назвать комбинаторной, основана на введении множественных генетических изменений (мутаций) в геном и отборе из созданного разнообразия нужных вариантов. Метод очень трудоемок, но он не связан с наличием знаний о путях биосинтеза. Анализ отобранных продуктивных штаммов дает новые знания о генах, вовлеченных в сверхсинтез нужного вещества. К комбинаторным методам относятся классическая селекция, направленный мутагенез, часто называемый направленной лабораторной эволюцией, адаптивная лабораторная эволюция, шафлинг генов и геномов, т.е. объединение мутаций методами рекомбинации.

Для создания библиотек различных штаммов для отбора высокоэффективных штаммов могут использоваться различные методы: физический и химический мутагенез, включая ARTP, ультрафиолетовые, γ -лучи, EMS, NTG и т.д. (Рисунок 6А), адаптивная лабораторная эволюция (Рисунок 6Б), направленная эволюция, такая как ПЦР,

подверженная ошибкам, итеративный мутагенез насыщения (Рисунок 6В), стратегии случайной сборки генов (Рисунок 6Г).

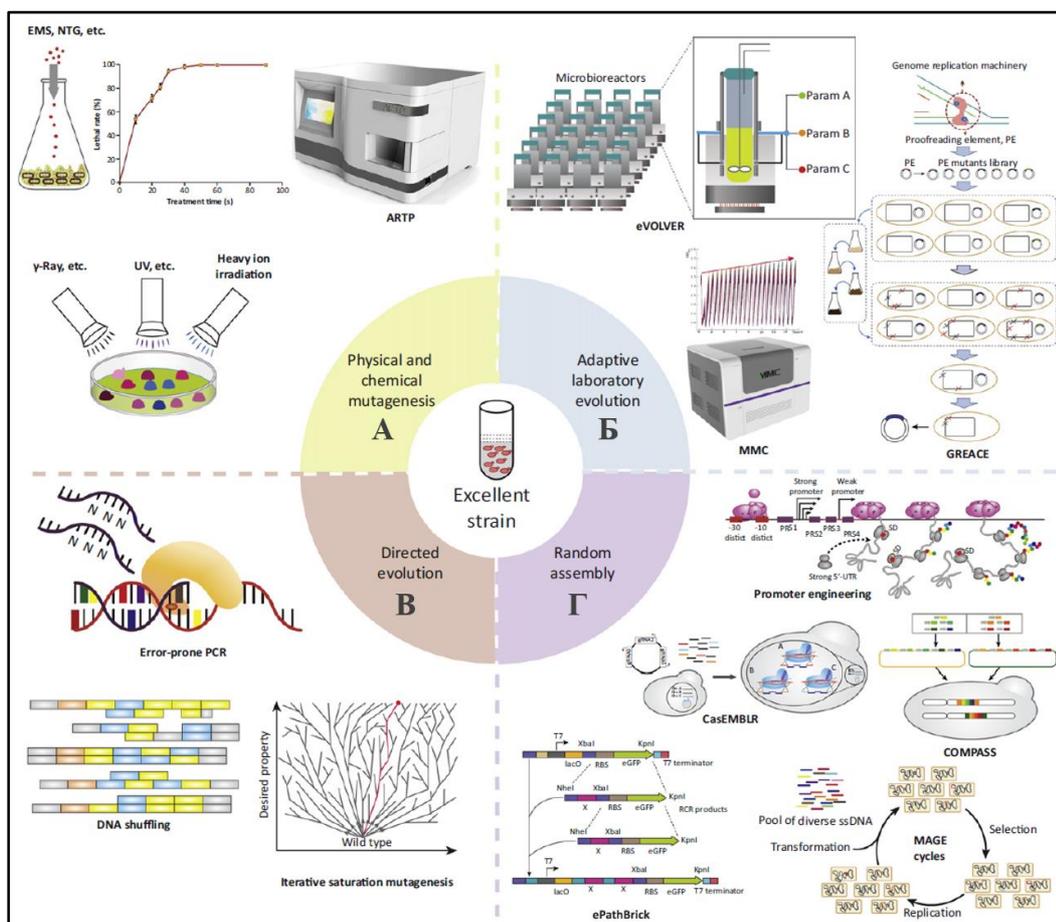


Рисунок 6 - Стратегии создания библиотек штаммов-продуцентов.

1.5.1 Ненаправленный мутагенез

Для получения более эффективных продуцентов необходимо увеличить частоту возникновения мутаций и создать давление условия отбора тех микроорганизмов, которые обладают нужным фенотипом. Частота мутаций может быть увеличена на несколько порядков с помощью различных мутагенов. При этом необходимо создать тысячи или даже десятки тысяч мутантов, чтобы охватить мутациями весь геном.

Химические и физические мутагены являются одними из наиболее широко используемых как в фундаментальной, так и в прикладной науке. Это связано с тем, что большинство из них легко применять и дозировать, а их мутагенный потенциал хорошо изучен.

Наиболее широко используемыми химическими мутагенами являются алкилирующие агенты, такие как: этилметансульфонат и метилнитронитрозогуанидин. Эти

соединения-мутагены были успешно использованы при создании нового эффективного продуцента эйкозапентаеновой кислоты из дикого штамма *Nannochloropsis oculata* (Chaturvedi, R. et al. 2006).

В качестве физических мутагенов, как правило, используют ультрафиолетовое или гамма-излучение, а также тяжелые металлы. Мутагенез посредством гамма-облучения был успешно использован для создания штамма-продуцента *Phaffia rhodozyma* с высоким содержанием астаксантина (Najafi, N. et al. 2011).

Хотя создание мутантных популяций может быть простой задачей, особенно в случае химического мутагенеза, последующий скрининг является одним из основных узких мест любой селекции. Иногда искомый фенотип может быть комплексным, включающим клетки большего размера, обладающие высокой скоростью роста, и в тоже время способные более эффективно накапливать определенный метаболит. Все это потребует применение специальных (и разных) протоколов скрининга.

Также существуют мутации, которые проявляются только при определённом изменении условий внешней среды. Типичным примером являются холодовые мутации генов, ответственных за клеточное деление. При низких температурах такие мутантные штаммы растут и делятся как микроорганизм с диким фенотипом. С увеличением температуры происходит блокировка клеточного цикла, и микроводоросль не может начать деление. В ранних работах было показано, что у 20 % таких мутантов *Chlorella vulgaris* при повышении температуры наблюдалось повышенное накопление нейтральных липидов, а также изменение жирнокислотного состава (Yao, S. et al. 2012).

Следует отметить, что такой температурный переключатель экономически не оправдан при культивировании микроводорослей в открытых или полужакрытых фотобиореакторах. Таким образом, такие температура-зависимые мутанты целесообразно использовать только в закрытых фотобиореакторах, в помещениях с контролируемой температурой для производства соединений с высокой добавленной стоимостью.

Мутагенез при помощи химических и физических агентов, с последующей селекцией по фенотипическим признакам, может применяться для улучшения свойств любых штаммов. При этом, последние не будут считаться ГМО. Однако спектр продуктов, получаемых при таком подходе, ограничен природными обычными метаболитами микроводорослей: липиды, каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты.

1.5.2 Направленный мутагенез

Целью направленного мутагенеза является изменение уровня экспрессии гена для изучения функции или, если последняя известна, получение мутанта с заданными свойствами. Направленный мутагенез приводит к изменению уровня экспрессии гена-мишени. Для снижения экспрессии гена обычно применяют технологию РНК-интерференции (De Riso, V. et al. 2009). Инактивация гена может быть достигнута при помощи делеционного или инсерционного мутагенеза (Fujiwara, T. et al. 2013). Для повышения экспрессии гена проводят частичную или полную модификацию промоторной области (Fischer, N. et al. 2001).

На сегодняшний день для внесения специфических точечных мутаций у микроводорослей применяют нуклеазы на основе белков, содержащих домен «цинковые пальцы» или эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции tALen (transcription Activator-Like effector nucleases). При этом в литературе описано небольшое число штаммов, модифицируемых вышеописанными методами: *C. reinhardtii* (Sizova, I. et al. 2013) и *P. tricornutum* (Daboussi, F. et al. 2014).

Несмотря на активное применение мутагенеза с последующей селекцией, в том числе в фундаментальных исследованиях микроорганизмов, обнаружение перспективного с точки зрения промышленной биотехнологии мутанта является по-прежнему редкостью. В качестве успешного примера можно привести работу, в которой путем инсерционного мутагенеза *C. reinhardtii* был создан мутантный штамм, практически не способный накапливать крахмал (Zabawinski, C. et al. 2001). У данного штамма была повреждена малая субъединица фермента аденозиндифосфат-глюкоза пирофосфорилаза.

В целом, на данный момент существует крайне ограниченное число видов микроводорослей, для которых разработаны протоколы направленного мутагенеза. В основном это те виды, которые использовались для фундаментальных исследований: из зеленых микроводорослей - *C. reinhardtii* и *Ostreococcus tauri*, из красных - *Cyanidioschyzon merolae*, а также диатомовые водоросли *Phaeodactylum tricornutum* или *Thalassiosira pseudonana* и гетероконтные - *Nannochloropsis sp.*

Специфическим для растительных организмов способом получения мутантов является генная модификация при помощи вектора на основе Ti-плазмиды (Tumor inducing - опухоль-индуцирующей), полученной из *Agrobacterium tumefaciens*. Встраивания Т-ДНК в геном осуществляется случайным образом в различные участки генома растений посредством негомологичной рекомбинации. Ключевую роль в инсерции Т-ДНК играют

фланкирующие последовательности, представленные несовершенными прямыми повторами по 24-25 пар нуклеотидов.

Случайное встраивание T-ДНК, как правило, приводит к нокауту соответствующих генов, позволяя, таким образом, выяснить их функции. В T-ДНК-вектор могут быть встроены целевые и селективные (маркерные) гены. Маркерные гены служат для быстрого и эффективного отбора трансформированных клеток, у которых произошла встройка чужеродной ДНК в ядерный или хлоропластный геномы.

При помощи этой технологии была получена библиотека *Arabidopsis thaliana*, включая 225 000 различных мутантов. Это позволило покрыть нокаутами почти 96,6 % генома *A. thaliana* (Alonso, J.M. et al. 2003).

Несмотря на то, что технология T-ДНК применима скорее для высших растений, инсерционный мутагенез является распространенным подходом к изучению функции генов у микроводорослей (Gonzalez-Ballester, D. et al. 2011), (Jungnick, N. et al. 2014). Недавно подобная *A. thaliana* библиотека мутантов была получена для *C. reinhardtii* (Zhang, R. et al. 2014). Кроме того, из этой библиотеки был выделен мутант, который более эффективно накапливал липиды по сравнению с исходным штаммом (Terashima, I. et al. 2014).

1.5.3 Методы обратной генетики и синтетической биологии

Синтетическая биология - междисциплинарная наука, находящаяся на пересечении биологии, химии и инженерии. Задачей синтетической биологии является создание живых систем с заданными свойствами и функциями, в том числе и не имеющих аналогов в природе (Benner, S. A. et al. 2003). Микроводоросли являются крайне привлекательными объектами метаболической инженерии из-за относительной простоты и дешевизны культивирования, большому разнообразию синтезируемых метаболитов (Hoskin, N. L. et al. 2012).

Методы обратной генетики и синтетической биологии позволяют ввести ген, отвечающий за желаемый признак штамма-продуцента. Введение новых или гетерологичных генов может позволить микроводорослям синтезировать различные рекомбинантные белки, вакцины и иные метаболиты (Rasala, B. A. et al. 2014). К примеру, уже более 10 лет микроводоросль *C. reinhardtii* используется в качестве «клеточной фабрики» для синтеза линейки рекомбинантных белков (Jones, C. S. et al. 2013), (Zedler, J. AZ. et al. 2016). При этом, применение методов синтетической биологии в случае микроводорослей ограничено, прежде всего, малым арсеналом методов обратной генетики.

Для выявления внутриклеточных мишеней необходимо глубоко понимать, как построен метаболический путь, а точнее метаболическая сеть синтеза интересующего биотехнолога метаболита. Кроме того, часть метаболических цепочек может существенно перестраиваться в зависимости от условий культивирования микроорганизма (Valledor, L. et al. 2013). Важно отметить, что с точки зрения текущей нормативной базы, все полученные таким образом микроводоросли будут классифицированы как ГМО.

Обратная генетика и синтетическая биология требуют специальных знаний о геноме и метаболоме микроорганизмов, больших затрат времени и финансов. Однако этот подход позволяет наработать крайне специфические соединения, получение которых в других живых системах либо невозможно, либо обходится намного дороже. Таким образом, перечень продуктов для фармацевтики и медицины, получаемых из микроводорослей, может быть существенно расширен.

1.6 Высокопроизводительный скрининг штаммов

У любого подхода, связанного с генетической модификацией промышленного штамма, есть два ограничения: скрининг и масштабирование. Независимо от происхождения продуцента - дикий ли это штамм или микроорганизм, полученный в результате мутагенеза - его биотехнологическая ценность станет понятна лишь при переходе к промышленному культивированию. Продуктивность штамма в лабораторных условиях почти никогда не достигается при переходе к промышленному масштабу, влияет изменения ряда параметров в сторону субоптимальных значений (интенсивность освещения, температура, состав микроэлементов и др.). Кроме того, мутантный штамм должен быть генетически-стабильным, то есть не утрачивать полезные признаки в ходе роста и деления.

Высокопроизводительный скрининг (High Throughput Screening, HTS) является важным методом в промышленной биотехнологии, так как позволяет проводить тотальный поиск микроорганизмов с искомыми признаками. Для повышения эффективности HTS используются различные методы детекции целевого штамма (Рисунок 7). По сравнению с традиционным скринингом, масштаб и эффективность HTS обеспечивается технологиями автоматизированные системы переноса отдельных колоний, флуоресцентно-активируемой системой сортировки клеток, капельной микрофлюидики и др.

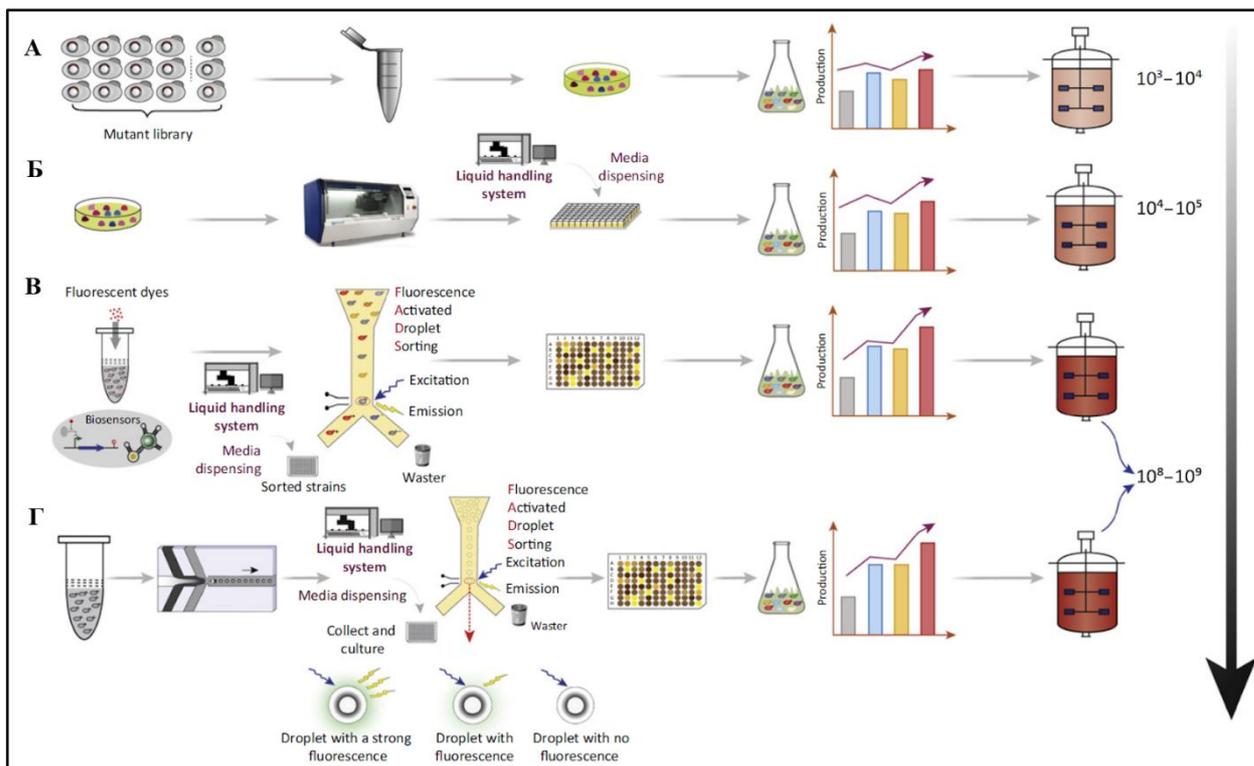


Рисунок 7 - Сравнение различных систем скрининга штаммов-продуцентов: А - традиционный скрининг, Б - высокопроизводительный скрининг, основанный на автоматизации сбора колоний, В - ультра высокопроизводительный скрининг (uHTS), основанная на сортировке отдельных флуоресцирующих клеток, Г - uHTS, основанный на сочетании сортировки отдельных флуоресцирующих клеток и микрофлюидике. Стрелкой указано увеличение эффективности (High-Throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology. 2020 URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32005372/>).

В основе HTS лежит использование высокоточной и высокопроизводительной технологии. Микропланшетные ридеры являются наиболее часто используемым оборудованием для HTS. Современные приборы включают многометочный ридер, который может детектировать поглощение, флуоресценцию и хемилюминесценцию в диапазоне длины волны от 200 до 1000 нм (Swasey, S. M. et al. 2018). Этот подход широко применяется для обнаружения отдельных внутриклеточных метаболитов, активности ферментов и др. (Hanson, K. M. et al. 2019). Кроме того, разработаны устройства, которые могут обнаруживать широкий спектр химических веществ при помощи рамановской спектроскопии (Schie, I. W. et al. 2018), ИК-излучения с преобразованием Фурье (Yu, X.-J. et al. 2019) и ближнего ИК-спектра (Morita, H. et al. 2014). Некоторые из этих устройств получили дальнейшее развитие для высокопроизводительной детекции, анализа и сортировки одиночных клеток за счет использования флуоресцентно-активируемой сортировки клеток (FACS), микрофлюидики и оптических пинцетов (He, Y. et al. 2019).

Автоматизация является важной особенностью HTS и основой для проведения широкомасштабного поиска. Высокопроизводительный скрининг может включать целую серию непрерывных автоматизированных операций. Оборудование, используемое для HTS, в основном включает в себя сборщик колоний, систему подачи жидкости и многофункциональный микропланшетный ридер, который находится под управлением программного комплекса (Dörr, J. M. et al. 2016). Кроме того, для интеграции в систему HTS был модифицирован или переработан ряд дополнительных устройств, включая ПЦР-машины, центрифуги, холодильники, системы стерилизации и упаковки.

Проточная цитометрия позволяет быстро проанализировать множество параметров одной клетки и быстро классифицировать целевые группы по нескольким параметрам. С помощью FC можно точно определить информацию о клетках, включая плотность и размер клеток, внутреннюю сложность и другие сигналы флуоресценции. Проточная цитометрия является перспективным методом для HTS благодаря своей способности выполнять одновременный количественный и качественный анализы (Stavrakis, S. et al. 2019). FACS, оснащенный проточной цитометрией, был разработан для скрининга клеток-мишеней на уровне отдельных клеток с высокой чистотой и производительностью. Появилась серия коммерческих приборов FACS, которые стали незаменимым инструментом в фундаментальных биологических исследованиях и промышленном применении. FACS хорошо известен своей сверхвысокой скоростью сортировки, достигающей 10^6 ячеек в секунду. Однако основным недостатком FACS является его высокий неспецифический фон, и штаммы, прошедшие FACS-скрининг, нуждаются в дополнительном повторном скрининге с помощью процесса HTS на основе микропланшетов.

Большинство целевых продуктов в промышленной биотехнологии - это внеклеточные продукты, которые избегают подавления внутриклеточной обратной связи, а также могут выдерживать последующую обработку. FACS можно использовать только для анализа внутриклеточных или мембраносвязанных продуктов, которые генерируют сигналы флуоресценции, коррелирующие с целевыми соединениями, а использование FACS для анализа внеклеточных продуктов является сложной задачей. Микрофлюидная FACS, которая сочетает в себе микрофлюидику и сортировку клеток, может преодолевать ограничения традиционных FACS и вызывать значительный интерес благодаря своим экономически эффективным методам идентификации и разделения (Qin, Y. et al. 2019). Микрофлюидика - это технология работы с жидкостями в масштабе от микролитра до пиколитра. В технологии микрофлюидики обычно используется микрожидкостный чип, на основе которого была разработана микрожидкостная система для независимого анализа отдельных ячеек. Микрофлюидика нашла несколько областей применения, таких как

скрининг фенотипов избыточного потребления/секреции и направленная эволюция ферментов, учитывая его преимущества, которые включают высокую чувствительность, количественное определение и точность (Wang, B. L. et al. 2014).

Использование подложек, генерирующих сигналы флуоресценции, пропорциональные концентрации продукта, может облегчить FACS-анализ упакованных капель. Эффективность скрининга микрофлюидных систем на основе капель при этом будет значительно повышена за счет их сочетания с передовыми методами флуоресцентной маркировки и сортировки. Кроме того, некоторые методы обнаружения, такие как масс-спектрометрия, рамановская спектроскопия и капиллярные методы, могут быть интегрированы в микрофлюидную систему для дальнейшего расширения универсальности процедуры скрининга (Chen, P. et al. 2019a). До недавнего времени наиболее очевидным недостатком метода микрожидкостных капель было то, что скорость инкапсуляции для получения однородных капель составляла около 10^3 - 10^4 об/с, что намного ниже, чем у FACS. Специально разработанные микрожидкостные чипы и высокоэффективные поверхностно-активные вещества, стабилизирующие капли, могут решить эту проблему (Sesen, M. et al. 2017).

Были использованы различные стратегии, чтобы выделить целевые продукты для создания HTS для скрининга высокоэффективных продуцентов (Рисунок 8).

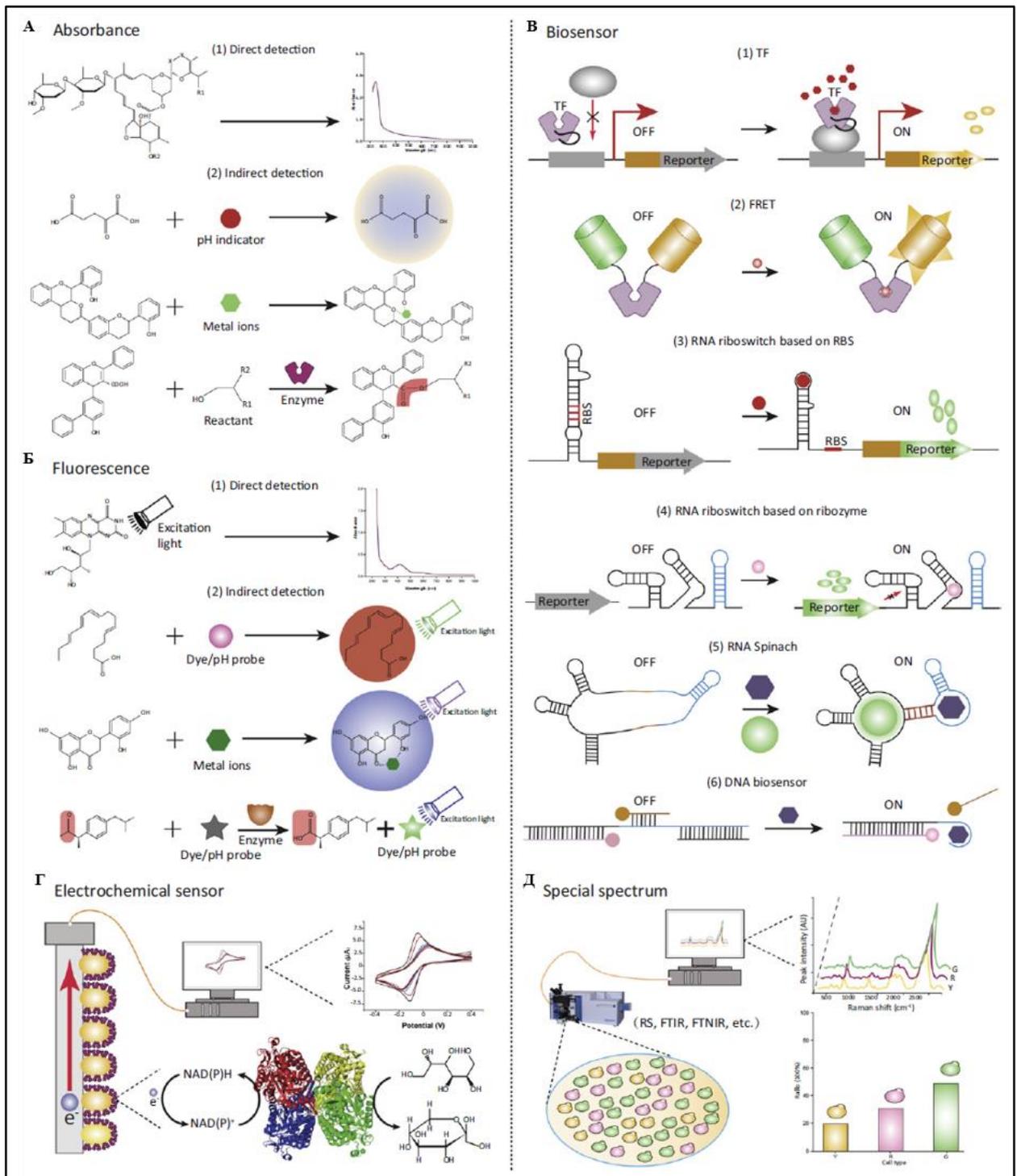


Рисунок 8 - Различные методы детекции, лежащие в основе высокопроизводительного скрининга штаммов (High-Throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology. 2020. URL:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32005372/>).

Они разделены на стратегии, основанные на поглощении, которые включают (1) прямое определение, основанное на молекулярной структуре или врожденных свойствах цвета целевого продукта, (2) косвенное определение, например, путем добавления индикатора pH, хелатирования ионами металлов и сочетания с ферментативными или

химические реакции (Рисунок 8А); стратегии, основанные на флуоресценции, которые включают (1) прямое определение, основанное на естественной флуоресценции целевого продукта, (2) не прямое определение с использованием красителя/pH-зонда, иона металла и соединения с ферментативной или химической реакцией (Рисунок 8Б); стратегии, основанные на электрохимических датчиках (Рисунок 8В); стратегии, основанные на биосенсорах, включая (1) факторы транскрипции (TFs), (2) флуоресцентные белки (FPs) и детекция с помощью резонансного переноса энергии Ферстера (FRET), (3) рибопереключател РНК, основанный на связывании рибосом сайты (RBS), (4) РНК-рибопереключател на основе рибозимов, (5) РНК Spinach; (6) ДНК-биосенсор (Рисунок 8Г); специальные стратегии, основанные на использовании спектра, такие как комбинационное рассеяние (RS), ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR) и ближняя ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTNIR) (Рисунок 8Д).

Для практического использования HTS были разработаны многочисленные методы скрининга, основанные на УФ-видимой спектроскопии. Вещества с относительно сложной молекулярной структурой или врожденными красящими свойствами могут быть отобраны путем прямого измерения оптической плотности. Некоторые продукты, которые не имеют очевидных характеристик поглощения для прямого определения, могут быть обнаружены с помощью индикаторов pH, хелатирования ионами металлов или взаимодействия с ферментативными или химическими реакциями. Например, если штамм накапливает один тип органической кислоты в качестве целевого продукта, можно провести процедуру скрининга, добавив подходящие показатели pH (Zeng, W. et al. 2015). Низкий уровень pH не только указывает на то, что штамм накапливает больше органических кислот, но и показывает, что штамм способен переносить более низкий уровень pH.

Для более точного обнаружения целевой органической кислоты, такой как пировиноградная кислота, можно провести скрининг путем добавления хелатирующего иона, который образует обнаруживаемый желтый комплекс (Luo, Z. et al. 2017). Кроме того, были разработаны методы скрининга, основанные на химических или сопряженных ферментативных реакциях, которые устанавливают количественную зависимость между концентрацией целевого метаболита и хромогенными веществами, такими как АТФ/АДФ и НАД(P)⁺ (Agu, C. V. et al. 2018).

Аналогично HTS на основе УФ/видимой спектроскопии, HTS на основе флуоресцентной спектроскопии можно разделить на прямые и косвенные методы обнаружения в зависимости от характеристик целевого продукта. Например, рибофлавин имеет длину волны возбуждения/испускания флуоресценции 450/518 нм, а мутанты

Yarrowia lipolytica с повышенной продукцией рибофлавина могут быть отобраны на основе интенсивности флуоресценции при 518 нм (Wagner, J. M. et al. 2018).

Методы, основанные на химических или связанных с ферментами реакциях, которые генерируют флуоресцентные сигналы, также широко используются для эффективного отбора улучшенных промышленных микроорганизмов (Debon, A. et al. 2019). HTS, основанная на флуоресценции, позволяет достичь ультравысокой производительности, поскольку позволяет увеличить скорость и уменьшить масштаб, сравнимые с FACS. Флуоресцентная спектроскопия может быть дополнительно расширена до HTS на основе биосенсоров (Dekker, L. et al. 2017).

Биосенсор состоит из сенсора и репортера. Сенсор идентифицирует специфические внутриклеточные метаболиты, в то время как «репортер» генерирует количественные сигналы с помощью ряда запрограммированных генетических цепей, связанных с сигналом сенсора. На основе этого принципа была разработана серия биосенсоров для HTS. Биосенсоры обычно бывают двух типов - биосенсоры на основе белков и биосенсоры на основе нуклеиновых кислот. Большинство биосенсоров на основе белков основаны на факторах транскрипции (TFs) и модифицированных флуоресцентных белках (FPs), в то время как биосенсоры на основе нуклеиновых кислот в основном включают рибопереклюатели РНК (Lim, H. G. et al. 2018b).

Транскрипционные факторы - это природные сенсорные белки, которые связываются с энхансерными или промоторными участками генов-мишеней и регулируют их экспрессию в ответ на изменения окружающей среды или ключевые внутриклеточные сигналы. Биосенсоры на основе транскрипционных факторов стали одним из наиболее распространенных и ценных типов биосенсоров и широко используются для определения содержания метаболитов, включая аминокислоты, органические кислоты, флавоноиды, сахара и липиды. Область применения биосенсоров на основе транскрипционных факторов еще больше расширилась благодаря созданию гибридных или объединенных транскрипционных факторов *in vitro* (Silverman, A. D. et al. 2018). Флуоресцентный белок также может быть сконструирован для обнаружения специфических метаболитов путем введения лигандсвязывающего домена. Хотя биосенсоры на основе флуоресцентных белков использовались в нескольких различных режимах, о применении биосенсоров на основе флуоресцентных белков для HTS промышленных микроорганизмов сообщалось редко.

Рибопереклюатели РНК, нацеленные на регуляторный домен мРНК, могут обнаруживать различные метаболиты с помощью РНК-аптамерных доменов, тем самым регулируя транскрипцию и трансляцию кодируемого белка. Бактериальные и

эукариотические биосенсоры на основе сайтов связывания рибосом и рибозимов широко используются для скрининга метаболитов и создания штаммов, особенно *E. coli* и *S. cerevisiae*. Кроме того, ДНК-биосенсоры были разработаны для определения метаболитов, однако они редко применялись для HTS в промышленной биотехнологии (Lim, H. G. et al. 2018b). Тем не менее, HTS на основе биосенсоров является растущей тенденцией в создании промышленных микроорганизмов.

Устройства на основе электрохимических датчиков (ES) основаны на изменении электрического тока, генерируемого биохимическими реакциями, протекающими на поверхности электрода. Electrode Electrochemical Sensors обладают значительными преимуществами, поскольку они чрезвычайно чувствительны и селективны в отношении своих мишеней, демонстрируют быструю реакцию и обладают потенциалом миниатюризации (Yousefi, M. et al. 2019). Они включают в себя элемент биологического распознавания (сенсор) и преобразователь, который преобразует биологическую реакцию в измеримый электрохимический сигнал (репортер). Устройства электрохимических датчиков обычно бывают четырех типов в зависимости от используемой электродной технологии: амперометрические, потенциометрические, кондуктометрические и импедиметрические. В HTS методы электрохимических сенсоров были использованы для повышения активности ферментов, связанных с NAD(P)H или H₂O₂, в основном оксидоредуктаз (Aumard, C. et al. 2017). Однако лишь в немногих исследованиях рассматривалось их применение для обнаружения конкретных ферментированных продуктов в промышленной биотехнологии.

Для повышения эффективности сортировки и получения промышленных штаммов с конкретными целевыми фенотипами в биотехнологии применяются спектроскопические методы, основанные на передовых инструментальных платформах, таких как рамановская спектроскопия, ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR) и ближняя ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTNIR). Рамановская спектроскопия основана на эффекте комбинационного рассеяния света и обладает преимуществами быстрого, чувствительного, неразрушающего обнаружения в режиме реального времени. Недавно была создана платформа рамановской спектроскопии HTS для скрининга одиночных клеток без меток (Wang, C. et al., 2017) и биокатализаторов (Westley, C. et al. 2016). Подобно рамановской спектроскопии, ИК- и ИКТ-спектроскопия также являются неразрушающими аналитическими методами с преимуществами высокой производительности и быстрого и автоматизированного обнаружения. Эти два аналитических метода были использованы для скрининга *Aurantiochytrium sp.*, *Mucor sp.* и *S. cerevisiae* (Kosa, G. et al. 2017). Эти спектроскопические методы и их передовые технологии получения изображений,

интегрированные с конфокальной лазерной сканирующей микроскопией, обладают большим потенциалом в области промышленной HTS.

Технологии HTS, основанные на микропланшетах, улучшили как автоматизацию, так и производительность получения промышленных микроорганизмов с лучшими фенотипами, что привело к снижению трудоемкости и повышению эффективности рабочих процессов. Методы HTS, основанные на FACS и микрофлюидике, в сочетании с различными флуоресцентными зондами и биосенсорами значительно повысили эффективность скрининга - со 10^5 до 10^{11} в день. Эти передовые методы расширяют возможности скрининга и улучшают распознавание целевых продуктов. Однако фермент, содержащий 1000 аминокислотных остатков, теоретически может генерировать до 19^{1000} вариантов, а текущая производительность скрининга намного ниже этого показателя. Дальнейшее расширение диапазона скрининга микроорганизмов сталкивается с многочисленными проблемами, и важной целью является разработка методов скрининга, которые были бы более эффективными, чем методы, основанные на FACS, с использованием нанотехнологий и электронных технологий. Нанотехнологии - это развивающаяся технология, в которой нанопоры и нанозонды используются для анализа опухолевых клеток и патогенных бактерий. В сочетании с микрофлюидикой и другими методами измерения эти технологии обладают огромным потенциалом для создания более чувствительных биосенсорных систем для скрининга большего разнообразия метаболитов или ферментов и дальнейшего повышения эффективности скрининга.

Многие эффективные аналитические методы, особенно те, которые основаны на биосенсорах, были успешно использованы в HTS для выделения микробных штаммов с улучшенной производительностью. Однако эти стратегии подходят только для конкретных целевых продуктов. Разработки в области синтетической биологии и инструментов для редактирования генома, вероятно, расширят возможности биосенсоров, которые будут специфически реагировать на более широкий спектр малых молекул. Кроме того, поскольку характеристики промышленных микроорганизмов в каплях и микропланшетах могут отличаться от таковых в биореакторах, надежный процесс масштабирования, который может имитировать условия промышленного масштаба, будет иметь жизненно важное значение для обеспечения более точных конечных результатов скрининга. В связи с этим, достижения в области искусственного интеллекта и появление больших объемов биологических данных произведут революцию в существующих системах скрининга и еще больше снизят затраты на HTS.

При этом стоит отметить, что высокопроизводительные технологии, интенсивные вычисления и биоинформатический анализ, а также обширный исследовательский интерес

могут генерировать высококачественные данные по микроводорослям (Kumar, G. et al. 2020). Геномные и транскриптомные данные модельных организмов обеспечивают базовое понимание биосинтетического пути (Рисунок 9).

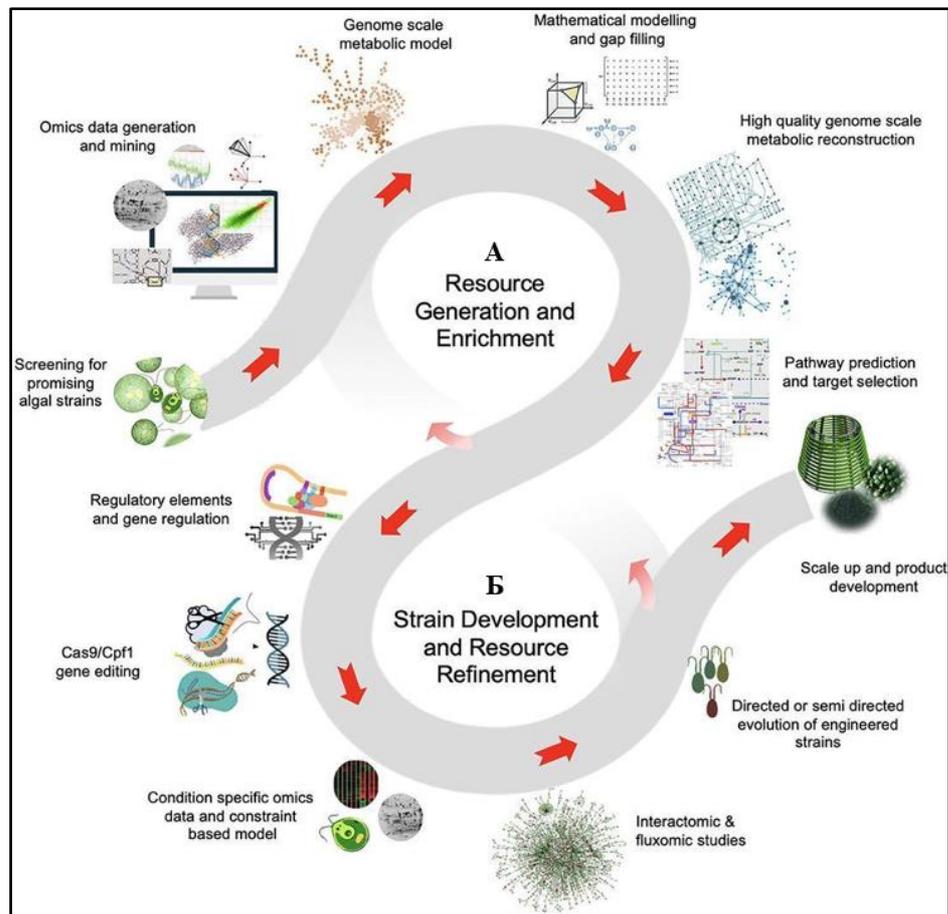


Рисунок 9 - Схема стратегии, основанной на данных и ресурсах, для биоинженерии микроводорослей (Kumar G. et al. 2020).

Эта важная информация подкреплена протеомикой и метаболомикой, которые предлагают функциональные идеи для открытия биопродуктов в микроводорослях. Выводы из метаболических моделей и использование современных технологий, таких как редактирование генома и высокопроизводительный отбор вариантов, могут быть использованы для разработки штамма микроводорослей. Часто сдвиги метаболического потока мутантов подразумевают эволюцию организма для оптимизации перестройки потока. Целью сдвига баланса потока может быть производство биомассы или улучшенное производство желаемого продукта. Более того, информация, полученная в результате экспериментов по точному моделированию и геномному редактированию, создает ресурсные пути для дальнейших открытий.

1.7 Технологические платформы в биомедицине

Тенденция к переходу на платформенные решения в области биотехнологий становится все более выраженной в последние годы. Данный сдвиг обусловлен множеством факторов и предлагает ряд значительных преимуществ:

1. **Интеграция технологий:** платформенные решения обеспечивают интеграцию различных технологических направлений, таких как геномика, протеомика и метаболомика, что способствует более глубокому пониманию биологических процессов и ускоряет разработку новых терапевтических подходов.

2. **Ускорение разработки:** применение платформенных подходов позволяет существенно сократить временные рамки от концепции до коммерческого продукта. Это достигается за счет возможности параллельного выполнения множества исследований и тестирований на единой платформе.

3. **Снижение затрат:** платформенные решения могут уменьшить расходы на исследования и разработки благодаря стандартизации процессов и автоматизации, что делает их более доступными для компаний различного масштаба.

4. **Универсальность:** платформы могут быть адаптированы под различные биомедицинские области, что позволяет исследователям легко переключаться между проектами и использовать уже существующие наработки.

5. **Сбор и анализ данных:** платформенные решения часто включают мощные инструменты для сбора и анализа данных, что позволяет исследователям извлекать ценные инсайты и принимать обоснованные решения.

6. **Сотрудничество и экосистемы:** переход к платформенным решениям способствует созданию экосистем, в которых компании, исследовательские институты и стартапы могут взаимодействовать, обмениваться данными и ресурсами, что усиливает инновационные процессы.

1.7.1 Технологические платформы в биомедицинской сфере

С 2019 по 2021 годы венчурные компании инвестировали более 52 миллиардов долларов в биотехнологические компании, работающие над созданием новых терапевтических средств. Две трети сделок были заключены стартапами, работающими с платформенными технологиями (Leclerc, O. et al. 2022). Платформенные решения в

биомедицине представляют собой такой тип технологии, который можно многократно использовать для разработки новых продуктов или сервисов. В отличие от традиционных подходов, нацеленных на разработку одного препарата, платформенные решения за тот же период времени могут создавать множество новых терапевтических молекул, предлагая непрерывный поток инноваций.

Платформы как правило имеют ряд общих признаков (Chang, L. et al. 2021):

1) Наличие дифференцированной якорной технологии, которая собственно и позволяет генерировать новые продукты или сервисы.

Технология может быть фундаментальным научным открытием, которое приносит принципиально новое знание (например, RNAi и CRISPR-Cas9), или инженерным изобретением, которое расширяет инструментарий ученого (например, CAR-T и технологии рекомбинантной ДНК).

2) Патентная защищенность ключевой технологии.

Патентная защита ключевой технологии является важным свойством биомедицинской платформы, обеспечивая ряд критически важных аспектов. Классическим примером является технология генетического редактирования CRISPR/Cas9. Любые продукты, созданные при помощи этой технологии, требуют дополнительного лицензирования.

3) Масштабируемость.

Платформенные технологии могут быть использованы для создания препаратов или терапий для множества заболеваний. Например, одна и та же технология может быть адаптирована для лечения различных типов рака или наследственных заболеваний.

Разработка новой терапии на базе уже существующей платформы часто требует меньших финансовых и временных затрат по сравнению с созданием продукта с нуля. Например, платформа для доставки лекарств может быть адаптирована для использования новых активных веществ или методов доставки. Масштабируемость также подразумевает возможность интеграции различных научных дисциплин, таких как генетика, биоинформатика и материаловедение, что способствует разработке более комплексных и эффективных решений.

К конкретным примерам биотехнологических платформ можно отнести следующие (Leclerc, O. et al. 2022), (Zhou, W. et al. 2023):

- клеточная терапия CAR-T;
- генная терапия следующего поколения, основанная на генетическом редактировании;
- мРНК-вакцины;

- применение искусственного интеллекта для решения задач биомедицины;
- новые методы доставки лекарственных средств.

1.7.1.1 Клеточная терапия 2.0

Технология CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy) - это метод иммунотерапии, который использует модифицированные Т-клетки для борьбы с раком (Larson, R. C. et al. 2021).

Терапия CAR-T включает следующие этапы (Рисунок 10):

- 1) забор периферической крови пациента и выделение Т-клеток;
- 2) активация лимфоцитов и их трансдукция ретровирусным или лентивирусным вектором с геном рецептора CAR против эпитопа опухоли-ассоциированного антигена;
- 3) размножение модифицированных Т-клеток;
- 4) инфузия модифицированных лимфоцитов в организм пациента.

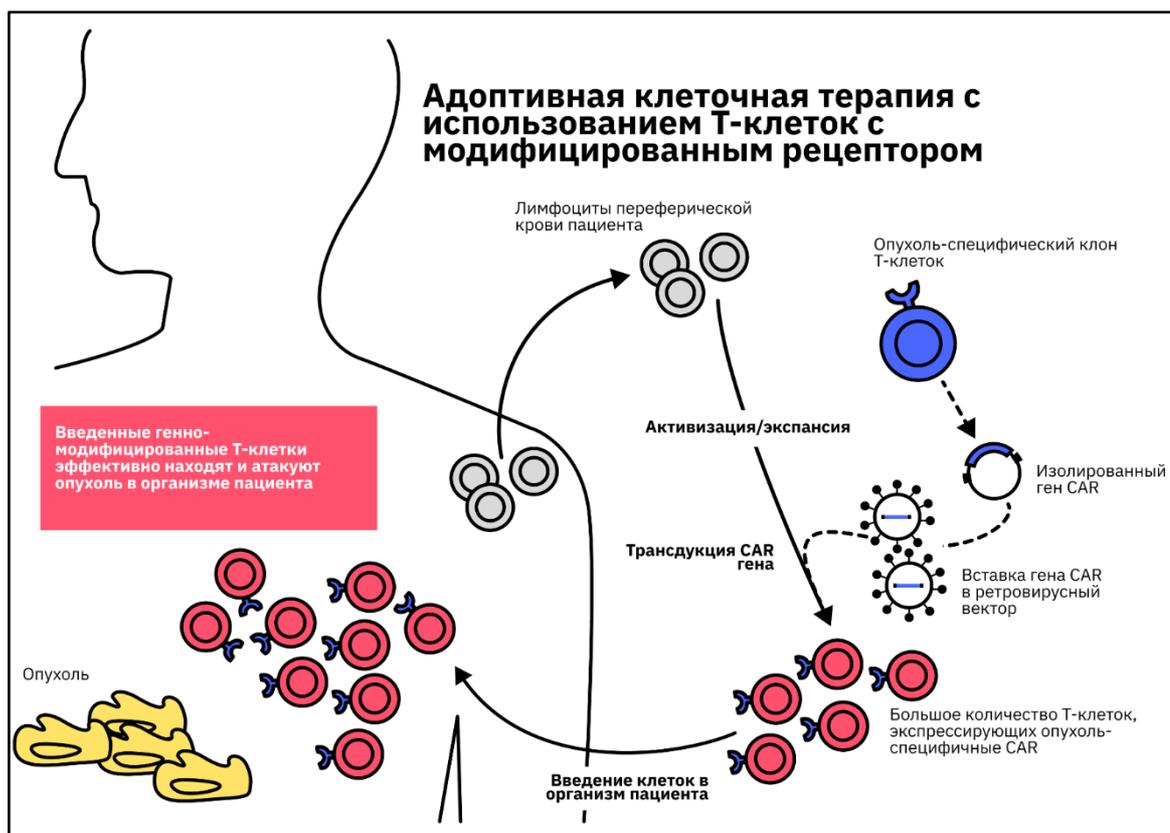


Рисунок 10 - Схема иммунотерапии модифицированными лимфоцитами. (Расина А. URL: <https://biomolecula.ru/articles/prokarioticheskii-naparnik-dlia-car-t-kletochnoi-terapii>).

Сам CAR состоит из нескольких структурных частей (Рисунок 11):

- 1) внеклеточной - распознает опухоль-ассоциированный антиген;
- 2) петлевой - задает размер образуемого синапса с эпитопом;
- 3) трансмембранной - определяет стабильность рецепторного комплекса в целом;
- 4) внутриклеточной - получает сигнал активации Т-клетки, увеличивает персистенцию CAR-T-клеток.

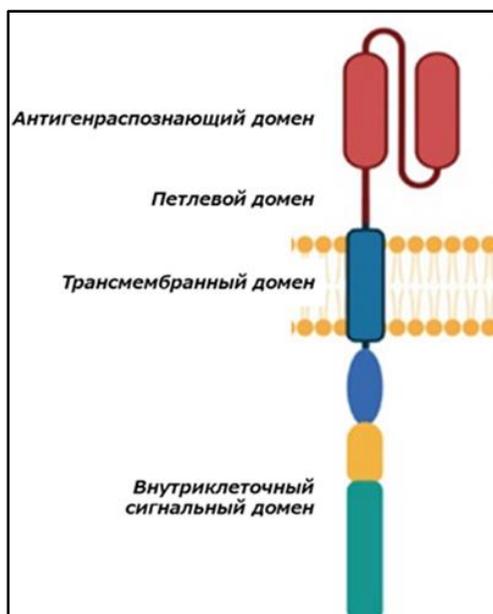


Рисунок 11 - Схема строения химерного антигенраспознающего рецептора (CAR) (Almåsbaek, H. et al. 2016).

CAR-T-клетки продемонстрировали высокую эффективность в лечении гематологических опухолей. С 2017 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило шесть CAR-T-терапий для борьбы с раком крови, включая лимфомы, некоторые виды лейкемии и множественную миелому. *Kymriah* (Тисагенлеклеусел) и *Yescarta* (Аксикабтаген цилолеусел) были первыми двумя первыми препаратами на основе CAR-T, одобренными для лечения пациентов в возрасте до 25 лет с острым В-клеточным лимфобластным лейкозом (ОВЛЛ), В-клеточной неходжкинской и фолликулярной лимфомами (Chen, Y. J. et al. 2023).

Генетически модифицированные Т-клетки, нацеленные на антиген CD19 В-лимфоцитов, успешно используются для лечения различных гематологических заболеваний, которые не поддаются традиционным методам терапии (Marcela, V., et al. 2014).

Несмотря на существенный прогресс, классическая CAR-T терапия имеет ряд ограничений. Внеклеточный сегмент CAR не взаимодействует с главным комплексом

гистосовместимости, функция которого заключается в процессинге внутриклеточных или поверхностных белков и презентации антигенных пептидов иммунным клеткам (Murphy, K., et al. 2022). В случае солидных опухолей, чьи опухоль-специфические антигены чаще всего внутриклеточные, количество доступных поверхностных антигенов в качестве мишеней CAR-T-клеток ограничено (Sternier, R. C. et al. 2021).

Еще одним фактором, который уменьшает эффективность CAR-T-клеточной терапии, является иммуносупрессивное микроокружение опухоли. Также значительной проблемой является гетерогенность солидных опухолей, которые развиваются не из клеток кроветворной системы. Эти опухоли отличаются по генетическому и эпигенетическому статусу и, что особенно важно, могут полностью прекратить экспрессию опухолевых антигенов.

В настоящее время разрабатываются различные стратегии для решения этих проблем. Логическим решением может стать создание CAR-T-клеток с универсальным антигенраспознающим доменом, специфичность которых относительно легко изменить, используя различные комплементарные к нему метки. Технология CAR-T продолжает активно развиваться, фокусируясь на новых антигенах-мишенях, а также на сочетании с другими терапевтическими подходами (Leclerc, O. et al. 2022).

Не так давно исследователи из Колумбийского университета предложили революционный подход. Они разработали универсальные CAR-T-клетки, которые нацелены на антиген, отсутствующий в организме. Опухоль-ассоциированный антиген, соответствующий CAR-рецептору, синтезирует специальный штамм бактерий, способный размножаться только в опухоли (Rosa, L., et al. 2023). Это существенно повышает специфичность CAR-T-клеток к опухоли.

Данное исследование кардинально меняет подход к таргетной иммунотерапии: вместо индивидуального подбора мишени для каждого пациента по фенотипу опухоли можно создать систему, где бактерии будут синтезировать в опухоли антиген, который отсутствует в здоровых тканях. Это открывает новые горизонты для исследований и разработки ускоренных программ лечения различных типов рака.

CAR-T терапия считается платформенным решением благодаря своей модульности и стандартизированным процессам. Несмотря на то, что CAR-T терапия предлагает персонализированный подход, сама технология остается неизменной. Основные этапы стандартизированы и имеют четкую последовательность. При этом CAR-T может быть настроена на различные опухолевые антигены, что делает ее потенциально применимой для лечения различных типов рака.

Появляющиеся новые исследования способствуют непрерывному улучшению технологии и открывают возможности для разработки новых вариантов, включая комбинации с другими методами лечения.

1.7.1.2 Генная терапия

Генная терапия - это медицинское вмешательство, основанное на модификации генетического материала живых клеток. Клетки могут быть модифицированы *ex vivo* для последующего введения человеку или изменены *in vivo* непосредственно в организме.

CRISPR (*от англ.* «**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats») - это локусы повторяющихся коротких повторов (18-50 н.п.), разделённых уникальными спейсерными последовательностями (17-84 н.п.), встречающиеся в геномах бактерий и архей. В непосредственной близости от локусов CRISPR располагаются гены так называемых Cas-белков (*от англ.* «**CRISPR-associated**») и последовательность, кодирующая *tracr*ПНК (**trans-activating CRISPR ПНК**).

CRISPR - это система специфического иммунитета прокариот, характерная как для бактерий, так и для архей, описанная более 30 лет назад.

На сегодняшний день изучены многочисленные вариации природных систем CRISPR/Cas, а модификация одной из них (из *Streptococcus pyogenes*) привела к созданию технологии редактирования геномов. Она известна как CRISPR/Cas9 и широко используется учеными со всего мира. Система состоит из двух ключевых молекул - эндонуклеазы Cas9, которая осуществляет двухцепочечный разрез ДНК, и молекулы гидовой ПНК (гПНК), которая направляет комплекс с Cas9 в необходимый участок генома (Gasiunas G. et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012). гПНК состоит из двух частей: константной, которая образует каркас для связывания Cas9, и части из 20 нуклеотидов, комплементарных последовательности целевой ДНК (протоспейсеру). Сайт-мишень в ДНК также включает две части: протоспейсер и примыкающий к нему короткий, но очень важный РАМ-мотив (Protospacer-Adjacent Motif), без которого невозможно разрезание ДНК. После объединения гПНК с Cas9 их активный комплекс находит в геноме целевой участок ДНК, связывается с последовательностью РАМ и раскручивает двухцепочечную спираль, а комплементарная последовательность в гПНК связывается с одной из цепей. Если происходит эффективное связывание, эндонуклеазные домены Cas9 расщепляют обе цепи ДНК на 3-4 основания выше РАМ-мотива. После того,

как происходит разрезание ДНК, запускается система репарации клетки. Далее есть два варианта развития - может произойти негомологичное соединение концов (при этом образуются вставки или делеции неопределенного числа нуклеотидов, что может привести к нарушениям в структуре и работе функциональных элементов генома) или гомологичная рекомбинация, в ходе которой можно осуществить вставку необходимой исследователю последовательности ДНК событий (Lanik, E. et al. 2020) (Рисунок 12).

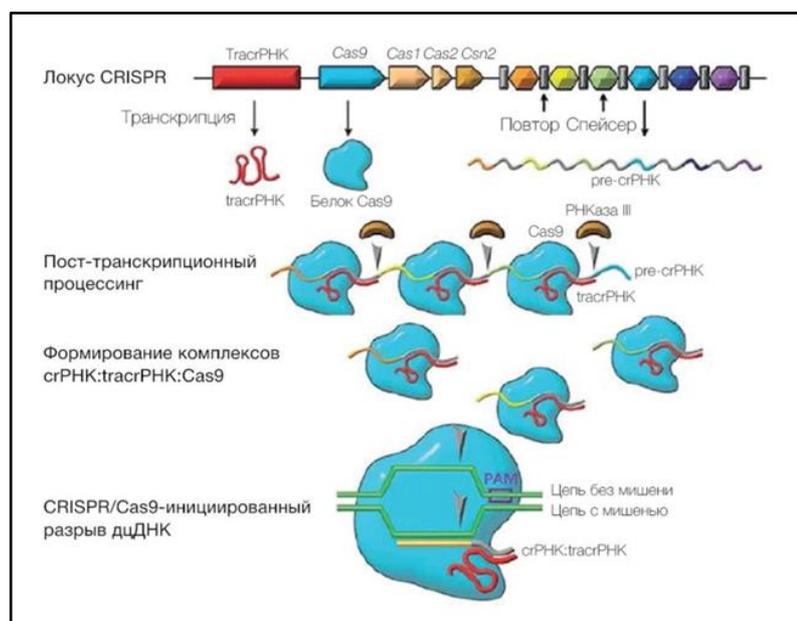


Рисунок 12 - Схема адаптивного иммунного ответа на примере системы CRISPR/Cas9 (Lino, С.А. et al. 2018).

CRISPR/Cas имеет широкий спектр применений (Shivram, H. et al. 2021). Она используется в как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. В медицине эта технология открывает новые горизонты для лечения наследственных болезней, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Генная терапия быстро трансформирует фармацевтическую отрасль, и, по некоторым прогнозам, к 2025 году составит 20 % от общего числа новых терапевтических продуктов.

В 2016 году китайский пациент стал первым человеком, получившим инъекцию клеток, модифицированных системой CRISPR/Cas9 (Cyranovsky, D. 2016). В иммунных клетках крови пациента был инактивирован ген, кодирующий необходимые для деления раковых клеток белок, что привело к замедлению роста агрессивной опухоли. Использование CRISPR/Cas9 уже показало свою эффективность в терапии таких генетических заболеваний, как бета-талассемия и серповидноклеточная анемия - сейчас эти протоколы проходят клинические испытания (Frangoul, H. et al., 2021), (A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Severe Sickle Cell Disease. U.S. 2022.),

(iHSCs With the Gene Correction of HBB Intervent Subjects With β -thalassemia Mutations. U.S, 2018).

На клеточных и животных моделях CRISPR/Cas9 применили для исправления генетических дефектов, лежащих в основе таких заболеваний, как нейропатия Лебера, миодистрофия Дюшена, муковисцидоз, катаракта и других (Meader, M. L. et al. 2019), (Nelson, C. E. et al. 2016.), (Fan, Z. et al. 2018), (Wu, S. et al. 2020). Также система CRISPR/Cas9 оказалась эффективной в борьбе с бактериальными и вирусными инфекциями (включая ВИЧ-1, гепатит Б и др.) и паразитарными заболеваниями (Yin, C. et al. 2017), (Yang, Y. 2021), (Bryant, J. M. et al. 2019).

Редактирование организмов с помощью CRISPR/Cas9 активно внедряется в биотехнологии и сельское хозяйство. Компании и лаборатории по всему миру работают над созданием растений, более устойчивых к заболеваниям и вредителям, содержащих больше полезных веществ, а также продуктов, не вызывающих аллергических реакций.

CRISPR/Cas9 позволяет оптимизировать производство малых молекул и белков в промышленности. Например, компания Synthetic Genomics смогла значительно повысить выход липидов, продуцируемых водорослями, тем самым увеличив объем биодизеля, который можно из них получить (Mascarelli, A. L. 2009).

1.7.1.3 Технология разработки РНК-вакцин

Одним из наиболее многообещающих подходов к созданию вакцин против заболеваний, вызванных высоковариабельными вирусами, является создание вакцин на основе нуклеиновых кислот. Среди них наиболее перспективными считаются вакцины на основе матричной РНК. Принцип действия мРНК-вакцин основан на введении в организм синтетической мРНК, которая кодирует белок, характерный для вируса, например, шиповидный белок SARS-CoV-2 (Sandbrink, J. B. et al. 2020). После введения вакцины клетки начинают синтезировать вирусный белок, индуцируя развитие иммунного ответа, приводящая к выработке антител и активации Т-лимфоцитов (Рисунок 13).

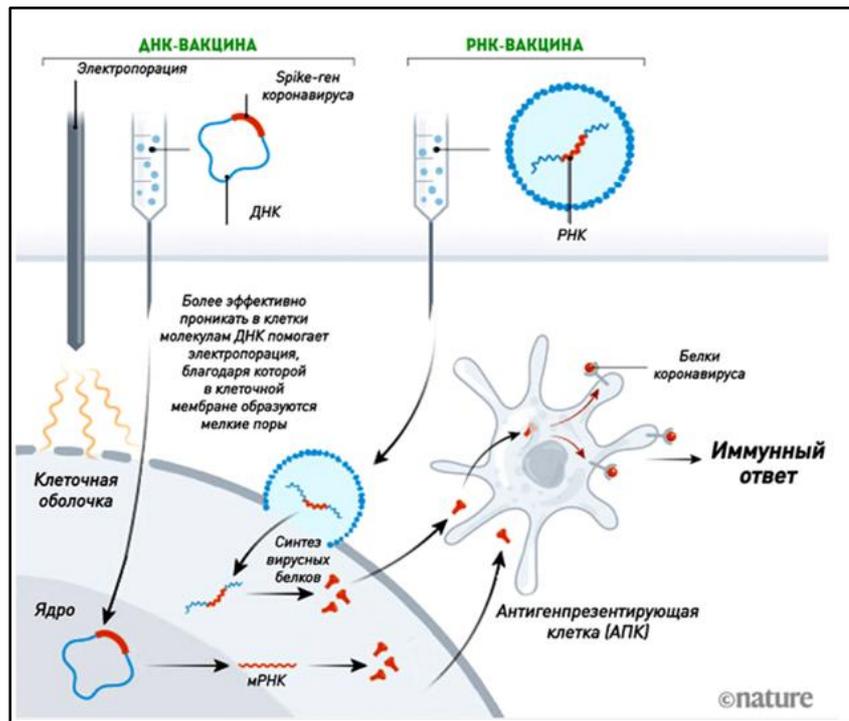


Рисунок 13 - Механизм действия ДНК- и РНК-вакцин (Ewen C. 2020).

В отличие от ДНК-вакцин, для мРНК не требуется проникновения в ядро клетки для обеспечения экспрессии целевого гена; мРНК-вакцина не способна интегрироваться в геном хозяина, благодаря чему устраняется риск, связанный с онкогенезом. Серьезным недостатком мРНК вакцин, мешавшим развитию данной платформы, была их нестабильность *in vivo*, в частности, из-за активации системы врождённого иммунитета. Прогресс в этой области связан с технологией синтеза мРНК; оптимизацией вторичной структуры мРНК и структуры кэпа; повышением устойчивости к деградации РНК-нуклеазами путем включения в молекулу модифицированных нуклеозидов, таких как псевдоуридин, 5-метилцитозин; совершенствованием методов очистки РНК и ее доставки (Pardi et al., 2018).

Вакцины на основе мРНК разделяют на два типа: нереплицирующиеся и самоамплифицирующиеся (Iavarone, et al. 2017). Нереплицирующиеся мРНК-вакцины - это мРНК со всеми необходимыми элементами, обеспечивающими процесс трансляции, кодирующая аминокислотную последовательность целевого белка-иммуногена. Самоамплифицирующиеся мРНК-вакцины - это репликоны, сконструированные на основе положительных одноцепочечных мРНК-вирусов, таких как альфа- и флавивирусы.

Вакцины на основе мРНК имеют ряд преимуществ в сравнении с другими типами вакцин, такими как классические (на основе «живого», аттенуированного, или инактивированного вирусов), белковые и ДНК-вакцины. В первую очередь, это

безопасность. Известно, что мРНК, в отличие от классических вирусных вакцин, неинфекционны и обладают низкой реактогенностью. Клинические испытания показали, что они вызывают меньше серьезных побочных эффектов по сравнению с традиционными вакцинами. Поскольку для создания вакцины не требуется использовать сам вирус, а достаточно знать его генетическую последовательность, процесс разработки может быть значительно ускорен. Существенным преимуществом мРНК-вакцин является быстрое и недорогое масштабируемое и однотипное производство, обеспечивающее высокие выходы желаемого продукта в условиях *in vitro* (Zhou, W. et al. 2023).

Важный, но не до конца исследованный аспект технологии мРНК-вакцин - доставка. Для доставки и защиты мРНК от деградации нуклеазами используют ряд подходов. Липидные наночастицы на сегодняшний день - одни из наиболее часто применяемых средств доставки мРНК. Значительный потенциал для доставки нуклеиновых кислот имеют такие катионные полимерные материалы, как дендримеры, полиэтиленимин и др. Кроме того, можно использовать генную пушку и электропорацию (Carasso, M. et al. 2018), (Kowalski, P. S. et al. 2019).

1.7.1.4 Искусственный интеллект и метод машинного обучения

Искусственный интеллект (ИИ) широко используется в биологии для решения целого ряда задач.

С точки зрения фундаментальной науки искусственный интеллект лежит в основе всех омиксных технологий, таких как функциональная и структурная геномика, протеомика, метаболомика и интерактомика (Holzinger, A. et al. 2023).

Кроме того, искусственный интеллект (ИИ) становится неотъемлемой частью медицины, предлагая инновационные методы, которые значительно улучшают диагностику, лечение и управление здоровьем.

Машинное обучение (machine learning, ML) - это направление искусственного интеллекта (ИИ), сосредоточенное на создании систем, которые обучаются и развиваются на основе получаемых ими данных. Машинное обучение играет центральную роль для ИИ в медицине, позволяя создавать модели, которые могут анализировать медицинские данные и предсказывать клинические исходы. Алгоритмы ML используются для диагностики заболеваний, анализа медицинских изображений и прогнозирования риска развития заболеваний. К примеру, ИИ может анализировать результаты МРТ и КТ для обнаружения опухолей на ранних стадиях. Модель, обученная на тысячах изображений, может

распознавать признаки рака с точностью, сравнимой с опытными радиологами. В кардиологии машинное обучение помогает в прогнозировании сердечных приступов путем анализа данных ЭКГ и других биометрических показателей.

Классическая разработка лекарственных препаратов часто занимает годы и требует вложения миллиардов долларов. Внедрение машинного обучения позволяет существенно оптимизировать этот процесс (Vamathevan, J. et al. 2019). Эта технология использует алгоритмы и модели для анализа больших объемов данных, что позволяет выявлять сложные закономерности и делать предсказания, которые полезны на различных этапах разработки лекарств. Искусственный интеллект применяют и для рационального дизайна лекарственного препарата *in silico*. Сегодняшние библиотеки соединений содержат миллиарды молекул, поэтому необходимы максимально эффективные подходы к предварительному виртуальному тестированию. Методы компьютерного обнаружения лекарств (computer aided drug design, CADD) способны значительно ускорить темпы скрининга новых препаратов.

Основываясь на ранее полученных данных, ИИ может предсказать новые молекулярные мишени или оценить вероятность успешного прохождения клинических испытаний для того или иного лекарственного кандидата. На стадии изучения фармакокинетических характеристик лекарственного кандидата алгоритмы машинного обучения могут предсказать как будут взаимодействовать новая молекула с другими препаратами при единовременном введении (Dara, S. et al. 2022).

Алгоритмы компьютерного зрения (computer vision, CV) широко применяются в агротехе. К примеру, проанализировав массив данных по изображениям положения и цвета плодов, может быть дана рекомендация по сбору урожая.

Сочетание результатов фенотипирования, основанного на распознавании изображений, и данных с полевых датчиков с омиксными данными о реакциях растений на условия окружающей среды (такими как экспрессия генов, биосинтез метаболитов и т.д.) способствует оптимизации селекционного процесса и выявлению новых фенотипов сельскохозяйственных культур, которые более эффективно используют ресурсы и устойчивы к изменяющимся климатическим условиям.

Методы машинного обучения, в частности компьютерного зрения, были успешно применены для автоматизации классификации выделенных культур микроводорослей (URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678423000031#bib13>). Кроме того, ИИ применяют в автоматизации процесса культивирования микроводорослей в промышленных системах (Peter, A. et al. 2023).

Машинное обучение считается платформенной технологией. Как было показано, технология универсальна, позволяет создавать широкую линейку продуктов и сервисов и может применяться в различных областях - от медицины до сельского хозяйства. Машинное обучение может быть интегрировано и дополнено другими технологиями, такими как большие данные, облачные вычисления и Интернет вещей (internet of things, IoT), что позволяет создавать комплексные решения. Большая часть процессов ML стандартизированы и автоматизированы. Эта технология объединяет целую экосистему специалистов, исследователей и разработчиков, что способствует обмену знаниями и ускоряет инновации.

1.7.1.5 Системы направленного транспорта лекарств

Одной из актуальных проблем современной медицины и фармакологии является низкая селективность лекарственных средств. Вводимые в организм традиционными способами лекарства распределяются в нем относительно равномерно, проникая в различные органы и ткани. Перспективным подходом к решению этой проблемы является создание систем направленного транспорта лекарств (Chavda, V. P. 2019).

Лекарства, оснащенные системой доставки, обладают рядом преимуществ по сравнению с обычными препаратами: увеличивается растворимость гидрофобных веществ; улучшается их проникновение в клетки; оптимизируется фармакокинетика, осуществляется целенаправленный транспорт и контролируемое высвобождение препаратов и др.

Для направленного транспорта лекарств используют конъюгацию с молекулами (векторами), обладающими тропностью к определенным тканям, клеткам или субклеточным структурам. Этот подход наиболее активно исследуют в онкологии. Так конъюгат α -фетопротейна, обладающего сродством к поверхности раковых клеток, с цитотоксическими антибиотиками (доксорубицин, карминомицин) позволил существенно увеличить их цитотоксическую активность в эксперименте на мышах с первичными опухолями (Lutsenko, S. V. et al. 2020). Также были разработаны и исследованы конъюгаты α -фетопротейна с фталоцианинами, хлоринами, винкристином и винбластином, что показало значительное увеличение их цитотоксической активности по отношению к различным линиям опухолевых клеток.

В качестве векторов изучают применение моноклональных антител к различным рецепторам на поверхности клеток, прежде всего раковых (трансферриновые рецепторы, рецепторы фактора роста эпителия и др.) (Sharkey, R. M. et al. 2006).

В качестве транспортных средств в генной терапии предлагается использовать вирусные частицы. Эти частицы представляют собой белковые структуры, основанные на вирусных капсидах, размеры которых находятся в нанометровом диапазоне. Они могут быть как инфекционными вирусными частицами, содержащими молекулы нуклеиновых кислот, так и вирусоподобными частицами, состоящими только из белкового капсида и не способными к инфицированию, так как не содержат нуклеиновых кислот. (Козлов, Е.Н. и др. 2012). Широкие возможности и большие перспективы сулит использование для адресной доставки лекарств различных искусственных наноструктур (липосомы, мицеллы, микросферы, дендримеры, фуллерены, полимерные наночастицы и др.). Структуры некоторых систем доставки приведены на Рисунке 14 (Zhou, W. et al. 2023).

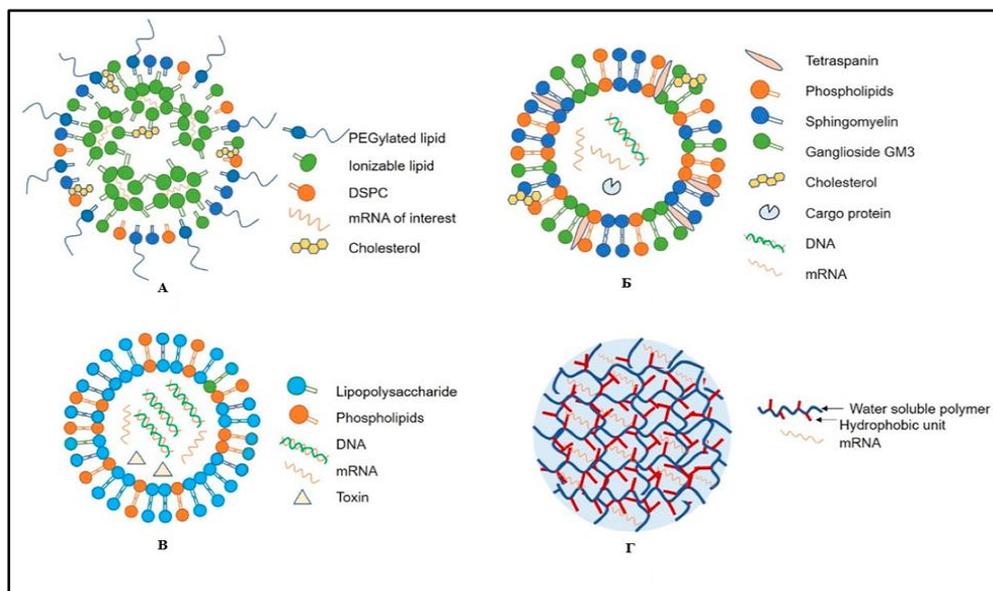


Рисунок 14 - Схематическое изображение различных систем доставки лекарственного средства (Zhou, W. et al. 2023).

Сегодня липосомы применяются в качестве носителей для противораковых, противотуберкулезных и противогрибковых препаратов, а также для доставки вакцин. Липосомы, созданные на основе катионных липидов, используются для транспортировки терапевтических средств, основанных на нуклеиновых кислотах, таких как антисмысловые олигонуклеотиды, аптамеры и векторы для генной терапии (Lembo, D. et al. 2010), (Mallipeddi, R. et al. 2010).

Среди альтернативных систем доставки, помимо липосом, особый интерес представляют полимерные наночастицы (Chavda, V. P. 2019). Эти твердые частицы имеют

размеры от 1 до 1000 нм и состоят из полимеров как природного (например, альбумин, хитозан, альгинат), так и синтетического (полилактиды, полиакрилаты и др.) происхождения.

Для целевой доставки лекарств, биологически активных соединений и контрастирующих веществ также используются другие типы наночастиц, такие как мицеллы, дендримеры, аквасомы и наночастицы на основе неорганических веществ и металлов.

Особое внимание заслуживают модульные нанотранспортеры, которые предназначены для доставки лекарств непосредственно внутрь клетки. Эти рекомбинантные полипептиды обладают функциональными модулями, которые обеспечивают: 1) избирательное распознавание клетки-мишени с последующим эндоцитозом благодаря лигандному модулю; 2) выход из эндосом в цитоплазму с помощью эндосомолитического модуля; 3) транспорт в ядро благодаря модулю с последовательностью ядерной локализации; 4) эффективное присоединение доставляемого лекарства, обеспечиваемое модулем-носителем (Сластникова, Т. А. и др. 2012).

Активно развивается экстракорпоральная фармакотерапия, в основе которой лежит транспортная доставка лекарств при помощи форменных элементов крови в качестве носителей (эритроцитов, лейкоцитов и даже тромбоцитов).

Огромное разнообразие биологических мишеней и фармакологических задач неизбежно будет требовать совершенствования известных и разработки новых систем направленной доставки лекарственных средств (Leclerc, O. et al. 2022).

Тенденция к переходу на платформенные решения в биотехнологиях представляет собой значимый шаг вперед в области научных исследований и разработки новых медицинских технологий. Она открывает новые возможности для инноваций, повышения эффективности и снижения затрат, что в конечном итоге может привести к улучшению здоровья населения и повышению качества жизни.

1.7.2 Технологические платформы в промышленной биотехнологии

Различные уровни разработки продукта и сервиса известны как уровни технологической готовности, или TRL (Technology Readiness Levels) (Sausser, B. et al. 2006). Поисковые исследования обычно находятся между TRL 1 и 3, в то время как промышленность обычно охватывает TRL 8 и 9. При этом TRL 4-7 представляют собой так

называемую «долину смерти», так как технологии такой степени зрелости уже не выходят за рамки поисковых, но все еще являются рискованными с точки зрения финансирования промышленностью и последующего гарантированного внедрения (Baglieri, D. et al. 2018).

Уровни 1 - 4: Становление, оценка технологии, проведение испытаний

- TRL 1: Сформулирована фундаментальная концепция, обоснована полезность новой технологии
- TRL 2: Сформулирована техническая концепция, установлены возможные области применения разработки
- TRL 3: Для подтверждения концепции разработан макетный образец технологии, чтобы продемонстрировать ее ключевые характеристики
- TRL 4: Разработан детальный макет решения для демонстрации работоспособности технологии

Уровни 5 - 7: Развитие / предпроизводство

- TRL 5: Работоспособность технологии может быть продемонстрирована на детализированном макете в условиях, приближенных к реальным.
- TRL 6: Демонстрация работоспособности технологии на полномасштабном полнофункциональном прототипе в условиях, соответствующих реальности. Если данный уровень успешно пройден, то принимается решение о последующем внедрении технологии в реальные промышленные продукты.
- TRL 7: Прототип системы может быть показан в составе других систем в реальных эксплуатационных условиях.

Уровни 8 - 9: Непосредственное производство

- TRL 8: Сборка реального устройства, которое тестируется в составе системы в ожидаемых эксплуатационных условиях.
- TRL 9: Реальная демонстрация технологии в ее завершенном виде, после чего принимается решение о серийном выпуске.

При этом, большая часть платформенных биотехнологий находятся как раз между TRL 5-7.

В общем виде процесс разработки технологической платформы на основе штамма-продуцента представлен на Рисунке 15. (Carbonell, P. et al. 2018). На нем отражены все стадии от дизайна необходимых свойств микроорганизма до его культивирования в промышленных масштабах.

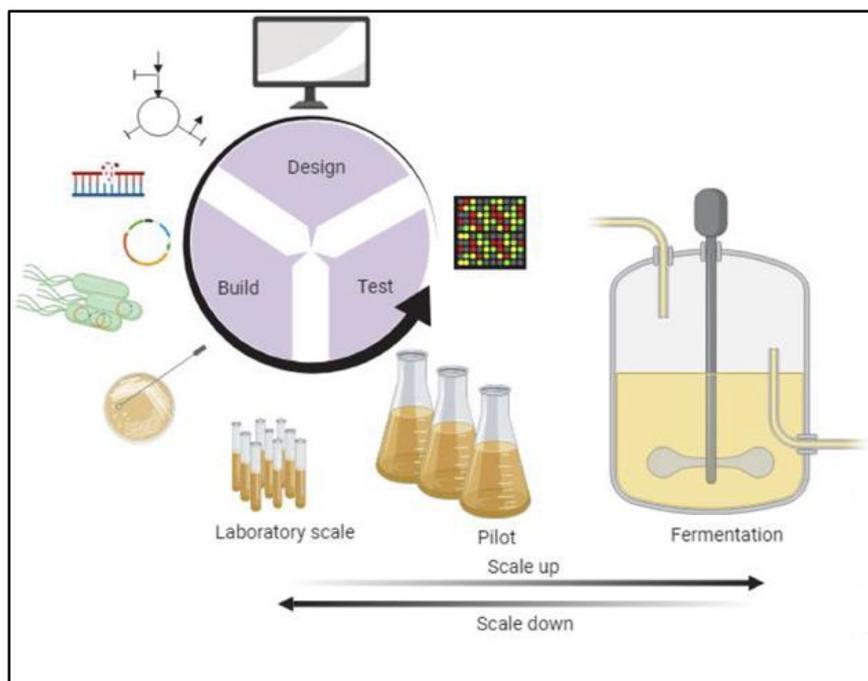


Рисунок 15 - Процесс разработки нового промышленного-производителя промышленной разработки и производства в формате технологической платформы (Kampers, L. F. et al. 2022).

При выборе микроорганизмов, которые в настоящее время применяются в промышленной биотехнологии, необходимо учитывать три группы факторов: технические, секторные и социальные. Современные широко используемые системы хозяйств включают бактерии, дрожжи, нитчатые грибы и одноклеточные водоросли. Все промышленные штаммы имеют свои собственные сильные и слабые стороны (Adrio, J. L. et al. 2010). Технические факторы, влияющие на выбор производственной платформы, включают, среди прочего, способность производить сложные вещества, скорость роста, способность выполнять посттрансляционные модификации и использование дешевых компонентов среды. Секторальные факторы включают используемый микроорганизм, который является естественным производителем интересующего продукта, процесс выращивания и производства, который должен соответствовать полному промышленному процессу, или знакомство с работой с определенным штаммом из истории компании. Социальные факторы для широкого применения этих производственных штаммов включают общественную осведомленность, экологически устойчивый процесс производства и статус безопасности микроорганизма. Многие из этих технических, отраслевых и социальных факторов ограничивают компанию при выборе производственного штамма. Поскольку они должны учитывать требования конечного потребителя на протяжении всего процесса разработки и производства, продукты должны быть максимально экономически

эффективными, быстрыми, экологически чистыми и безопасными (Hallagan, J. V. et al. 2020).

Изменение производственного микроорганизма, используемого в устоявшемся промышленном процессе, считается радикальным промышленным сдвигом, который в значительной степени зависит от исследований. Адаптация существующего производственного процесса является дорогостоящей, требует определенных научных знаний и времени для разработки и тестирования. Поскольку изменение производственной платформы, как правило, обязательно повлияет на промышленную установку, прирост урожайности и характеристик должен быть существенным, чтобы компенсировать инвестиционные затраты. Кроме того, каждый день обнаруживаются микроорганизмы с более интересными характеристиками, которые лучше производят определенные вещества. Поэтому неудивительно, что существует много исследований, сосредоточенных не на поиске идеального производственного хозяина для конкретных целей, а на разработке и создании одного *de novo* или путем создания клетки, включающей только специально отобранные признаки, или путем оптимизации существующей производственной микробной платформы.

Таким образом, в промышленной биотехнологии исследования подходящих производственных платформ имеют первостепенное значение. Существующие производственные платформы совершенствуются или разрабатываются новые. С академической точки зрения доступность и простота работы, а также научный интерес являются основными причинами выбора одного конкретного микроорганизма. При этом для промышленности важное влияние оказывают технические, отраслевые и социальные факторы.

1.7.2.1 Концепция биорафинирования для технологических платформ

Биорафинирование или биопереработка - устойчивый процесс, который позволяет выделить из биомассы химические компоненты, увеличить их ценность и сократить выбросы парниковых газов (Conteratto, C. et al. 2021).

В основе биопереработки лежит использование биомассы, включающей лигноцеллюлозные материалы (например, древесину и отходы сельского хозяйства), водоросли, органические отходы (например, пищевые отходы) и др.

Продукты биорафинирования могут включать биотопливо (биоэтанол и биодизель), биопластики, биохимические вещества и другие экологически чистые материалы. Биопереработка по своей сути аналогична нефтепереработке.

После сбора биомассы происходит первичная деструкция при помощи физических и/или химических методов, удаления примесей. После предварительной обработки биомасса подвергается различным процессам переработки для извлечения или создания ценных продуктов. Эти методы преобразования можно разделить на термические, химические и микробиологические. Например, лигноцеллюлозная биомасса часто предварительно обрабатывают для фракционирования лигнина, целлюлозы и гемицеллюлозы.

В рамках концепции биопереработки выделяются различные биотехнологические платформы, основанные на промежуточном звене между сырьем и конечными продуктами. К числу таких платформ можно отнести платформы на основе лигнина, C5 и C6 сахаров, синтез-газа, пиролизного масла и др.

Платформа лигнина в качестве сырья использует древесную биомассу, богатую ароматическими соединениями. Лигнин как составная часть древесины - наиболее трудноутилизируемый отход лесного комплекса. Химическая модификация лигнина позволяет получать новые продукты для различных областей применения: нитролигнина и хлорлигнина, которые используются при бурении скважин; аммонизированного лигнина - преобразователя ржавчины; фосфорсодержащих лигнинов; сульфатированных и сульфометилированных лигнинов - диспергаторов красок; биоразлагаемых сополимеров лигнина. Химической переработкой лигнина можно получить низкомолекулярные органические продукты, производимые нефтехимическим синтезом. Реакциями окисления лигнина получают ванилин, сиреневый альдегид, органические кислот. Процессы пиролиза, терморастворения и гидрогенизации лигнина используются для получения жидких топлив. Наиболее крупнотоннажным направлением использования гидролизного лигнина является синтез углеродных сорбентов (Poveda-Giraldo, J. A. et al. 2021).

Исходная база для получения целлюлозы и гемицеллюлозы включает как пищевое, так и непищевое сырье. К растительным непищевым материалам, которые могут быть использованы в качестве гидролизного сырья, относятся различные отходы лесопиления и деревообработки (вершины, ветки, пни, кора, горбыли, рейки, обрезки, стружка, щепы, одубина, шпон, дрова, опилки, древесная мука), отходы производства и переработки сельскохозяйственных культур (хлопковая шелуха и стебли хлопчатника, кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, рисовая и просяная лузга; костра льна, конопля, кенафа; солома, тростник) и ряд дикорастущих растений. В разных видах растительного сырья

содержится от 30 % до 75 мас. % полисахаридов. К ним относятся относительно легко гидролизуемые полисахариды гемицеллюлозы (15 % - 40 мас. %), целлюлоза (25 % - 50 мас. %) и крахмал (в картошке и в злаках не менее 60 мас. %). Из биомассы богатой целлюлозой и гемицеллюлозой получают широкий спектр соединений, таких как этанол, молочная кислота, янтарная кислота, леулиновая кислота, сорбит и 2,5-фурандикарбоновая (Takkellapati, S. et al. 2018).

Платформа, где промежуточным продуктом является синтетический газа (сингаз), использует на входе биомассу различного типа и может быть использована для производства синтетических жидких топлив. Окись углерода и водород, основные компоненты синтез-газа, могут быть подвергнуты широкому спектру химических и микробиологических модификаций, что приводит к получению газообразного и жидкого углеводородного топлива, а также широкого спектра соединений для химической промышленности (Dahmen, N. et al. 2019).

Биопереработка имеет ряд существенных экологических, экономических и социальных преимуществ, способствуя устойчивому развитию. Одним из ключевых аспектов является снижение зависимости от ископаемого топлива благодаря производству биотоплива, такого как этанол и биодизель. Это не только уменьшает выбросы парниковых газов, но и способствует более рациональному использованию ограниченных ресурсов. Кроме того, использование биомассы считается углеродно-нейтральным, поскольку углекислый газ, выделяемый при сжигании биотоплива, компенсируется тем, который поглощается растениями в процессе их роста.

1.7.2.2 Универсальный штамм-производитель как модель биотехнологической платформы

Микроорганизмы известны своей способностью быстро адаптироваться к изменяющимся внешним условиям. Протекающие в клетках физиологические процессы позволяют им активно реагировать на незначительные изменения условий окружающей среды, не затрагивая при этом генетический аппарат. Однако глобальные изменения условий существования, создающие опасность для выживания, инициируют адаптационный ответ, приводящий к возникновению мутаций в десятках генов и, как следствие, к изменению целого ряда метаболических процессов внутри клетки, что позволяет ей выжить в неблагоприятных условиях.

Идеальный промышленный микроорганизм должен быть метаболически и экологически гибким, способным расти на дешевой среде, устойчивым к внешним промышленным стрессовым факторам, накапливать разнообразные продукты с высоким и стабильным выходом (de Lorenzo, V. et al. 2021).

Как было рассмотрено выше, ключевые инструменты создания универсального биотехнологического штамма лежат в области синтетической биологии. Теоретически, направленное изменение генетического материала даже дикого микроорганизма может сделать из него промышленный продуцент целевого метаболита.

Комбинация направленных изменений того или иного метаболического пути и лабораторной адаптивной эволюции зачастую приводит к получению практически значимых результатов (Conrad, T. M. et al. 2011), (Weikert, C. et al. 1997).

Лабораторная адаптивная эволюция, или, как ее еще называют, эволюционная инженерия, основана на способности микроорганизмов быстро приспосабливаться к новым условиям внешней среды. Этот метод достаточно часто применяется для исследования молекулярных основ и динамики эволюции бактериальных культур, а также для направленного изменения метаболизма микроорганизмов.

Суть лабораторной адаптивной эволюции - длительное выращивание микроорганизмов в определенных условиях, часто при селективном давлении. Длительное культивирование подразумевает сотни генераций. Чаще всего этим методом оптимизируются такие параметры, как скорость роста, устойчивость к токсичным метаболитам, способность усваивать новые субстраты. Все перечисленные свойства зависят от мутаций во многих генах и оптимальных комбинаций таких мутаций. Так, методом адаптивной эволюции увеличили синтез каротиноидов у дрожжей *S. cerevisiae* с генами биосинтеза каротиноидов из *Xanthophyllomyces dendrorhous* в три раза. Сравнительный анализ транскриптов исходного и адаптированного штаммов показал, что активность генов, вовлеченных в непосредственный синтез каротиноидов, не изменена. Изменения активности найдены среди генов биосинтеза липидов и генов мевлонатного пути, что иллюстрирует прикладную полезность данного подхода и дает новые знания о взаимодействии биохимических путей в живой клетке, приводящих к сверхсинтезу.

Метод успешно применен к получению штаммов *E. coli* с повышенной устойчивостью к этанолу и изобутанолу, к получению штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, эффективно усваивающих ксилозу или ксилозу и арабинозу. Использование метода адаптивной лабораторной эволюции уже позволили повысить толерантность *Desulfovibrio* к высоким содержаниям соли в среде (Zhou, M. et al. 2013), повысить устойчивость к радиации *Escherichia coli* (Harris, J. L. et al. 2009) и высоким температурам *Escherichia coli*

(Blaby, I. K. et al. 2012). Методом лабораторной адаптивной эволюции штамма *E. coli* K-12 MG1655 были получены мутанты с улучшенной способностью к утилизации этанола и глицерина в аэробных условиях.

С точки зрения эффективности промышленного биокатализа важным является способность микроорганизмов переносить резкие колебания температуры (Sandberg, T. E. et al. 2014). В одной из работ была проведена успешная попытка создания *Escherichia coli*, способной расти на средах с низкими значениями pH. Была проведена адаптивная лабораторная эволюция штамма *E. coli* K-12 MG1655 при pH 5,5 в среде с низким содержанием глюкозы (Du, B. et al. 2020). После 800 поколений было независимо получено шесть клонов, способных расти при pH 5,5 на 18,0 % быстрее, чем их исходный штамм. При этом все шесть клонов сохранили темпы роста сопоставимые с родительским штаммом при нейтральных значения pH (Xu, K. et al. 2020).

Результаты полногеномного анализа показали, что у пяти из шести штаммов были мутации в гене *proC*, связанного с метаболизмом аминокислот.

Бактерии рода *Pseudomonas* являются перспективными объектами для создания на их основе штаммов-продуцентов различных биологически активных соединений (антибиотиков, сидерофоров, сурфактантов, гормонов роста растений и др.). Особый интерес вызывают представители данного рода как основа бактериальных препаратов, стимулирующих рост растений и защищающих их от фитопатогенов (Kampers, L. FC. et al. 2019).

За последние несколько лет был получен ряд микроорганизмов с оптимизированными скоростью накопления биомассы, повышенной толерантностью к ряду внешних факторов, увеличенным выходом целевых продуктов, а также расширенным перечнем используемых субстратов (Sandberg, T. E. et al. 2019). Однако до сих пор большинство этих штаммов не нашли внедрения в промышленности.

1.7.2.3 Технологические платформы в Российской Федерации как коммуникативный инструмент

Определение технологической платформы впервые появилось в Распоряжении Правительства РФ от 08.12.2011 № 2227-р «Об утверждении Стратегии инновационного развития Российской Федерации на период до 2020 года» и выглядело следующим образом:

«Технологическая платформа представляет собой коммуникационный инструмент, направленный на активизацию усилий по созданию перспективных коммерческих

технологий, новых продуктов (услуг), привлечение дополнительных ресурсов для проведения исследований и разработок на основе участия всех заинтересованных сторон (бизнеса, науки, государства и гражданского общества), а также на совершенствование нормативной правовой базы в области научно-технологического и инновационного развития».

В данном документе раскрывается, что формирование и развитие технологических платформ направлено на решение следующих задач:

- усиление влияния бизнеса и общества на определение и реализацию важнейших направлений научно-технологического развития;
- выявление новых научно-технологических возможностей модернизации существующих секторов и формирование новых секторов российской экономики;
- определение принципиальных направлений совершенствования отраслевого регулирования для быстрого распространения перспективных технологий;
- настройка инструментов государственной политики по стимулированию инноваций, поддержке научно-технической деятельности и процессов модернизации компаний с учетом специфики и вариантов развития отраслей и секторов российской экономики;
- расширение научно-производственной кооперации, формирование новых партнерств в инновационной сфере, новых цепочек формирования добавленной стоимости и производства продукции (услуг) более высокого передела;
- развитие центров превосходства и центров компетенций в научно-технологической сфере, повышение потенциала для реализации сложных научно-технологических проектов, требующих участия различных организаций и междисциплинарного взаимодействия.

Одной из утвержденных биотехнологических платформ является «ЕвразияБИО» (Технологическая платформа «ЕвразияБИО». 2024. URL: <https://biorosinfo.ru/tekhnologicheskaya-platforma-evraziyabio/>), которая представляет собой союз (консорциум) хозяйственно независимых субъектов, нацеленных на разные виды скоординированной деятельности по созданию и эффективному использованию интеллектуальных, научно-технических и производственных ресурсов в области биотехнологии и биоэкономики для обеспечения комплексного динамичного инновационного развития стран - членов Евразийского Экономического Союза. Учредителями являются Общероссийская общественная организация «Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова» (г. Москва, от Российской Федерации),

Институт микробиологии НАН Беларуси (г. Минск, от Республики Беларусь), РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК (г. Астана, от Республики Казахстан).

Результаты деятельности данной платформы оценить не удалось ввиду отсутствия опубликованной отчетности. К настоящему моменту «ЕвразияБИО» признана ликвидированной (ООО «Евразиябио». URL: <https://www.rusprofile.ru/id/2833214>).

Другая технологическая платформа - «Биоиндустрия и биоресурсы» (БиоТех2030) (Технологическая платформа «Биоиндустрия и биоресурсы» (БиоТех2030). 2024. URL: <http://biotech2030.ru/platforma/o-nas/>), которая является формой реализации института частно-государственного партнерства и инструментом осуществления научно-технической и инновационной политики на приоритетном направлении технологической модернизации российской экономики в области биотехнологий. Цель ТП «БиоТех2030»: создание в Российской Федерации современной биоиндустрии, обеспечивающей вклад в ВВП, сопоставимый с ведущими экономиками мира (до 3 %).

Задачи ТП «БиоТех2030»:

1. разработка концепции развития отечественной биоиндустрии и биоресурсной базы и ее взаимодействия с другими отраслями экономики;
2. создание новых и развитие традиционных для российской экономики рынков сбыта;
3. разработка, обсуждение и принятие документов, определяющих основные научно-технические приоритеты развития в области компетенции ТП:
 - прогноз развития биоиндустрии и биоресурсов;
 - стратегическая программа исследований, СПИ;
 - дорожная карта, план реализации СПИ.
4. реализация принципов ГЧП, учет точек зрения, интеграция мнений и мобилизация ресурсов всех заинтересованных сторон: государства, промышленности, научного сообщества, контролирующих органов, пользователей и потребителей;
5. помощь в проведении экспертизы государственных и отраслевых решений в области компетенций ТП;
6. интеграция биотехнологических знаний и приложений в различных секторах экономики;
7. взаимодействие с аналогичными зарубежными структурами в ЕС и мире, региональными и национальными структурами (ETP Sustainable Chemistry, ETP Forestry, CLIB2021, EuropaBio и т.п.);
8. создание коммуникативных инструментов и информационное сопровождение по областям компетенций ТП;

9. совершенствование образования и развитие кадрового потенциала в области биотехнологий в Российской Федерации.

Платформа функционирует и в настоящий момент, однако результаты деятельности данной платформы оценить не удалось, ввиду отсутствия опубликованной отчетности после 2020 года.

Некоторые отечественные биотехнологические компании, по аналогии с зарубежными, разрабатывают и активно используют собственные платформенные решения. Так, например, компания BIOCAD, специализирующаяся в основном на противоопухолевых препаратах, а также лекарственных средствах против ряда других социально значимых заболеваний, ведет полный цикл создания лекарственных препаратов: от поиска молекулы и геной инженерии до массового производства и маркетинговой поддержки. Для оптимизации процесса разработки все исследования распределены по трем технологическим платформам, которые специализируются на различных типах кандидатных препаратов (Наука. Продукты в разработке компании BIOCAD. 2024. URL: <https://biocad.ru/science>) - это моноклональные антитела (Mabnext), малые молекулы (Chemnext) и геновая терапия (Genenext). Каждый препарат внутри платформы проходит все необходимые этапы разработки: от поиска мишени и выбора кандидата до пилотных клинических исследований.

Таким образом, заметна ощутимая разница в создании технологических платформ за рубежом и в нашей стране. Формирование технологических платформ является необходимым шагом по созданию производства полного цикла, поскольку уменьшает издержки при разработке новых продуктов. В связи с этим важна разработка все новых платформенных решений для их возможного применения в различных направлениях биотехнологии.

1.8 Технологическая платформа на основе фотосинтезирующих микроорганизмов

Биотехнологическая платформа на основе фотосинтезирующих микроорганизмов - микроводорослей и цианобактерий - является крайне перспективной.

Во-первых, фотосинтезирующие микроорганизмы способны эффективно преобразовывать солнечную энергию в биомассу с помощью фотосинтеза, что позволяет им расти в различных климатических условиях, включая соленую и пресную воду. Это делает их культивирование возможным в разнообразных географических локациях, что способствует устойчивому производству биомассы (Qin, S. et al. 2012).

Во-вторых, фотосинтезирующие микроорганизмы продуцируют широкий спектр биоактивных веществ, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, антиоксиданты, пигменты и витамины (Chen, H. et al. 2021). Эти соединения находят широкое применение в фармацевтике, косметике и пищевой промышленности благодаря своим полезным свойствам и способности улучшать здоровье.

Кроме того, микроводоросли и цианобактерии обладают существенными преимуществами с экологической точки зрения, поскольку они поглощают CO₂ в процессе роста, что способствует снижению парниковых газов в атмосфере (Chen, H. et al. 2020). Их можно использовать для очистки сточных вод, удаляя загрязняющие вещества, что в свою очередь способствует восстановлению экосистем и улучшению качества воды. Развитие зеленой биотехнологической промышленности на основе микроводорослей решит проблемы текущего энергетического кризиса и неустойчивого производства химической продукции, а также смягчит парниковый эффект.

В тоже время промышленные фотосинтезирующие микроорганизмы имеют существенные недостатки, заключающиеся в относительно низком содержании продукта, высокой стоимости культивирования биомассы и выделения целевых метаболита в промышленных масштабах (Machado, I. M.P. et al. 2012).

Разнообразие метаболических путей микроводорослей и их регуляторных механизмов, с одной стороны, предоставляет возможности для манипуляций, с другой стороны, сами внутриклеточные пути и их взаимосвязи мало изучены (Davis, D. et al. 2021). До сих пор в случае ряда соединений микроводорослей отсутствуют прямые экспериментальные доказательства конкретных путей синтеза, регуляторных процессов и потоков метаболитов. Таким образом, глубокое понимание фундаментальных внутриклеточных процессов, включая фотосинтез, цикл Кальвина, цикл трикарбоновых кислот и гликолиз, а также процессов регуляции соответствующих метаболических путей при различных условиях культивирования являются фундаментом для эффективного производства на основе биомассы микроводорослей (Рисунок 16).

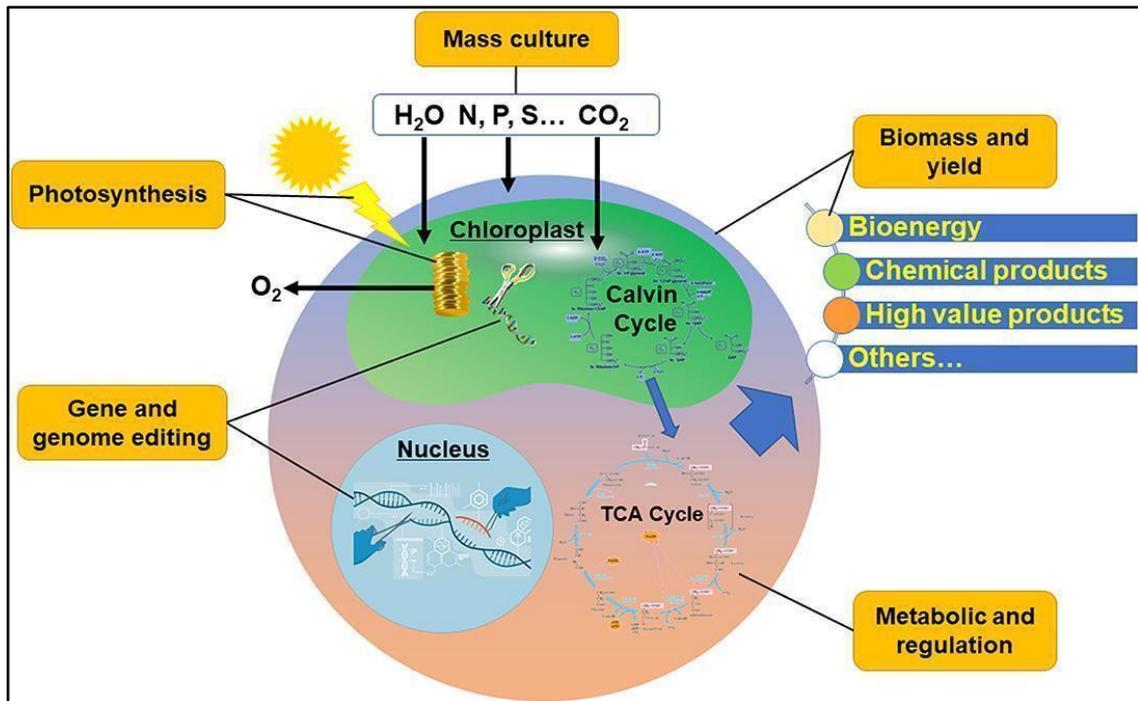


Рисунок 16 - Оптимизированные ключевые точки для технологической платформы на основе микроводорослей (Chen, H. et al. 2022).

Продуктивность биомассы и выход целевого продукта определяют реальную ценность технологического цикла на основе микроводорослей (Zhan, J. et al. 2017), (Chen, H. et al. 2020). Чтобы добиться более высоких значений скорости роста и удельного содержания ценного биопродукта исследователям необходимо сосредоточиться на следующих подходах:

1. Скрининг быстрорастущих штаммов микроводорослей с высоким накоплением биомассы;
2. Оптимизация процессов культивирования микроводорослей для улучшения выхода биомассы микроводорослей. Например, метод миксотрофного культивирования позволяет получить более высокий выход как биомассы так и целевого метаболита;
3. Ввод промышленных отходов в качестве источника питательных веществ при миксотрофном культивировании может снизить себестоимость продукции и принести значительную пользу для окружающей среды.

Повышение эффективности фотосинтеза является одной из точек роста, позволяющей повысить выход целевого продукта и скорость накопления биомассы (Trentacoste, E. M. et al. 2015). Традиционные способы повышения эффективности фотосинтеза в культуре микроводорослей сосредоточены на совершенствовании системы культивирования, приводящее к улучшению использования световой энергии. С развитием технологии синтетической биологии все больше внимания уделяется модификации самих

клеток микроводорослей. С точки зрения захвата световой энергии введение экзогенных генов хлорофиллов, которые могут поглощать дополнительный спектр, в клетки микроводорослей, вероятно, позволит получить оптимизированные штаммы клеток с более высокой фотосинтетической способностью. Оптимизация преобразования световой энергии фокусируется на улучшении механизмов фиксации углерода и оптимизации цикла Кальвина. Наиболее прямая стратегия заключается в эффективном улучшении способности клеток к секвестрации углерода путем выявления и сверхэкспрессии определенных неорганических переносчиков углерода и Rubisco или замены их более эффективными ферментами.

Несмотря на большое биоразнообразие микроводорослей и многочисленные достижения в области биотехнологии, в настоящее время в промышленном или коммерческом масштабе культивируется ограниченное число видов. Промышленное выращивание микроводорослей по-прежнему является низкорентабельным. Это связано с высокой себестоимостью выращивания микроводорослей: затраты на неорганические питательные вещества (в основном азот и фосфат), поддержание температурного режима, углекислый газ и др. (Chen, H. et al. 2020). При этом часть производств все еще сфокусированы на одном продукте, зачастую низкомаржинальном.

Таким образом, производство на основе микроводорослей, а следовательно, и соответствующие биотехнологические платформы, находится на ранних этапах технологического развития - TRL 5-7. В связи с этим крайне актуальным является поиск комплексных рентабельных подходов для обнаружения, идентификации и промышленного культивирования микроводорослей-продуцентов ценных соединений. Для достижения экономической эффективности процессы промышленного производства продуктов из биомассы фотоавтотрофных микроорганизмов должны быть устойчивыми, гибкими, иметь низкие энергетические затраты и легко адаптироваться к разнообразным исходным характеристикам клеток. Перспективной целью является интеграция всех этапов различных технологий биопереработки в единую непрерывную структуру, ориентированную на производство широкого спектра продуктов, что позволит максимально эффективно извлекать прибыль из всех ценных компонентов, содержащихся в биомассе. Такие задачи требуют значительных модернизаций, как с точки зрения организации научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, так и с точки зрения промышленного производства. Ответом на существующие ограничения научно-исследовательского процесса может стать внедрение платформенных решений.

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Молекулярная идентификация, культивирование и химический анализ штаммов микроводорослей

2.1.1 Культивирование, идентификация и химический анализ штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

2.1.1.1 Выделение и культивирование *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

Штамм *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 был выделен из почвы робиниевого леса, расположенного в степной зоне Украины (48° 45' 24" с.ш., 35° 27' 40" в.д.), Днепропетровская область. Моноклональные культуры были созданы путем микропипетирования единичных клеток под инвертированным микроскопом. Культуру выделяли и выращивали в модифицированной среде WC (Guillard, R. R. L. et al. 1972) с 10-кратным количеством нитрата и фосфата (WC*10). Среда WC*10 содержала 0,85 г/л NaNO₃; 0,114 г/л K₂HPO₄*3H₂O; 0,0126 г/л NaHCO₃; 0,0368 г/л CaCl₂*2H₂O; 0,0212 г/л Na₂SiO₃*9H₂O; 0,5 г/л Tris; 0,037 г/л MgSO₄*7H₂O; микроэлементы (4,36 мг/л Na₂EDTA; 3,15 мг/л FeCl₃*6H₂O; 0,01 мг/л CuSO₄*5H₂O; 0,022 мг/л ZnSO₄*7H₂O; 0,01 мг/л CoCl₂*6H₂O; 0,18 мг/л MnCl₂*4H₂O; 0,006 мг/л Na₂MoO₄*2H₂O; 1 мг/л H₃BO₃) и витамины (0,1 мг/л тиамин, 0,0005 мг/л биотин). Микроводоросли культивировали в лабораторном инкубаторе-шейкере Multitron (Infors HT) при температуре 24 °C, постоянном встряхивании при 150 об/мин и 5 % CO₂ в подаче воздуха. Интенсивность света составляла 160 мкмоль/м²/с при световом/темновом фотопериоде 16:8 ч. Культура депонирована в коллекции BOROK WDCM602 Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. Концентрацию нитратов и фосфатов определяли методом УФ-скрининга нитратов и фосфатного реагента Permachem PhosVer 3 с помощью UV-Vis спектрофотометра DR 6000 (HACH-Lange). Для получения данных о сухой массе биомассу собирали на 14-й день культивирования, центрифугировали (2900 × g, 15 мин) и лиофилизировали. Значение сухой массы записывали, а биомассу хранили в холодильнике при -70 °C до момента экстракции.

Для анализа индукции синтеза липидов использовали пять типов условий культивирования: среда WC*10 (контроль), стандартная среда WC с одним количеством азота и фосфора (WC*1), WC*10 без азота (-N), WC*10 без фосфора (-P), WC*10 без азота

и фосфора одновременно (-N-P). Все эксперименты проводились в трех независимых повторях культур.

2.1.1.2 Молекулярный анализ *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

Тотальную ДНК моноклональных культур выделяли с помощью суспензии InstaGene Matrix в соответствии с протоколом производителя. Фрагмент (641 пар оснований) части гена 18S рибосомальной РНК, внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (ITS1), гена 5.8S рибосомальной РНК и внутреннего транскрибируемого спейсера 2 (ITS2) амплифицировали с использованием праймеров ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White, T. J. et al. 1990). Амплификацию фрагмента 18S рРНК-ITS1-5.8S рРНК-ITS2 проводили с использованием готовой смеси ScreenMix для ПЦР (Evrogen, Россия). Условия амплификации включали начальную денатурацию в течение 5 мин при 95 °С, затем 35 циклов при 94 °С для денатурации (30 с), 60 °С для отжига (30 с) и 72 °С для удлинения (60 с), и финальное удлинение в течение 5 мин при 72 °С. Очистку фрагментов ДНК проводили с помощью набора ExoSAP-IT (Affymetrix, США). Секвенировали на анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Полученные последовательности редактировали вручную и собирали с помощью программ BioEdit v7.1.3, Ridom TraceEdit (ver. 1.1.0) и Mega6 (Tamura, K. et al. 2013). В выравнивания были включены вновь определенные последовательности и последовательности 21 штамма зеленых водорослей из GenBank.

Нуклеотидные последовательности были выровнены с помощью Mafft v7 на основе модели E-INS-i с параметрами по умолчанию (Katoh, K., et al. 2010). Байесовский информационный критерий (БИК), реализованный в jModelTest 2.1.1 (Posada, D. 2006), показал, что 2-параметрическая модель нуклеотидных замен Кимуры с гамма (G) распределенными по сайтам скоростями является наиболее подходящей эволюционной моделью для выравнивания 18S рРНК-ITS1-5.8S рРНК-ITS2. Филогении этих последовательностей были построены на основе этой модели с использованием байесовского вывода (БВ) и анализа максимального правдоподобия (ML). Анализ ВП проводился с помощью программы MrBayes 3.2.5 (Ronquist, F. et al. 2003). Три марковские цепи Bhot[^] и одна Bcold[^] были запущены на 2×10^6 циклов в двух повторях с отбором каждого 200-го сгенерированного дерева. Первые 25 % деревьев отбрасывались, филогенетическое дерево и апостериорные вероятности его ветвления получали на основе оставшихся деревьев, имея стабильные оценки параметров моделей нуклеотидных замен и

правдоподобия. ML-анализ проводили с помощью программы RAxML (Stamatakis, A. et al. 2008). Использовался непараметрический бутстреп-анализ с 1000 репликами. Значения статистической поддержки визуализировали в программе FigTree v1.4.0 (Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. 2024. URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>)

Вторичную структуру ITS2 оценивали с помощью веб-инструмента Mfold 2.3 (Zuker, M. 2003), базы данных ITS2 (Koetschan, C. et al. 2010), а также последовательностей и структур из (Caisová, L. et al. 2013). Вторичные структуры просматривали и редактировали с помощью программ PseudoViewer2.5 и 3 (Byun, Y. et al. 2009).

Последовательность *B. bullatus* MZ-Ch11, полученная в этом исследовании, была депонирована в GenBank под номером доступа KY066480.

2.1.1.3 Определение общего содержания липидов в биомассе микроводорослей

Общее содержание липидов определяли по методу (Bligh, E. G. et al. 1959) с модификациями. Замороженную лиофилизированную часть биомассы в количестве 200 мг, собранную на 14 день культивирования, смешивали с 3,2 мл метанола и гомогенизировали. После гомогенизации добавляли 4 мл хлороформа и 4 мл метанола, перемешивали в течение 15 мин. После перемешивания добавляли 4 мл хлороформа и 4 мл 0,3 % раствора NaCl. Верхнюю фракцию, содержащую метанол и раствор NaCl, отбрасывали. Нижнюю фракцию, содержащую хлороформ и липиды, выпаривали, а содержание липидов определяли гравиметрически.

2.1.1.4 Определение ацилглицеридов в биомассе микроводорослей

Ацилглицериды (ТАГ, ДАГ, МАГ) экстрагировали из 10-30 мг лиофилизированной биомассы 700 мкл смеси метанола и дихлорметана (1:1) с использованием гомогенизатора Minilys и стеклянных частиц (Vertin Technologies). Экстракт центрифугировали и отбирали супернатант. Экстракцию повторяли три раза и три экстракта объединяли. Перед анализом образцы фильтровали через фильтр PTFE 0,22 мкм. Образцы анализировали методом ВЭЖХ в градиентном режиме. ВЭЖХ-анализ экстракта липидов проводили на хроматографе Agilent 1260 серии Infinity с нормально-фазовой колонкой Agilent HPLC ZORBAX SIL (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм,) и детектором испарительного светорассеяния ELSD

Agilent 4260. Температура ELSD поддерживалась на уровне 50 °С, а скорость потока распыляющего газа N₂ 10 л/мин. Подвижная фаза представляла собой смесь растворителя А (смесь гексана 98 % и метил-трет-бутилового эфира 2 %) и растворителя В (смесь гексана 39,2 %, метил-трет-бутилового эфира 0,8 %, изопропанола 52 % и воды 8 %) при градиентном составе, убывающем от 100 % А до 100 % В за 15 мин и до 100 % А за 25 мин. Во всех экспериментах использовались объемы вкола 10 мкл и скорость потока 1 мл/мин. Температура колонки поддерживалась постоянной на уровне 40 °С. Общее время анализа составляло 25 мин. Колонка и сигнал детектора калибровались смесью стандартных образцов ТАГ, ДАГ и МАГ (1-моностеароил-рац-глиц-эрол С18:0, дистеарин С18:0, тристеарин С18:0, все от Sigma- Aldrich). Отдельные пики идентифицировали, сравнивая их время удерживания со временем удерживания чистых ТАГ, ДАГ и МАГ в стандартных смесях. Количественное определение ацилглицеридов проводили по площади пика с использованием калибровочной кривой. Сбор данных осуществляли с помощью программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation Edition для систем ЖХ и ЖХ/МС (Agilent Technologies). Статистическую обработку данных ВЭЖХ и ГХ/МС проводили в программе Microsoft Excel.

2.1.1.5 Анализ состава жирных кислот в биомассе микроводорослей

Для определения состава жирных кислот к 5-10 мг лиофилизированной биомассы добавляли 600 мкл нонадекановой кислоты в гексане (375 ppm), используемой в качестве внутреннего стандарта, три стеклянные частицы и 2 мл метанольного раствора HCl (1,25 M). Образец вортексировали в течение 1 мин и инкубировали 2 ч при $96,0 \pm 0,1$ °С на водяной бане с перемешиванием каждые 30 мин в течение 15 с. После 2 ч инкубации образец охлаждали до комнатной температуры и добавляли к смеси 1 мл насыщенного раствора NaCl. После разделения фаз отбирали аликвоту органической фазы объемом 100 мкл, разбавляли в 10 раз гексаном и анализировали с помощью ГХ/МС системы Thermo Scientific Trace GC Ultra DSQ II с программированием температуры (140 °С в течение 5 мин, нагрев до 280 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма 280 °С в течение 15 мин; объем вводимого образца 1 мкл с разделением 1:20; расход гелия > 99,9999 % - 1,2 мл/мин; колонка HP-5MS 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм). Колонка была откалибрована по стандартным образцам метиловых эфиров жирных кислот (47885 и 47040, Supelco, США). Метиловые эфиры жирных кислот количественно определяли методом полного ионного тока (EI,

70 эВ) в диапазоне масс 50-550 Да. Общее содержание жирных кислот оценивали как сумму всех обнаруженных жирных кислот с поправкой на чувствительность масс-селективного детектора согласно (Dodds, E. D. et al. 2005).

2.1.1.6 Проточная цитофлуориметрия и флуоресцентная микроскопия

Нейтральные липиды в клетках окрашивали нильским красным (исходный раствор 500 мг/л в ДМСО, Sigma-Aldrich) в концентрации 7,85 мкМ в течение 15 мин (Chen, W. et al. 2009). Изображение клеток, окрашенных нильским красным, получали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1 с аргоновым лазерным возбуждением и спектральной детекцией (возб. 450/90 нм, исп. 520 нм). Красный цвет соответствует хлоропластам и полярным липидам. Липидные капли с неполярными липидами имеют желтый цвет. Количество окрашенных нильским красным клеток оценивали с помощью проточного цитометра Guava EasyCyte, флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 488 нм, а детектировали в желтом канале (длина волны 583/26 нм).

2.1.1.7 Анализ данных

Результаты были получены в трех независимых повторностях культур. Все результаты представлены как средние \pm SE. Значимые различия между группами анализировали с помощью одностороннего анализа ANOVA с пост-хок тестом Тьюки. Значимые различия между двумя группами признавались при $P < 0,05$.

2.1.2 Культивирование, идентификация и химический анализ биомассы штаммов *Vischeria magna* SBV108 и *Mallomonas furcivata* SBV13

2.1.2.1 Молекулярная идентификация штамма *V. magna* SBV108

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 °С; затем 35 циклов, состоящих из денатурации (30 с) при 94 °С, отжига праймеров (30 с) при 52 °С и элонгации (50-80 с) при 72 °С; затем финальная элонгация в течение 10 мин при 72 °С. 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 Big Dye (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).

2.1.2.2 Молекулярная идентификация штамма *M. furtiva* SBV13

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 (Keith, H. R. 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 °С в течение 5 мин; затем 35 циклов, состоящих из денатурации при 94 °С в течение 30 сек, отжига праймеров при 52 °С в течение 30 сек и

элонгации при 72 °С в течение 40-90 сек; затем финальная элонгация при 72 °С в течение 10 мин. Условия амплификации для фрагментов *rbcL* были аналогичными, за исключением числа циклов (40) и температуры отжига праймеров (48 °С). 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, E. 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).

2.1.2.3 Электронная микроскопия микроводорослей рода *Mallomonas*

Для подготовки к исследованию аликвоту культуры тщательно отмывали путем трех циклов центрифугирования с деионизированной водой. Для проведения сканирующей электронной микроскопии отмытый образец высушивали на держателе для проб, затем покрывали золотом в течение 10 мин с помощью вакуумного испарителя JEE-4X (JEOL Ltd, Япония) и исследовали на сканирующем электронном микроскопе JSM 6510 LV (JEOL Ltd, Япония). Для проведения просвечивающей электронной микроскопии отмытый образец высушивали на сетке, покрытой формваровой пленкой EMS FF200-Cu-50 (Electron Microscopy Sciences, США) и исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL Ltd, Япония).

2.1.2.4 Культивирование микроводорослей

Выращивание *M. furtiva* SBV13 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* SBV108 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 инкубаторном шейкере Multitron (Infors a HT) при температуре 24 °C, постоянном перемешивании 150 об/мин и 5 % объемной доле CO_2 в подаваемом воздухе. Освещение интенсивностью 160 мкмоль фотонов/м²/с 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 AGS 260 с рабочим объемом 260 л (Рисунок 17, Приложение А).

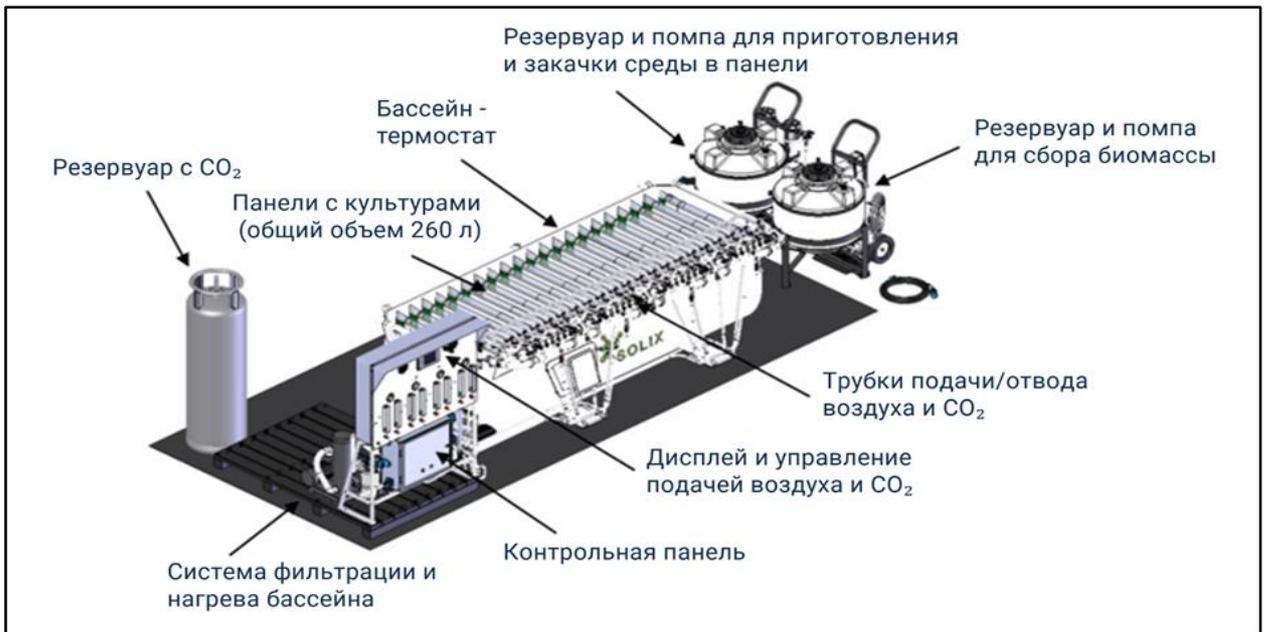


Рисунок 17 - Принципиальная схема фотобиореактора Lumian AGS 260.

Реактор работал в режиме периодического культивирования. Культуры выращивались одновременно в разных группах панелей. 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/м²/с в первую неделю культивирования и 235 мкмоль фотонов/м²/с 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 отбиралось из каждой панели для микроскопирования, определения сухой биомассы и содержания нитратов и фосфатов в среде. 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. Собранный 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).

2.1.2.5 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 400x 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.

2.1.2.6 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/м²/с 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 тысяч событий). В качестве контрольных образцов использовали живые культуры клеток, а также неокрашенные лиофилизированные клетки.

2.1.2.7 Определение содержания фукоксантина в биомассе микроводорослей

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 90 % 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:

$$\Phi (\% \text{ масс}) = 100 * (V_1 * C_1 + V_2 * C_2) / M,$$

где C_1 и C_2 - концентрации фукоксантина в первом и втором экстракте;

V_1 и V_2 - объемы первого и второго экстрактов;

M - масса навески биомассы.

2.1.2.8 Определение содержания эйкозапентаеновой кислоты и других жирных кислот в биомассе микроводорослей

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 °C 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 °C 5 мин, нагрев до 280 °C со скоростью 10 °C/мин, изотерма 280 °C 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.

2.1.2.9 Определение содержания белка в биомассе микроводорослей

Определение содержания общего белка проводили согласно методике из публикации (Lowry, O. H. 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 °С) 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).

2.1.2.10 Определение содержания жиров в биомассе микроводорослей

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.

2.1.2.11 Определение содержания углеводов в биомассе микроводорослей

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).

2.1.3 Исследование новых кормов для красной тилапии *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus* из биомассы микроводорослей

2.1.3.1 Приготовление тестовых кормов

Тестовые корма готовили путем влажного смешивания гомогенизированного коммерческого корма Supreme-15 с лиофилизированной биомассой микроводорослей *V. magna* и *M. furtiva* SBV13 в различных пропорциях. Полученную массу высушивали при 50 °С, гомогенизировали и просеивали через сито для получения однородных гранул размером 0,5-0,8 мм (соответствующего стартовому корму). Гомогенизированный корм Supreme-15 (Correns) использовался в качестве контроля, его состав приведен в Таблице 15.

Таблица 15 - Состав контрольного корма Supreme-15 (Correns).

Компонент	Содержание
Белок (% сухого веса)	46
Жиры (% сухого веса)	15
Клетчатка (% сухого веса)	1,8
Зола (% сухого веса)	8,1
Общий фосфор (% сухого веса)	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

2.1.4 Выращивание красной тилапии

Эксперименты по выращиванию тилапии выполнялись на базе кафедры Аквакультуры и водных биоресурсов ФГБУ ВО Астраханского Государственного Технологического Университета (АГТУ). Методика эксперимента и протоколы выращивания рыбы были одобрены Комитетом по этике работы с животными АГТУ. Мальки красной тилапии *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*, выращенные в

АГТУ, с начальным весом $0,56 \pm 0,04$ 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 °С, рН 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. 2007).

2.1.4.1 Контроль параметров воды

Температура, рН, 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).

2.1.4.2 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 начального химического

состава мяса. Сухая масса и содержание воды определяли высушиванием образцов при 103 °С в течение 4 часов до постоянного веса (ISO 6496). Содержание золы определяли путем сжигания образцов в муфельной печи при 550 °С в течение 4 часов (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.

2.1.4.3 Оценка ростовых характеристик и показателей эффективности кормления

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

1) Абсолютный прирост вычисляли как разность между усредненным итоговым (W_1) и начальным (W_0) весом рыбы в граммах.

2) Абсолютную скорость роста (AGR, Absolute Growth Rate) вычисляли по формуле:

$$AGR = \frac{W_1 - W_0}{T}$$

где:

W_0 - начальный вес рыбы, г;

W_1 - итоговый вес рыбы, г;

T - длительность эксперимента, дней.

3) Удельную скорость роста (SGR, Specific Growth Rate) вычисляли по формуле:

$$SGR = \frac{[\ln W_1 - \ln W_0]}{T} \times 100$$

где:

W_0 - начальный вес рыбы, г;

W_1 - итоговый вес рыбы, г;

T - длительность эксперимента, дней.

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

$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{Начальное количество рыб в аквариуме}}{\text{Конечное количество рыб в аквариуме}} \times 100\%$$

5) Конверсию корма (FCR, Feed Conversion Rate) 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:

$$PER = \frac{W_1 - W_0}{P_i}$$

где:

W_0 - начальный вес рыбы, г;

W_1 - итоговый вес рыбы, г;

P_i - суммарное потребление белка с кормом, г.

7) Эффективность использования белка (PPV, Protein Productive Value) вычисляли по формуле:

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

где:

P_0 - начальное 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, Energy Productive Value) вычисляли по формуле:

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

где:

E_0 - начальное 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 мокром весе, 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 ($p < 0,05$).

2.2 Синтез и изучение активности производных антибиотиков на основе триазеноиндола

2.2.1 Культуры эукариотических клеток

В работе использовались опухолевые и нормальные клетки человека (Таблица 16). Адгезионные клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина, при 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂. Суспензионные клетки HL-60 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина.

Таблица 16 - Характеристика используемых в работе клеточных линий.

Название клеточной линии	Номер клона в гистологической коллекции	Гистологическая характеристика
Опухолевые и трансформированные клеточные линии		
HL-60	CCL-240	Острый промиелоцитарный лейкоз человека
HerG2	HB-8065	Эпителиальная гепатокарцинома человека
HEK293T	CRL-3216	Трансформированные клетки почки эмбриона человека
Нормальные клетки		
HEF		Эмбриональные фибробласты человека

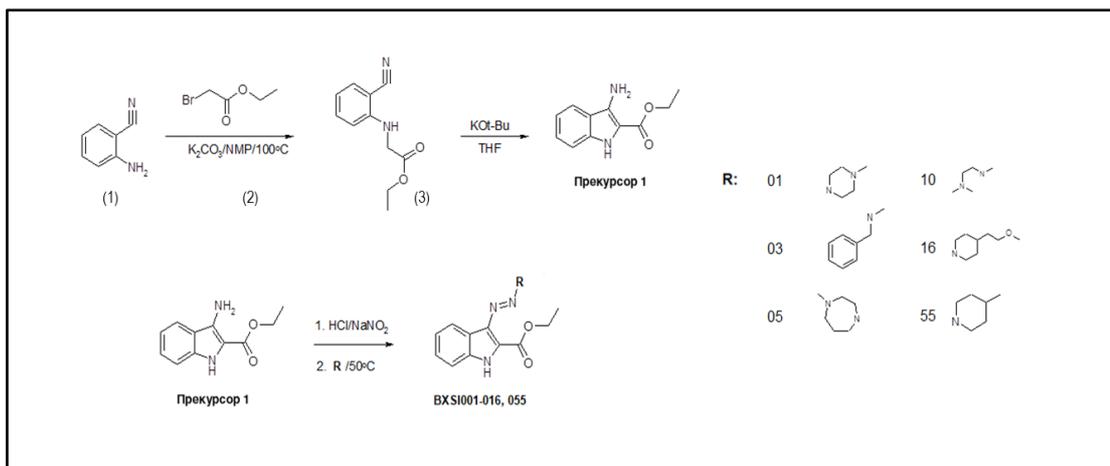
2.2.2 Среды для культивирования эукариотических клеток

Среда DMEM, среда DMEM/F12 1:1, среды RPMI-1640, 10 % эмбриональная телячья сыворотка (Invitrogen), фосфатный буфер PBS pH 7,4, раствор трипсина с ЭДТА 0,25 %, смесь антибиотиков (100x) Antibiotic-Antimicotic, (Invitrogen).

2.2.3 Синтез производных триазеноиндола

2.2.3.1 Синтез прекурсора 1

В круглодонную колбу объемом 500 мл добавляли 11,8 г (0,1 моль) 2-аминобензонитрила (1), 33,2 г (0,2 моль) этилового эфира бромоексусной кислоты (2), 41,1 г (0,3 моль) K_2CO_3 и 250 мл N-метил-2-пирролидона (Рисунок 18).



Реакционную смесь перемешивали в течение 6-8 часов при 100 °С. После охлаждения ее обработали 1000 мл воды и 200 мл этилацетата. Органический слой отделяли, сушили над безводным K_2CO_3 и выпаривали до объема 50 мл. Остаток пропускали через слой силикагеля 5×10 см в системе 1:2 этилацетат:гексан для отделения смолистых примесей. Фракции, содержащие соединение (3), выпаривали, растворяли в 150 мл абсолютного тетрагидрофурана и обрабатывали 11,2 г (0,1 моль) трет-бутоксид калия. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, выпаривали, обрабатывали 200 мл насыщенного раствора $NaHCO_3$ в воде и 200 мл этилацетата. Органический слой сушили над безводным K_2CO_3 и выпаривали. Остаток очищали на силикагеле 5×20 см в системе 1:2 этилацетат:гексан. Фракции, содержащие прекурсор 1 (контролируемые ЖХ/МС), выпаривали, остаток кристаллизовали из 20 мл метилхлорида. Выход на двух стадиях составил 3,7 г (18 %).

2.2.3.2 Синтез прекурсора 2

В круглодонную колбу объемом 500 мл добавляли 13,8 г (0,1 моль) 2-хлорпиридин-3-карбонитрила (1), 30,7 г (0,2 моль) гидрохлорида N-метилглицинового этилового эфира (2), 41,1 г (0,3 моль) K_2CO_3 и 250 мл N-метил-2-пирролидона (Рисунок 19).

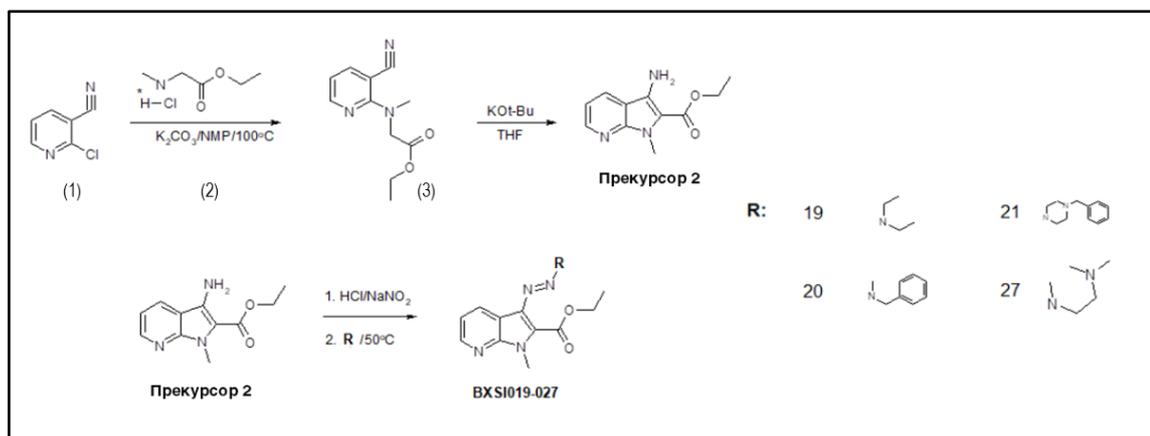


Рисунок 19 - Схема синтеза соединений BX-SI019, 020, 021, 027.

Реакционную смесь перемешивали в течение 6-8 часов при 100 °С. После охлаждения ее обработали 1000 мл воды и 200 мл этилацетата. Органический слой отделяли, сушили над безводным K_2CO_3 и выпаривали до объема 50 мл. Остаток пропускали через слой силикагеля 5×10 см в системе 1:2 этилацетат:гексан для отделения смолистых примесей. Фракции, содержащие соединение (3), выпаривали, растворяли в 150 мл абсолютного тетрагидрофурана и обрабатывали 11,2 г (0,1 моль) трет-бутоксид калия. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, выпаривали, обрабатывали 200 мл насыщенного раствора $NaHCO_3$ в воде и 200 мл этилацетата. Органический слой сушили над безводным K_2CO_3 и выпаривали. Остаток очищали на силикагеле 5×20 см в системе 1:2 этилацетат:гексан. Фракции, содержащие прекурсор 2 (контролируемые ЖХ/МС), выпаривали, остаток кристаллизовали из 20 мл метилхлорида. Выход на двух стадиях составил 4,6 г (21 %).

2.2.3.3 Синтез прекурсора 3

В круглодонную колбу объемом 500 мл добавляли 13,9 г (0,1 моль) 2,4-дифторбензонитрила (1), 27,8 г (0,2 моль) гидрохлорида этилового эфира глицина (2), 41,1 г (0,3 моль) K_2CO_3 и 250 мл N-метил-2-пирролидона (Рисунок 20).

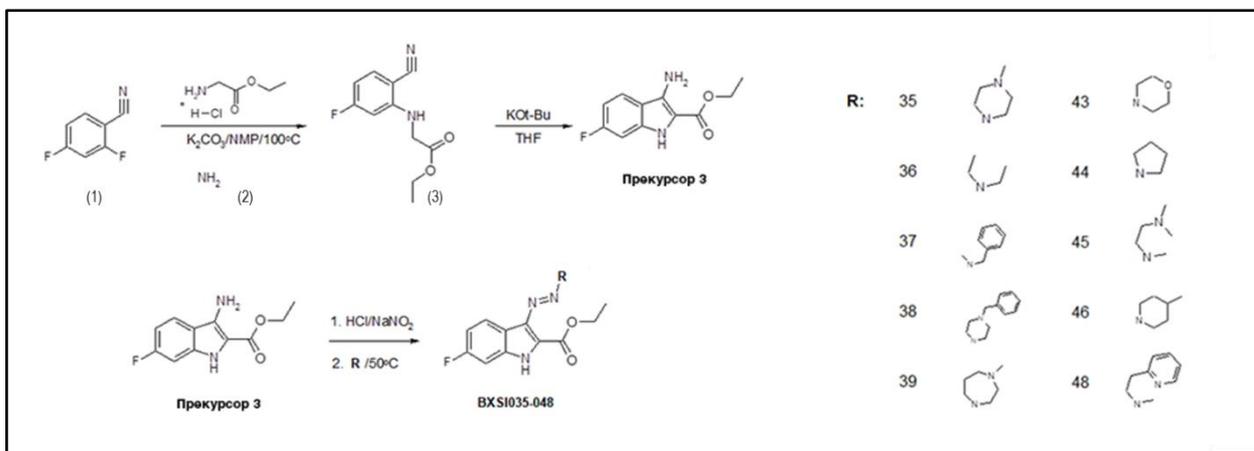


Рисунок 20 - Схема синтеза соединений BX-SI035, 036, 037, 038, 039, 040, 043, 044, 045, 048.

Реакционную смесь перемешивали в течение 6-8 часов при 100 °С. После охлаждения ее обработали 1000 мл воды и 200 мл этилацетата. Органический слой отделяли, сушили над безводным K_2CO_3 и упаривали до объема 50 мл. Остаток пропускали через слой силикагеля 5×10 см в системе 1:2 этилацетат:гексан для отделения смолистых примесей. Фракции, содержащие соединение (3), выпаривали, растворяли в 150 мл абсолютного тетрагидрофурана и обрабатывали 11,2 г (0,1 моль) трет-бутоксиды калия. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, выпаривали, обрабатывали 200 мл насыщенного раствора $NaHCO_3$ в воде и 200 мл этилацетата. Органический слой сушили над безводным K_2CO_3 и выпаривали. Остаток очищали на силикагеле 5×20 см в системе 1:2 этилацетат:гексан. Фракции, содержащие прекурсор 3 (контроль ЖХ/МС), выпаривали, остаток кристаллизовали из 20 мл метилхлорида. Выход на двух стадиях составил 1,5 г (7 %).

2.2.3.4 Синтез прекурсора 4

В круглодонную колбу объемом 500 мл добавляли 13,8 г (0,1 моль) 2-хлорпиридин-3-карбонитрила (1), 30,7 г (0,2 моль) гидрохлорида этилового эфира глицина (2), 41,1 г (0,3 моль) K_2CO_3 и 250 мл N-метил-2-пирролидона (Рисунок 21).

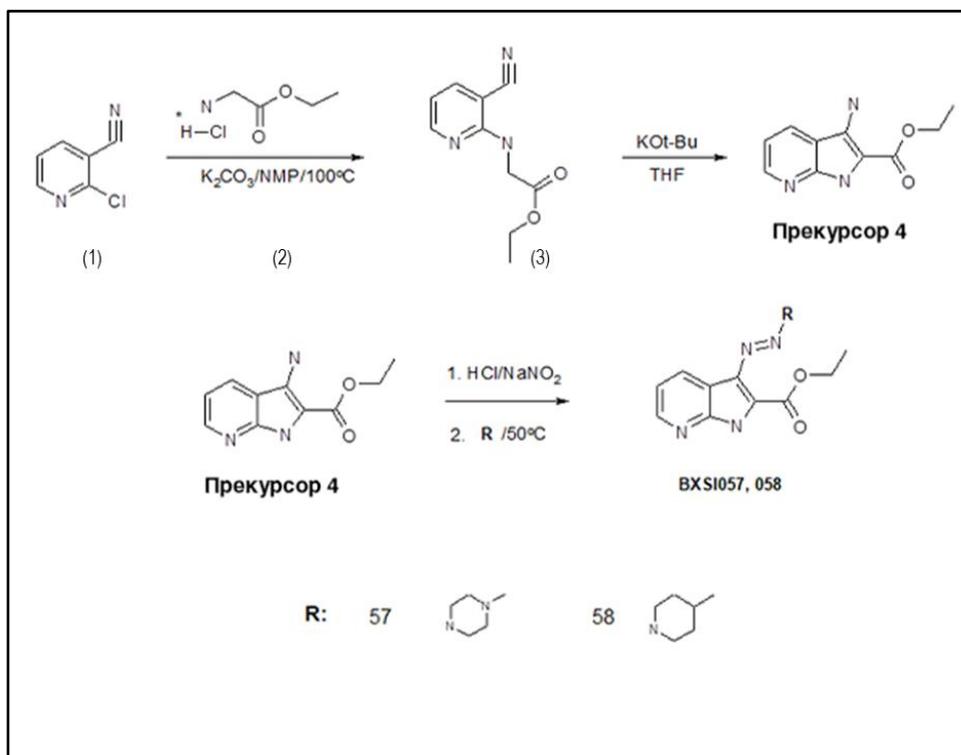


Рисунок 21 - Схема синтеза соединений BX-SI057, 058.

Реакционную смесь перемешивали в течение 6-8 часов при 100 °С. После охлаждения ее обработали 1000 мл воды и 200 мл этилацетата. Органический слой отделяли, сушили над безводным K_2CO_3 и выпаривали до объема 50 мл. Остаток пропускали через слой силикагеля 5×10 см в системе 1:2 этилацетат:гексан для отделения смолистых примесей. Фракции, содержащие соединение (3), выпаривали, растворяли в 150 мл абсолютного тетрагидрофурана и обрабатывали 11,2 г (0,1 моль) трет-бутоксид калия. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, выпаривали, обрабатывали 200 мл насыщенного раствора $NaHCO_3$ в воде и 200 мл этилацетата. Органический слой сушили над безводным K_2CO_3 и выпаривали. Остаток очищали на силикагеле 5×20 см в системе 1:2 этилацетат:гексан. Фракции, содержащие прекурсор 4 (контролируемые ЖХ/МС), выпаривали, остаток кристаллизовали из 20 мл метилхлорида. Выход на двух стадиях составил 4,9 г (24 %).

2.2.3.5 Синтез соединений VX-SI001, 003, 005, 010, 016, 055

В круглодонную колбу объемом 50 мл добавляли 0,22 г (0,001 моль) прекурсора 1, 1,5 мл воды и 5 мл диметилформамида. Реакционную смесь охладили до 5 °С с помощью ледяной бани. Затем добавили 0,3 мл концентрированной соляной кислоты. Через 15 мин в реакционную смесь добавили 0,086 г (0,00125 моль) нитрита натрия и оставили перемешиваться при этой температуре на 30 мин. После этого к смеси добавили 0,01 моль соответствующего вторичного амина 35-48 и нагревали при 50 °С в течение 1 часа. После охлаждения реакционную смесь разбавили 25 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровали и высушили.

2.2.3.6 Синтез соединений VX-SI019, 020, 021,027

В круглодонную колбу объемом 500 мл добавляли 0,22 г (0,001 моль) прекурсора 2, 5 мл воды и 5 мл диметилформамида. Реакционную смесь охладили до 5 °С с помощью ледяной бани. Затем добавили 0,3 мл концентрированной соляной кислоты. Через 15 мин в реакционную смесь добавили 0,086 г (0,00125 моль) нитрита натрия и оставили перемешиваться при этой температуре на 30 мин. После этого к смеси добавили 0,01 моль соответствующего вторичного амина 35-48 и нагревали при 50 °С в течение 1 часа. После охлаждения реакционную смесь разбавили 25 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровали и высушили.

2.2.3.7 Синтез соединений VX-SI035, 036, 037, 038, 039, 040, 043, 044, 045,048

В круглодонную колбу объемом 500 мл добавляли 0,22 г (0,001 моль) прекурсора 3, 5 мл воды и 5 мл диметилформамида. Реакционную смесь охладили до 5 °С с помощью ледяной бани. Затем добавили 0,3 мл концентрированной соляной кислоты. Через 15 мин в реакционную смесь добавили 0,086 г (0,00125 моль) нитрита натрия и оставили перемешиваться при этой температуре на 30 мин. После этого к смеси добавили 0,01 моль соответствующего вторичного амина 35-48 и нагревали при 50 °С в течение 1 часа. После охлаждения реакционную смесь разбавили 25 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровали и высушили.

2.2.3.8 Синтез соединений BX-SI057, 058

В круглодонную колбу объемом 500 мл добавляли 0,22 г (0,001 моль) прекурсора 4, 5 мл воды и 5 мл диметилформамида. Реакционную смесь охладили до 5 °С с помощью ледяной бани. Затем добавили 0,3 мл концентрированной соляной кислоты. Через 15 мин в реакционную смесь добавили 0,086 г (0,00125 моль) нитрита натрия и оставили перемешиваться при этой температуре на 30 мин. После этого к смеси добавили 0,01 моль соответствующего вторичного амина 35-48 и нагревали при 50 °С в течение 1 часа. После охлаждения реакционную смесь разбавили 25 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровали и высушили.

2.2.4 Определение растворимости в воде

Растворимость соединений в воде оценивали методом ВЭЖХ. Сравнивали площади пиков растворенного вещества в воде и ацетонитриле. Готовили две порции испытуемых соединений по 1,0 мг. Оба образца растворяли в 10 мкл диметилсульфоксида. К одному образцу добавляли 1,0 мл ацетонитрила, а ко второму 1,0 мл воды. Обе пробирки перемешивали в шейкере в течение 5 мин, затем центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отбирали для проведения хроматографии. Концентрация испытуемого соединения в воде определялась путем сравнения площадей пиков на хроматограмме. В качестве стандарта использовали образец, растворенный в ацетонитриле (концентрация 1,0 мг в 1,0 мл). Растворимость (мг/мл) определяли как отношение площади пика А (образец) к площади пика О (стандарт).

2.2.5 Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК)

Клинические изоляты MRSA с множественной лекарственной устойчивостью были получены из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии. Каждый штамм имел профиль чувствительности к антибиотикам, определенный в соответствии с брейкпоинтами EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2024. URL: <https://www.eucast.org/>).

МИК определяли методом последовательных разведений в бульоне в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20776-1-210. Настоящий стандарт идентичен международному ISO 20776-1:2006 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*».

Серийные разведения исследуемых соединений в 50 мкл бульона Мюллера-Хинтона (BD) готовили в 96-луночных микропланшетах. В качестве положительного контроля использовали антибиотики ванкомицин и линезолид (Sigma-Aldrich). Бактериальные суспензии тестируемых штаммов MRSA готовили в бульоне Мюллера-Хинтона (BD) с концентрацией 1×10^6 КОЕ/мл, а затем аликвоты по 50 мкл вносили в подготовленные микропланшеты. Конечные концентрации антибиотиков в лунках составляли 1, 0,5, 0,25 и 0,125 мг/л для исследуемых соединений и 2 мг/л для ванкомицина и линезолида. Во все планшеты были включены лунки с отрицательным контролем (отсутствие бактериальных клеток) и контролем роста (отсутствие соединения). Микропланшеты инкубировали при 37 °С в течение 18 ч. Рост оценивали визуально после инкубации, а за МИК принимали наименьшую концентрацию соединения, при которой наблюдалось подавление роста микроорганизмов (отсутствие видимого роста). Все эксперименты проводились в трех повторностях.

2.2.6 Исследование цитотоксичности синтезированных веществ

Первичный скрининг 22 веществ был проведен на эмбриональных фибробластах человека HEF. Гепатотоксичность 6 веществ, наиболее активных в отношении MRSA, дополнительно изучали на клетках карциномы печени человека HepG2. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen) при 37 °С и 5 % CO₂ в соответствии со стандартными протоколами культивирования тканей млекопитающих и стерильной техникой. Все клеточные линии перед использованием проверяли с помощью набора LookOut® Mycoplasma PCR Detection Kit (Sigma-Aldrich) в соответствии с протоколом производителя.

Время инкубации с веществом составляло 24 ч для всех веществ и клеточных линий. Открепление клеток трипсином, центрифугирование и подсчет в гемоцитометре проводили за 16 ч до добавления вещества. Для корректного подсчета клеток HepG2 клеточную суспензию пропускали через иглу шприца, чтобы избавиться от клеточных агрегатов. Клетки помещали в лунки 96-луночного планшета. Количество клеток на лунку выбирали в зависимости от свойств клеточной линии и конечной оптической плотности в

эксперименте. Фибробласты и гепатоциты использовали в количестве 10 тыс клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM/F12, дополненной 10 % фетальной бычьей сывороткой. Вещества добавляли в 100 мкл среды в лунках так, чтобы конечные концентрации составляли 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125, 1,62 мг/л. Конечный объем лунки составлял 200 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали среду, содержащую эмбриональную телячью сыворотку без добавления веществ. Через 24 часа избыточное количество среды отбрасывали. В каждую лунку добавляли 30 мкл раствора МТТ (5 мг/мл в PBS). После осаждения кристаллов формазана (3 ч инкубации) их растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида. Оптическую плотность (OD) измеряли при 570 нм с помощью микропланшетного ридера (Eppendorf). Для каждого из веществ и каждой культуры клеток жизнеспособность клеток оценивали не менее чем в трех независимых экспериментах, каждую концентрацию в эксперименте добавляли в трех повторностях.

Выживаемость клеток рассчитывалась по формуле:

$$(OD \text{ обработанных клеток} - OD \text{ blank}) / (OD \text{ контрольных клеток} - OD \text{ blank}) \times 100 \%,$$

где OD blank - значения OD в лунках без клеток, но с добавлением раствора МТТ и ДМСО.

Результаты представляли в виде кривых цитотоксичности, графики также строили в программе Microsoft Excel, расчет значений полумаксимальной ингибирующей концентрации IC₅₀ проводили в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc) на основании уравнений кривых цитотоксичности.

2.2.7 Оценка стабильности в искусственных желудочном и кишечном соках

Для получения искусственного желудочного сока использовали имитацию желудочной жидкости (RICCA Chemical Company) с добавлением пепсина до конечной концентрации 6,4 мг/мл. Конечный раствор имел pH 1,2, что имитирует среду желудка в состоянии голодания.

Искусственный кишечный сок был приготовлен путем растворения 6,8 г KН₂РO₄ и 77 мл 0,2N NaOH в 750 мл воды и добавления панкреатина (Biosintez) для конечной концентрации 10 мг/мл. Конечный pH 6,8 регулировался добавлением воды.

В качестве контрольного соединения использовали хлорамбуцил (Sigma-Aldrich), который стабилен в желудочном соке и нестабилен в кишечном соке.

Для оценки стабильности 3 мкл 100X растворов испытуемого или контрольного соединения (0,1 мМ) добавляли к 297 мкл соответствующего сока (предварительно

подогретого до 37 °С) до конечной концентрации 1 мкМ. Образцы сока инкубировали с тестовыми и контрольными соединениями в микропробирках объемом 0,65 мл при 37 °С и вращении 300 об/мин. Через 15, 60 и 240 мин аликвоты по 30 мкл переносили в микропробирки объемом 1,1 мл с 180 мкл охлажденного ацетонитрила с внутренним стандартом 200 нг/мл толбутамида (Fluca). Пробирки перемешивали и выдерживали при 4 °С в течение 15 мин, затем центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин. 200 мкл супернатантов переносили в микропробирки и хранили при -70 °С до проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа. Количественный анализ проводили методом калибровки по внутреннему стандарту.

2.2.8 Оценка проникновения через клеточный барьер *in vitro*

Тест-система MultiScreen Caco-2 (Millipore) использовалась для изучения транспорта через клеточный монослой в соответствии с инструкциями производителя. Исследование транспорта от апикальной мембраны к базолатеральной (А-В) и в обратном направлении (В-А) проводилось на 21-дневной культуре Caco-2 (АТСС № НТВ-37) при концентрации тестируемого соединения 1 мкМ в течение 2 часов. Целостность монослоя проверяли путем измерения электрического сопротивления (TEER) с помощью прибора Millicell-ERS. Значение TEER не менее 3 кОм на лунку считалось приемлемым. Использовали несколько контрольных соединений, приобретенных у Sigma-Aldrich: ранитидин (низкая проницаемость), пропранолол (высокая проницаемость), родамин (транспорт Pgp).

2.2.9 Определение стабильности в микросомах печени

Метаболизм вещества в печени изучали в микросомальных фракциях печени человека и крысы (XenoTech НММСРL, RТМСРL) в присутствии кофактора окислительных ферментов NADPH (AppliChem).

208 мкл 1,156X раствора микросом в фосфатном буфере с рН 7,4 (BD Gentest) помещали в лунки 96-луночного планшета. Планшет инкубировали в термошейкере в течение 10 мин при 400 об/мин и 37 °С, затем в каждую лунку добавляли по 2,4 мкл 100-кратного раствора исследуемого вещества. В каждую лунку (2 повтора) добавляли 30 мкл 8X раствора кофактора, в одну контрольную лунку добавляли 30 мкл деионизированной

воды, все лунки перемешивали 3 раза с помощью многоканальной пипетки объемом 100 мкл. После перемешивания планшет помещали в термошейкер при 400 об/мин и 37 °С. Реакции прекращали в следующие временные точки - 0, 5, 10, 15, 20, 30 мин - путем переноса 30 мкл реакционной смеси из соответствующей лунки в микропробирки объемом 1,1 мл и добавления 180 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом 200 нг/мл толбутамида (Fluca). Для оценки стабильности вещества в микросомах без кофактора отбирали 2 аликвоты из контрольной лунки и прекращали реакцию в моменты времени 0 и 30 мин. Осаждение белка проводили на льду в холодильнике при 4 °С в течение 15 мин. Затем образцы центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g и отбирали 150 мкл супернатанта для ВЭЖХ-МС/МС анализа. Количественный анализ проводили методом калибровки по внутреннему стандарту.

Метаболические параметры рассчитывали по графику зависимости нормализованных площадей хроматографических пиков L_n от времени:

$$k = -\alpha;$$

где k - константа скорости элиминации; α - наклон линейного участка графика

$$t_{1/2} = 0,693/k;$$

где $t_{1/2}$ - время полувыведения (мин); k - константа скорости элиминации

$$Cl_{int} = k \times 1000/m;$$

где Cl_{int} - клиренс *in vitro* (мкл/мин/мг белка); k - константа скорости элиминации; m - концентрация микросом (мг/мл).

2.2.10 Оценка ингибирования активности изоформ цитохрома P450

Влияние исследуемого соединения на активность основных изоформ цитохрома P450 печени человека (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 2C8) изучали с использованием микросом печени человека (XenoTech) и соответствующих субстратов: фенацетина, тестостерона, толбутамида, S-мефенитоина, декстрометорфана гидробромида и амодиахина дигидрохлорида дигидрата (Sigma-Aldrich). В качестве контроля использовались известные специфические ингибиторы изоформ: α -нафтофлаван, сульфafenазол, флувоксамин, хинидин, кверцетин, кетоконазол (Sigma-Aldrich).

Исследуемое соединение в концентрации 0,0046-10 мкМ инкубировали с микросомами человека в присутствии NADPH и смеси из 7 субстратов. Реакцию останавливали через 20 мин добавлением ацетонитрила. Образовавшиеся метаболиты определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Количественный анализ проводили методом

калибровки по внутреннему стандарту. Расчет значений полумаксимальной ингибирующей концентрации IC_{50} проводили в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.) на основании уравнений экспериментальных кривых.

2.2.11 Оценка стабильности в плазме крови крыс и человека

Плазму человека и крысы для эксперимента размораживали при комнатной температуре и центрифугировали в течение 5 мин при 1500 g. В качестве контрольного соединения использовали эукатропин (Sigma-Aldrich), который нестабилен в плазме человека и крысы.

Для оценки стабильности 3 мкл 100X раствора испытуемого или контрольного соединения (0,1 мМ) добавляли к 297 мкл соответствующей плазмы (предварительно подогретой до 37 °С) до конечной концентрации 1 мкМ. Образцы плазмы инкубировали с тестовыми и контрольными соединениями в микропробирках объемом 0,65 мл при 37 °С и перемешивании со скоростью 300 об/мин. Через 15, 30, 60 и 240 мин аликвоты по 30 мкл переносили в микропробирки объемом 1,1 мл, содержащие 180 мкл охлажденного ацетонитрила с внутренним стандартом толбутамидом (Fluca) в концентрации 200 нг/мл. Пробирки перемешивали и выдерживали при 4 °С в течение 15 мин, затем центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин. 200 мкл супернатантов переносили в микропробирки и хранили при -70 °С до проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа. Количественный анализ проводили методом калибровки по внутреннему стандарту.

2.2.12 Оценка связывания с белками плазмы

Связывание исследуемого вещества с белками плазмы крови человека и крысы изучали методом равновесного диализа. Для определения связывания с белками использовали объединенные образцы человеческой плазмы, разбавленные буфером до 50 %. Исследование проводилось в 48-луночном диализном планшете с тефлоновым покрытием. Каждая лунка содержала две отдельные камеры, разделенные вертикальной полупроницаемой диализной мембраной с порами 8 кДа. В одну из камер вносили образец плазмы с 1 мкМ исследуемого соединения, а в другую - буферный раствор с pH 7,2. Со временем происходила пассивная диффузия несвязанного соединения и достигалось

состояние равновесия между плазмой и буферными камерами. Количество свободной фракции оценивали с помощью ВЭЖХ-МС/МС. В ходе исследования также оценивали стабильность соединений в течение 4 часов и их пассивный транспорт через диализную мембрану с помощью баланса масс. В качестве контрольного соединения использовали варфарин (Sigma-Aldrich) в концентрации 1 мкМ.

2.2.13 Исследование потенциальной кардиотоксичности вследствие блокады hERG

Определение связывания соединения BX-SI043 с K⁺-ионным каналом hERG проводили с помощью набора Predictor hERG Fluorescence Polarization Assay Kit (Invitrogen) в концентрациях 0,016, 0,08, 0,4, 2, 10 и 50 мкМ в соответствии с инструкцией производителя. Метод основан на измерении изменения поляризации флуоресценции, вызванного вытеснением высокоаффинного флуоресцентного трейсера тестируемым соединением. В качестве контрольного соединения использовали селективный ингибитор hERG-каналов E-4031. 2X-раствор мембран, содержащих каналы hERG, готовили и помещали в 384-луночный планшет. Испытуемое вещество, контрольное вещество, буфер и трейсер помещали в соответствующие лунки и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 2 часов. Измерение поляризации флуоресценции проводили на планшетном ридере Infinite M1000 PRO со следующими параметрами: 10 вспышек на лунку; длина волны центра возбуждения 530 нм, ширина полосы 5 нм; длина волны центра эмиссии 585 нм, ширина полосы. Расчет значений полумаксимальной ингибирующей концентрации IC₅₀ проводили в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.) на основании уравнений экспериментальных кривых.

2.2.14 Токсикологические исследования на животных: однократная острая токсичность на крысах

2.2.14.1 Лабораторные животные

Схема эксперимента и протоколы работы с животными проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/EU (Директива 2010/63/EU. 2012) по проведению экспериментов на животных. 56 аутбредных крыс Вистар (возраст 6-9 недель, масса тела 185-205 г) были приобретены в НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» и содержались в течение одной недели в

стандартных адаптационных условиях, после чего были случайным образом разделены на контрольную группу (4 самца и 4 самки) и четыре экспериментальные группы (6 самцов и 6 самок). Масса тела животных не отклонялась от среднего по всем группам больше чем на 20 %. Самки не были беременными или рожавшими.

Были использованы животные, свободные от *Chlamidia spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pasteurellaceae/Pasteurella spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococci β-haemolytic*, *Citrobacter rodentium*, *Clostridium piliforme*, *Corynebacterium kutscheri*, *Klebsiella spp.*, эндо- и эктопаразитов (клещей, гельминтов и простейших).

Крыс содержали в стандартных прозрачных пластиковых клетках, группами по 3-4 особи, на подстилке; клетки покрыты стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением общей площадью 1819 см². Минимальная площадь пола на одно животное соответствовала нормативной документации.

Крысы получали корм для содержания лабораторных животных изготовленный по ГОСТ Р50258-92 «Комбикорма полнораціонные для лабораторных животных. Технические условия». Корм давали *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Декларация соответствия - РОСС RU.ПСО2.Д00028 срок действия до 07.07.2019.

Животные получали воду, очищенную и нормированную по органолептическим свойствам, по показателям рН, сухого остатка, восстанавливающих веществ, диоксида углерода, нитратов и нитритов, аммиака, хлоридов, сульфатов, кальция и тяжелых металлов на основании СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

Воду в стандартных поилках со стальными крышками-носиками давали *ad libitum*.

В качестве подстилки использовали древесные гранулы размерами 6 мм из лиственных пород древесины.

Крыс содержали в контролируемых условиях окружающей среды (19-25 °С и относительной влажности воздуха 30-70 %, NH₃ ≤ 10 мг/м³, CO₂ ≤ 0,15 об. %). Световой режим составил 12 часов света и 12 часов темноты. Был установлен режим воздухообмена, обеспечивающий смену около 15-ти объемов помещения в час.

Температуру и влажность воздуха в виварии регистрировали ежедневно. Регистрация уровня аммиака и углекислого газа производилась ежеквартально. В период адаптации и в ходе эксперимента никаких существенных отклонений перечисленных параметров не произошло.

2.2.14.2 Способ введения и выбор доз

Перед введением субстанцию ВХ-SI043 ресуспендировали в 1 %-ном растворе крахмала. Животные экспериментальных групп получали суспензию внутривентрикулярно в дозах 2000 мг/кг (вводили двумя равными дозами с интервалом 30 - 40 мин), 1000 мг/кг, 600 мг/кг и 300 мг/кг (вводили в одной дозе). Контрольная группа получала внутривентрикулярно 1 % раствор крахмала в объеме 13,2 мл/кг (в двух равных дозах с интервалом 30-40 мин).

Суспензии в 1 % растворе крахмала готовили ежедневно перед введением. Концентрация полученных суспензий составила:

для дозы 300 мг/кг - 30 мг/мл (объем введения - 10 мл/кг),

для дозы 2000 мг/кг - 151,5 мг/мл (общий объем введения - 13,2 мл/кг, введение дробное, за два раза по 6,6 мл/кг, интервал между введениями 30 - 40 мин),

для дозы 1000 мг/кг - 100 мг/мл (объем введения - 10 мл/кг),

для дозы 600 мг/кг - 60 мг/мл (объем введения - 10 мл/кг).

Контрольная группа получала внутривентрикулярно 1 % раствор крахмала в объеме 13,2 мл/кг, введение дробное, за два раза по 6,6 мл/кг, интервал между введениями 30-40 мин. Условия эксперимента для животных контрольной и экспериментальных групп полностью идентичны.

2.2.14.3 Регистрация эффектов острой токсичности

За животными ежедневно наблюдали на предмет отклонений от нормы. На 2-й, 7-й и 13-й день после введения животным проводили клинический осмотр, взвешивали и измеряли потребление корма и воды.

При оценке острой токсичности животные находились под непрерывным наблюдением первые 30 мин после введения последней порции субстанции, затем ежедневно в течение 4 часов, затем через 24 часа и далее ежедневно.

Регистрировали следующие параметры:

- поведение: угнетение/возбуждение;
- реакция на раздражители: снижение/повышение;
- кожные покровы: покраснение/бледность/синюшность/желтушность;
- слизистые оболочки: покраснение/бледность/синюшность/желтушность;

- выделения: из глаз/из носа/из анального отверстия/из уретры;
- тонус мускулатуры: снижение/повышение;
- нарушение координации движений: атаксия/гиперкинез;
- одышка;
- внешний вид места введения;
- смерть;

Массу тела регистрировали непосредственно перед введением субстанции, на 2-й, 7-й дни после введения и перед эвтаназией для расчета процентного отношения массы органов к массе тела. Процедуру совершали на лабораторных электронных весах Vibra AJ-1200CE (Shinko Denshi, Япония).

При клиническом осмотре оценивали следующие параметры:

- поведение: норма/угнетение/возбуждение/агрессия;
- реакция на раздражители: норма/снижение/повышение;
- упитанность: норма/истощение/ожирение;
- тонус мускулатуры: норма/снижение/увеличение;
- шерсть: норма (гладкая, блестящая)/взъерошенная/выпадение шерсти/тусклая/загрязненная/изменение цвета;
- кожные покровы: тургор (норма, снижен)/цвет (норма, покраснение, бледность, синюшность, желтушность, кровоизлияния)/целостность (норма, ссадины, трещины, раны)/пальпируемые образования.
- слизистые оболочки:

Цвет: норма/покраснение/бледность/синюшность/желтушность;

нарушение целостности слизистых оболочек;

- глаза: норма/экзофтальм (пучеглазие)/нарушение целостности/выделения;
- носовая полость: норма/серозные выделения/гнойные выделения/кровянистые выделения;
- ротовая полость: норма/слюнотечение/запах.

Осмотр на открытой площадке:

- положение тела в пространстве: норма/вынужденное лежание/вынужденное блуждание по кругу/вынужденное движение вперед и назад/вынужденное стремление лежать на одном боку;
- нарушение координации движения: норма/атаксия/гиперкинез;
- тип дыхания: норма/грудной/брюшной/одышка;
- дефекация: норма/диарея/наличие крови в кале/изменение цвета кала;
- мочеиспускание: норма/изменение цвета.

Оценку потребления корма и воды проводили на группу с расчетом среднего значения на одно животное. Для этого животным выдавали фиксированное количество корма и воды, ровно через 24 часа измеряли оставшееся количество корма и воды. Оценку потребления проводили еженедельно.

Животных лишали корма за 16 часов до взвешивания и перед некропсией, доступ к воде при этом не ограничивали.

2.2.14.4 Патоморфологические исследования

Патоморфологическому исследованию подлежали все экспериментальные животные.

Патоморфологическое исследование включало в себя некропсию, макроскопическое исследование и взвешивание внутренних органов. Некропсия была выполнена под непосредственным наблюдением врача-патоморфолога. После эвтаназии животные были тщательно обследованы на предмет внешних патологических признаков. Было проведено исследование состояния грудной и брюшной полости и макроскопическое исследование внутренних органов, места введения.

Органы, извлеченные при некропсии, были взвешены, парные органы взвешивали вместе. Данный показатель был использован для расчета процентного отношения массы органов к массе тела.

Процедура взвешивания была осуществлена на электронных весах «Adventurer» модель RV 214 (OHAUS, Китай).

Перечень органов, подлежавших взвешиванию:

- сердце
- легкие с трахеей
- тимус
- печень
- селезенка
- почки
- надпочечники
- головной мозг
- семенники/ яичники

Коллекция органов

При плановой некропсии были взяты органы (фрагменты органов) и ткани, указанные ниже, и зафиксированы в 10 % рН-нейтральном формалине:

- легкие с трахеей
- сердце
- тимус
- печень
- почки
- селезенка
- желудок
- тонкая кишка
- толстая кишка
- головной мозг
- надпочечники
- семенники/ яичники

Для оценки местно-раздражающего действия субстанции при проведении процедуры некропсии регистрировали отклонения во внешнем виде органов желудочно-кишечного тракта.

2.2.14.5 Анализ данных

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Проверку на соответствие закону нормального распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk's W test). В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением n представлены в итоговых таблицах работы. В случаях несоответствия данных закону нормального распределения была рассчитана медиана и квартильный размах. Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован критерий Стьюдента, для непараметрических данных - критерий Манна-Уитни. Различия были определены при 0,05 уровне значимости.

Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, USA).

2.3 Скрининг цитотоксичности экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий

2.3.1 Получение экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий для исследования активация сигнальных путей и изучения цитотоксичности

Микроводоросли и цианобактерии для эксперимента культивировались в течение 14 дней в термостатируемом орбитальном шейкере при температуре 24 °С, световом режиме 16 часов свет/ 8 часов темнота, освещенности 200 мкмоль фотонов/м²с, концентрации углекислого газа 5 %. Для пресноводных штаммов микроводорослей использовалась среда WC (модификация с десятикратным содержанием азота и фосфора). Выращивание пресноводных цианобактерий проводилось на среде BG-11 (Waterbury, J. V. et al. 1981). Среда содержала 1,5 г/л NaNO₃; 0,04 г/л K₂HPO₄*3H₂O; 0,075 г/л MgSO₄*7H₂O; 0,036 г/л CaCl₂*2H₂O; 0,006 г/л лимонной кислоты; 0,006 г/л цитрата железа(III)-аммония; 0,001 мг/л Na₂EDTA-Mg; 0,02 г/л Na₂CO₃; микроэлементы (0,28 мг/л H₃BO₃; 0,18 мг/л MnCl₂*4H₂O; 0,022 мг/л ZnSO₄*7H₂O; 0,004 мг/л Na₂MoO₄*2H₂O; 0,008 мг/л CuSO₄*5H₂O; 0,005 мг/л Co(NO₃)₂*6H₂O) и витамины (0,1 мг/л тиамин, 0,0005 мг/л биотин).

Для морских штаммов использовалась среда F/2 (модификация с десятикратным содержанием азота и фосфора) (Guillard, R. R. L. et al. 1962), (Guillard, R. R. L. 1975). Среда содержала 0,75 г/л NaNO₃; 0,05 г/л NaH₂PO₄*H₂O; 0,03 г/л Na₂SiO₃*9H₂O; 0,0044 г/л Na₂EDTA; 0,0031 г/л FeCl₃*6H₂O; 10,37 г/л NaCl; 1,72 г/л Na₂SO₄; 0,29 г/л KCl; 0,075 г/л NaHCO₃; 0,037 г/л NaBr; 0,011 г/л H₃BO₃; 0,0013 г/л NaF; 4,69 г/л MgCl₂*6H₂O; 0,658 г/л CaCl₂*2H₂O; 0,01 г/л SrCl₂*6H₂O, микроэлементы (0,008 мг/л CuSO₄*5H₂O; 0,022 мг/л ZnSO₄*7H₂O; 0,02 мг/л CoCl₂*6H₂O; 0,18 мг/л MnCl₂*4H₂O; 0,004 мг/л Na₂MoO₄*2H₂O) и витамины (0,1 мг/л тиамин, 0,0005 мг/л биотин). По истечении 14 дней биомассу отделяли центрифугированием, затем лиофилизировали и хранили при -70 °С. Из лиофилизата готовили этанольный экстракт (5 частей спирта на 1 часть биомассы). После добавления этанола образец гомогенизировали с помощью стеклянных бус, затем оставляли в темноте на 1 ч. По истечении часа отделяли дебрис и бусы с помощью центрифугирования, затем проводили дополнительно двухступенчатую фильтрацию на фильтре 0,22 мкм. Полученный фильтрат в тот же день отвозили для проведения эксперимента на клетках.

2.3.2 Культивирование эукариотических клеток для исследования активация сигнальных путей и изучения цитотоксичности экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий

Изучение действия экстрактов проводили в отношении клеток человеческой промиелоцитарной лейкемии HL-60, полученных из коллекции ATCC.

Криопробирку с образцом размораживали при комнатной температуре. После оттаивания клеточную суспензию переносили в пробирку на 15 мл, постепенно разбавляя холодной средой RPMI-1640 до 6 мл. После отмывки центрифугированием (300 g, 10 мин) клетки рассаживали по 200 тыс в лунки 24-х луночного планшета. На следующий день после разморозки клетки повторно отмывали центрифугированием в тех же условиях и рассаживали в культуральные флаконы. Культивирование клеток осуществляли в полной среде, приготовленной на основе среды RPMI-1640 (Gibco), содержащей 10 % FBS (Gibco), пенициллин (100 мкг/мл) и стрептомицин (100 ед/мл). FBS предварительно инактивировали нагреванием в течение 30 мин при 56 °С. Клетки культивировали во флаконах (25 и 75 см; Greiner, Германия) или в планшетах (24- и 6-луночных) в CO₂-инкубаторе (37 °С, содержание CO₂ в атмосфере - 5 %) с пересевом каждые 72 ч, исходная концентрация клеток HL-60 - 2×10^5 клеток/мл.

2.4 Биоинформатический анализ активации клеточных сигнальных путей при воздействии экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий

Клетки линии HL-60 обрабатывали экстрактами биомассы микроводорослей и цианобактерий в течение 6 часов. Препараты суммарной РНК из образцов клеток HL-60, были приготовлены для профилирования геной экспрессии. В качестве положительного контроля использовался антимикробный пептид полифемузин III (Marggraf, M. B. et al. 2018). В качестве отрицательного контроля использовались необработанные клетки в культуральной среде. Были исследованы эффекты 50 экстрактов биомассы микроводорослей и цианобактерий, каждый эксперимент был проведен в трех повторностях. Для анализа отбирали по 1 млн клеток HL-60 на образец, после завершения инкубации центрифугировали и выделяли тотальную РНК с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen). Затем проводили контроль качества РНК с помощью биоанализатора Agilent 2100. Для измерения концентрации РНК использовались наборы RNA 6000 Nano

или Qubit RNA Assay Kit. Полученные препараты суммарной РНК подвергали скринингу с использованием гибридизации на микрочипах. Для синтеза олигонуклеотидных зондов на чипах Custom Array ECD 4X2K / 12K использовался синтезатор ВЗ. Для обратной транскрипции и амплификации библиотек использовали набор Complete Whole Transcriptome Amplification WTA2 Kit (Sigma). Протокол производителя был модифицирован путем добавления смеси биотинилированного dUTP в реакцию амплификации dNTP, в результате чего конечное соотношение dTTP/биотин-dUTP составило 5/1. Гибридизацию проводили в соответствии с протоколом CustomArray ElectraSense™. Гибридизационная смесь содержала 2,5 мкг меченой библиотеки ДНК, 6X SSPE, 0,05 % Tween-20, 20 mM EDTA, 5x раствор Денхардта, 100 нг/мкл сонифицированной гДНК тимуса теленка, 0,05 % SDS. Гибридизационную смесь инкубировали с чипом в течение ночи при 50 °С. Эффективность гибридизации оценивали электрохимически с помощью набора CustomArray ElectraSense Detection Kit™ и считывателя ElectraSense™ 4X2K/12K.

2.4.1 Анализ уровня активации сигнальных путей

В каждом образце измеряли уровень экспрессии 2211 генов. Данные были квантильно нормализованы с помощью библиотеки «preprocessCore» R. Для квантильно-нормализованных данных были рассчитаны PAL (Pathway activation level). PAL для путей в образце рассчитывается следующим образом:

$$PAL_p = \sum ARR_{np} \cdot BTIF_n \cdot \ln(CNR_n),$$

где CNR_n (case-to-normal ratio) - отношение уровня экспрессии гена n в исследуемом образце к среднегеометрическому уровню экспрессии гена n в группе контрольных образцов. Булевский флаг $BTIF_n$ (beyond tolerance interval flag) равен нулю, если значение CNR_n не прошло критерий значимости: когда разница с контрольной группой образцов не является значимой, где $p > 0,05$. ARR_n, p (активаторная/репрессорная роль гена n в пути p) - дискретная величина, равная -1, когда продукт гена n является репрессором пути p ; 1, когда продукт гена n является активатором пути p ; 0, когда продукт гена n обладает как активностью активатора, так и репрессора пути p ; 0,5 и -0,5, соответственно, когда генный продукт n является скорее активатором или репрессором пути p .

Расчеты проводили с помощью программы oncoBoxlib (Sorokin, M. et al. 2021), используя 7 контрольных образцов для нормализации. Контрольные образцы представляли собой результаты измерения уровней экспрессии в клеточных линиях, не подвергнутых

воздействию экстрактов. Дифференциально активированные пути определяли с помощью теста Манна-Уитни, выполненного с использованием библиотеки `scipy Python` (версия 1.10.1). Визуализацию узлов путей проводили с помощью программы `OncoboxPD` (Zolotovskaia, M. A. et al. 2022). Помимо анализа дифференциальной активации был проведен дисперсионный анализ ANOVA для того, чтобы выявить пути, активация которых различается между подгруппами образцов, обрабатываемых разными концентрациями действующего вещества. Анализ был проведен при помощи библиотек `Python SciPy` (версия 1.14) (Virtanen, P. et al. 2020).

2.4.2 Визуализация результатов статистического тестирования методом Volcanoplot

Для представления результатов дифференциальной активации сигнальных путей по аналогии с классическим анализом дифференциальной экспрессии генов был выбран метод `Volcanoplot`. Этот метод позволяет представить результаты статистического тестирования (сравнения P_{AL} между контрольными образцами и образцами, обработанными экстрактами) в виде графика, по оси X которого отложена та или иная мера эффекта воздействия (в нашем случае была выбрана метрика Cohen's D - разница средних значений двух тестируемых выборок, нормированная на их приведенное стандартное отклонение), а по оси Y - отрицательный логарифм p значения статистического теста. Это позволяет идентифицировать достоверно изменившиеся активации сигнальных путей, изменение которых при этом было относительно велико.

2.4.3 Анализ дифференциальной экспрессии генов

Анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью пакета `LIMMA R` (версия 3.52.4) (Ritchie, M. E. et al. 2015). Образцы, обработанные экстрактами, сравнивали с контрольной группой образцов. Дифференциально экспрессированные гены анализировали с помощью веб-приложения `CMAP` (Connectivity Map (CMAP)). URL: <https://clue.io/query>). `CMAP` позволяет оценить схожесть воздействия на определенную клеточную линию с имеющимися в базе института Брода воздействиями, к которым относятся в том числе и воздействия лекарственными препаратами. Это позволяет сделать

предположения о том, какие нарушения вызывают в клетке исследуемые вещества (Subramanian, A. et al. 2017).

2.5 МТТ-тест клеток HL-60, обработанных экстрактами из биомассы микроводорослей и цианобактерий

МТТ тест осуществляли с использованием стандартной колориметрической процедуры с рядом изменений (Denizot, F. et al. 1986). После культивирования клетки HL-60 собирали в 15 мл пробирки, 2 раза отмывали в RPMI-1640 - центрифугировали в течение 10 мин при комнатной температуре, 300 g. Клетки ресуспендировали в RPMI-1640, рассчитывали количество клеток. Для синхронизации по клеточному циклу проводили так называемое «голодание» клеток в среде без добавления сыворотки в течение 4-х часов в CO₂ инкубаторе. Далее готовили последовательные разведения экстрактов на круглодонном 96-луночном планшете (3 повтора, 3 планшета). Затем вносили клетки в концентрации 1-2 x10⁴ клеток/лунку. Инкубацию с экстрактами проводили в течение 72 ч, затем центрифугировали (8 мин, 300 g), осадок суспендировали и добавляли по 30 мкл/лунку раствора МТТ (5 мг/мл в PBS). После выпадения кристаллов формазана (24 ч) его растворяли добавлением 100 мкл ДМСО. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре для планшетов Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 540 нм.

Выживаемость клеток рассчитывалась по формуле:

$$\frac{(OD \text{ обработанных клеток} - OD \text{ blank})}{(OD \text{ контрольных клеток} - OD \text{ blank})} \times 100 \%$$
где OD blank - значения OD в лунках без клеток, но с добавлением раствора МТТ и ДМСО. Построение графиков проводилось в программе SigmaPlot (Systat Software Inc., USA).

2.5.1 Гемолитический тест

Для проверки гемолитической активности применяли свежие человеческие эритроциты. При подготовке к тестированию в отобранную кровь добавляли 1/10 часть цитратного буфера, чтобы предотвратить свертывание. Затем цельную кровь центрифугировали в растворе фиколла и урографина с плотностью 1,077 г/мл на протяжении 15 мин при 1500 об/мин. Эритроцитарную фракцию отбирали со дна и трижды

промывали 20-кратным объемом изотонического буфера (PBS), осаждая эритроциты путем последовательного центрифугирования при 2000 об/мин на протяжении 10 мин. После промывки готовили 8 %-ную суспензию эритроцитов в PBS.

Для тестирования в 96-луночном планшете готовили серии двойных разведений исследуемых пептидов в требуемых концентрациях по 50 мкл. Затем к растворам пептидов добавляли по 50 мкл 8 %-ной суспензии эритроцитов. Планшет инкубировали 1,5 часа при температуре 37 °С и интенсивном перемешивании со скоростью 900 об/мин. По окончании инкубации планшеты центрифугировали на протяжении 15 мин при 3000 об/мин, чтобы осадить целые эритроциты. Далее аликвоты супернатанта переносили в другой планшет для измерения содержания свободного гемоглобина.

Оценку концентрации гемоглобина в растворе проводили по поглощению света при 405 нм. В качестве отрицательного контроля (К-) использовали супернатант, полученный после центрифугирования эритроцитов, инкубировавшихся в PBS без добавления пептида. В качестве положительного контроля (К+) использовали супернатант, полученный после центрифугирования эритроцитов, инкубировавшихся в 0,1 %-ном водном растворе неионного детергента Triton X-100, который вызывал полный лизис эритроцитов.

Степень гемолиза рассчитывалась по формуле:

Уровень высвобождения гемоглобина (%) = $(OD_{405} \text{ пробы} - OD_{405} \text{ К}^-) \times 100 \% / OD_{405} \text{ К}^+$

2.5.2. Окрашивание трипановым синим

К растворам пептидов в среде RPMI-1640 без сыворотки добавляли по $2,5 \times 10^5$ клеток HL-60, объем в лунке 96-луночного планшета составлял 100 мкл. Конечные концентрации пептидов составляли от 2,5; 5 или 10 мкМ (в зависимости от экспериментов). Спустя 15 мин, 1 ч или 4 ч инкубации клеток с пептидами, к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,4 %) согласно протоколу производителя. Доля живых клеток была посчитана в автоматическом счетчике клеток. Эксперименты проводились в трехкратной повторности два раза (Marggraf, M. B. et al. 2018).

2.5.3. Двойное окрашивание аннексином V-FITC и иодидом пропидия

Механизмы клеточной гибели изучали, используя метод двойного окрашивания аннексином V-FITC и иодидом пропидия, с последующей цитофлуориметрией. Клетки инкубировали в течение 4 ч или 48 ч с антимикробными пептидами в средах DMEM F12/10% ЭТС или RPMI-1640/10% ЭТС в различных конечных концентрациях (от 2,5 до 100 мкМ в зависимости от эксперимента) или цисплатина (5 мкМ). Образцы клеток подготавливали и окрашивали согласно протоколу для набора Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, США). Цитометрический анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре в соответствии с протоколом производителя. В качестве индуктора апоптоза был использован камптотецин в концентрации 50 мкМ, Z-VAD-FMK был использован как ингибитор каспаз в концентрации 50 мкМ. Эксперименты выполняли в трехкратной повторности в течение двух раз (Marggraf, M. B. et al. 2018).

2.5.4. Тест на высвобождение лактатдегидрогеназы

Тест на высвобождение лактатдегидрогеназы из клеток проводили согласно протоколу производителя. Клетки HL-60 в количестве 4×10^4 добавляли к растворам пептидов в среде RPMI-1640 без сыворотки с конечными концентрациями от 1,5 до 25 мкМ, объем в лунке 96-луночного планшета составлял 100 мкл. После 1 ч инкубации измеряли уровень высвобождения лактатдегидрогеназы. Клетки в среде RPMI-1640 без добавления агентов служили в качестве контроля спонтанного (базового) уровня высвобождения лактатдегидрогеназы (K^-). Детергент 1% Triton X-100 вызывал максимальный лизис клеток. Клетки, обработанные Triton X-100, являлись положительным контролем высвобождения лактатадегидрогеназы (K^+). Измерение оптического поглощения проводили в планшетном спектрофотометре при длине волны 490 нм. Эксперименты выполняли два раза в трехкратной повторности. Процент высвобождения лактатдегидрогеназы рассчитывали по Формуле:

$$\text{Высвобождение ЛДГ, \%} = (\text{OD}_{490} \text{ образца} - \text{OD}_{490} \langle K^- \rangle) \times 100 / (\text{OD}_{490} \langle K^+ \rangle - \text{OD}_{490} \langle K^- \rangle).$$

2.6 Выделение и очистка криптофицина-1 из экстракта биомассы цианобактерий

Клетки цианобактерий собирали центрифугированием жидкой культуры в течение 20 мин при 7000 об/мин на центрифуге Beckman J2-21 и фильтрованием через фильтры 0,47 мкм GF/A и 0,22 GPWP (Millipore). Очищенный супернатант разбавляли бидистиллированной водой 1:1, образец объемом 1 л загружали на картридж массой 5 г с сорбентом Strata C18-E, 55 мкм, 70 Å (Phenomenex) при скорости потока 15 мл/мин с помощью перистальтического насоса (Masterflex L/S variable speed pump Systems, Masterflex). Экстракцию смесью вода-ацетонитрил проводили при скорости потока 15 мл/мин; последовательно собирали 4 фракции по 15 мл, содержащие 10 %, 50 % и дважды 100 % ацетонитрила. Биологическая активность фракций была протестирована на клетках HEK293T и HL-60 с помощью МТТ-теста. Наиболее активную фракцию № 3 далее анализировали методом ВЭЖХ на колонке RP с использованием прибора Nexera X2 LC 30A (Shimadzu), оснащенного детектором SPD-M20A. ВЭЖХ-фракции собирали, проверяли их активность, выделяли фракцию, содержащую чистое активное вещество (пик при времени удерживания 8 мин), и затем анализировали методом ЖХ-МС. Путем повторных ВЭЖХ-выделений было получено около 1 мг вещества для ЯМР-определения структуры соединения и последующих биологических анализов. ЖХ-МС анализ проводили на системе ACQUITY UPLC H-Class System (Waters Corporation, США), оснащенной колонкой ACQUITY UPLC BEH C18 Column (1,7 мкм, 130Å, 50 мм X 2,1 мм), TUV и SQD-ESI детекторами. Образцы элюировали линейным градиентом H₂O-MeCN (от 50 % до 100 % MeCN в течение 5 мин, 450 мкл/мин) с 0,1 % муравьиной кислотой в качестве добавки. УФ-поглощение измеряли при 220 нм, МС-сканирование в диапазонах 50-1050 Да и 1000-2000 Да в положительном ионном режиме.

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

3.1 Отбор перспективных штаммов-продуцентов липидов, полиненасыщенных омега-3 жирных кислот и каротиноидов

Согласно современным концепциям, при поиске высокопродуктивных и ценных с точки зрения биотехнологических производств штаммов микроводорослей особое внимание следует уделять представителям из филогенетических линий с уже известными продуцентами ценных соединений (Galloway, A. W. et al. 2015), (Neofotis, P. et al. 2016). Поэтому на первом этапе был проведен отбор ряда штаммов из ранее созданных коллекций культур водорослей и цианобактерий для целей биотехнологического назначения, представляющих новые виды, а также новые штаммы известных видов различных групп микроводорослей. Всего в работе были изучены 160 штаммов микроводорослей и цианобактерий, полученных из коллекций Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (КМЦ IPPAS ИФР РАН), Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина ([WDCM602: GENUS. URL: https://www.ibiw.ru/index.php?p=project/algo/WDCM602/mgmt_genus&id=1](https://www.ibiw.ru/index.php?p=project/algo/WDCM602/mgmt_genus&id=1)), Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (Коллекция живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA), [URL: https://ib.komisc.ru/sykoa](https://ib.komisc.ru/sykoa)) и личных коллекций Е.С. Гусева, Е.И. Мальцева и М.С. Куликовского. Кроме того, были изучены природные образцы, отобранные в России, Вьетнаме, Индонезии и Монголии, а также переданные для совместного изучения коллекционные штаммы из Университета Геттингена (Германия) (SAG catalogue of strains. [URL: https://sagdb.uni-goettingen.de/index.php](https://sagdb.uni-goettingen.de/index.php)).

Изучаемые штаммы охватывали 14 классов микроводорослей и цианобактерий (Таблица 17).

Таблица 17 - Распределение изучаемых микроводорослей по классам.

Эукариотические микроводоросли	Число штаммов
Vacillariophyceae	60

Zygnematophyceae	14
Eustigmatophyceae	12
Chlorophyceae	11
Chrysophyceae	10
Trebouxiophyceae	9
Xanthophyceae	5
Cryptophyceae	4
Euglenophyceae	2
Rhodophyceae	2
Нартophyceae	2
Palmophyllophyceae	1
Pavlovophyceae	1
Прокариотические микроводоросли	Число штаммов
Суанопрокaryota	27

3.2 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов липидов

На первом этапе были исследованы микроводоросли, способные в большом количестве синтезировать липиды, которые традиционно считаются ценным природным сырьем для биотоплива третьего поколения, используются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве (Shaikh, K. M. et al. 2019), (Levasseur, W. et al. 2020).

По итогам анализа информации, представленной в научных публикациях, были отобраны представители класса Chlorophyceae, в частности на рода *Bracteacoccus*. Липидный метаболизм этой группы мало изучен, но в тоже время были опубликованы данные, согласно которым представители этого рода способны накапливать до 63 % липидов от сухого веса (Ratha, S. K. et al. 2012), (Minyuk, G. S. et al. 2015).

Изучаемый штамм одноклеточной коккоидной почвенной зеленой микроводоросли *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 был выделен в степной зоне Днепропетровской области Украины (Рисунок 22).

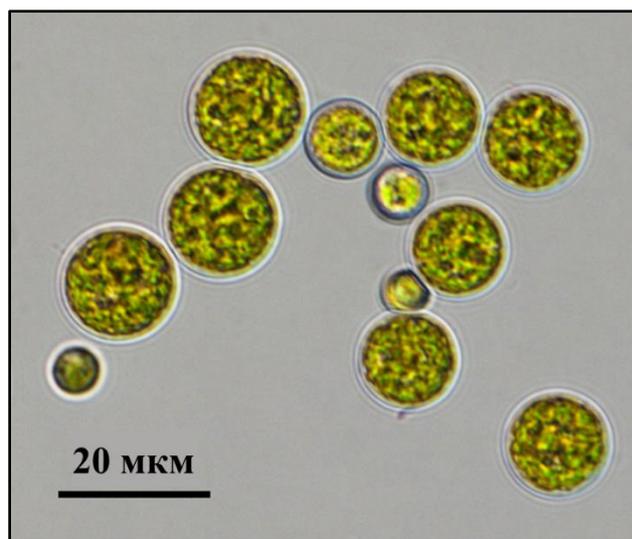


Рисунок 22 - Микрофотография *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 (Mamaeva, A. et al. 2018).

Вегетативные клетки сферические, реже яйцевидные, диаметр 7,0 - 22,7 мкм. Клеточная стенка тонкая или иногда слегка утолщенная после 6-месячного возраста (до 1,5 мкм). Бесполое размножение осуществляется апланоспорами, тогда как половое размножение не наблюдается. Согласно современной концепции таксономии зеленых водорослей, *B. bullatus* MZ-Ch11 относится к семейству Bracteacoccosaceae, порядок Sphaeropleales (Fucikova, K. et al. 2012). Филогенетический анализ (БВ и МП методы анализа) фрагмента гена 18S рРНК-ITS1-5.8S рРНК-ITS2 показал, что штамм *B. bullatus* MZ-Ch11 объединяется в одну кладу со штаммом *B. bullatus* SAG 2032 (Рисунок 23) с высокими величинами статистических поддержек (МП анализ 99; БВ анализ 100).

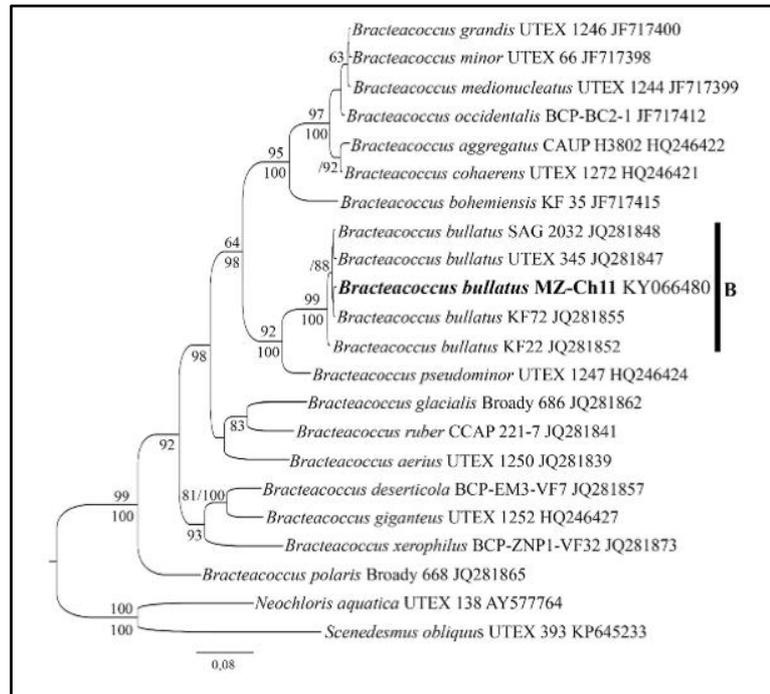


Рисунок 23 - Фрагмент байесовского дерева для штаммов *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей генов 18S рРНК-ITS1-5.8S рРНК-ITS2 438 п.н. для 21 штамма зеленых водорослей. Штамм *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 выделен жирным шрифтом. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями - значения Байесовских апостериорных вероятностей (<80 не указаны) (Мамаева, А. et al. 2018).

Изучение предсказанной вторичной структуры ITS2, идентификация компенсаторных и полукompенсаторных нуклеотидных оснований (СВС и hСВС) используются в таксономии зеленых водорослей для их различений на уровне видов (Coleman, A. B. 2003). Типичная вторичная структура ITS2 представителей рода *Bracteacoccus* имеет четыре шпильки и раздвоенную шпильку I (Рисунок 24) (Keller, P. J. et al. 2008), (Fučíková, K. et al. 2012).

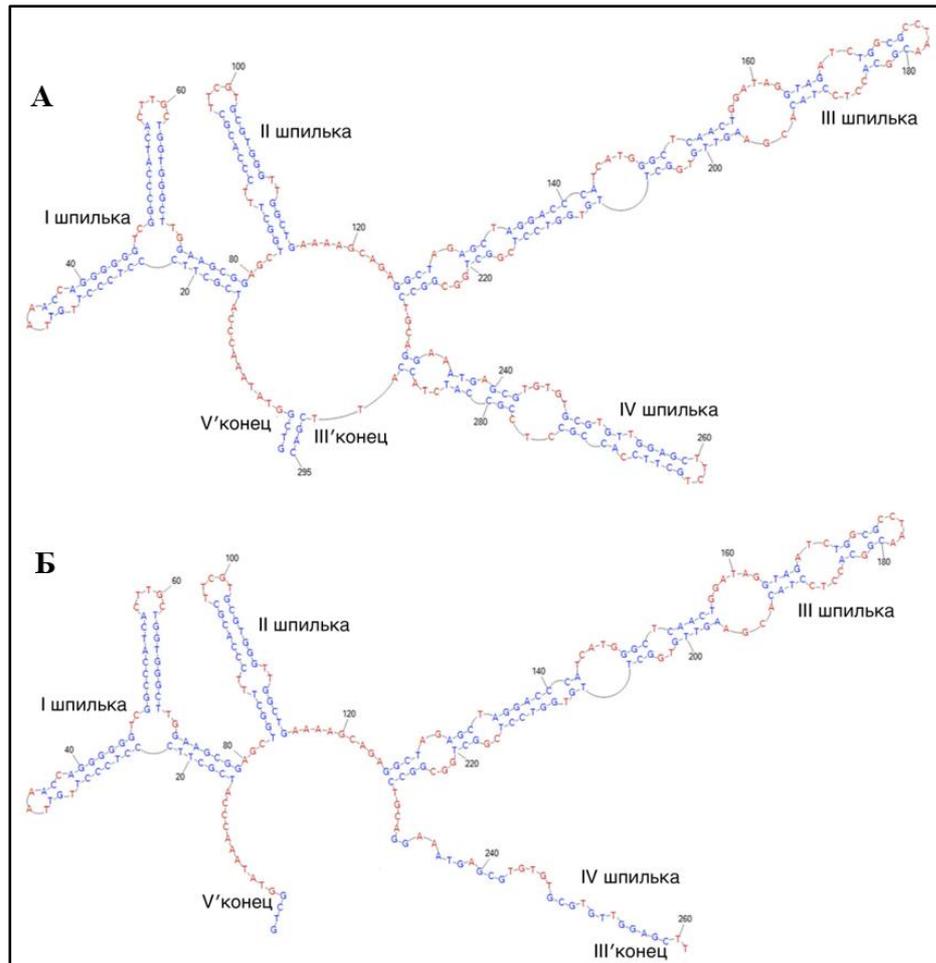


Рисунок 24 - А - Сравнение вторичной структуры BTC2 *Bracteacoccus bullatus* SAG2032, Б - *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11. Цифрами I-IV пронумерованы отдельные нуклеотидные шпильки (Мамаева, А. et al. 2018).

Анализ вторичной структуры ITS2 штамма MZ-Ch11 и штамма *B. bullatus* SAG 2032 не выявил СВС в наиболее консервативных областях спиралей I, II и III (Рисунок 24). Эти результаты подтверждают принадлежность штамма MZ-Ch11 к виду *B. bullatus*.

3.3 Оптимизация продуктивности штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

Для оценки изменений накопления биомассы, содержания липидов, триглицеридов и состава жирных кислот была проведена серия экспериментов по культивированию *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 в условиях отсутствия фосфатов и/или нитратов в среде WC.

Максимальный выход сухой биомассы MZ-Ch11 (2,4 г/л) был достигнут на среде WC*10 при концентрации нитратов 10 мМ и фосфатов 0,5 мМ, спустя 14 дней культивирования.

Более низкое содержание биомассы (2,1 г/л) отмечено в среде WC*1 с пониженными концентрациями нитрата и фосфата (1,0 и 0,05 мМ, соответственно).

В среде с низким содержанием азота (-N), сухой вес составил 1,9 г/л. Высушенная биомасса исследованного штамма MZ-Ch11 при одновременной депривации нитратов и фосфатов составила 1,7 г/л, что на 29 % ниже значений, наблюдаемых во время культивирования на стандартной среде WC*10 (Таблица 18).

Таблица 18 - Результаты культивирования *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 в различных условиях. В средах WC*10 и WC*1, в условиях нитратного голодания (-N), в условиях фосфатного голодания (-P), а также в условиях депривации азота и фосфора (-N-P); Данные представлены как среднее трех независимых биологических повторов. Разброс соответствует стандартной ошибке среднего значения (SEM) (Мамаева, А. et al. 2018).

	WC*10	WC*1	-N	-P	-N -P
Биомасса/сухой вес (г/л)	2,4 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Общие липиды (% от сухого веса)	17 ± 5	59 ± 9	56 ± 8	30 ± 6	49 ± 4
Общие липиды (г/л)	0,41 ± 0,09	1,21 ± 0,19	1,06 ± 0,11	0,68 ± 0,20	0,82 ± 0,12
Жирные кислоты (% от сухого веса)	13,3 ± 1,0	59,0 ± 5,2	62,8 ± 4,9	33,8 ± 2,4	59,7 ± 7,2
ТАГ (% от сухого веса)	1,45 ± 0,18	8,38 ± 0,65	10,10 ± 0,22	10,96 ± 0,25	8,73 ± 0,29
ТАГ (мг/л)	35 ± 3	176 ± 17	192 ± 10	252 ± 22	148 ± 17
ДАГ (% от сухого веса)	5,43 ± 0,53	3,45 ± 0,10	2,76 ± 0,09	3,70 ± 0,29	3,12 ± 0,37
Клетки (млн. шт.)	21,4 ± 0,9	21,2 ± 1,1	11,0 ± 0,6	18,7 ± 0,7	16,6 ± 0,8
НК-положительные клетки (% от числа всех клеток)	14 ± 1	31 ± 4	66 ± 6	61 ± 1	58 ± 7

Как и ожидалось, нитратное и фосфатное голодание (WC*1) стимулировало накопление липидов по сравнению с контрольными условиями. Общее содержание липидов достигало 49 % - 59 % сухой биомассы спустя 14 дней культивирования в условиях снижения концентрации азота (Рисунок 25А, Таблица 18). Общее содержание липидов было самым низким в условиях с высокой концентрацией азота (WC*10), составив 17 % от сухого веса (Рисунок 25Б, Таблица 18). В условиях депривации фосфатов наблюдалось повышенное содержание общих липидов, составляющее 30 % сухого веса. Были

обнаружены статистически значимые ($P < 0,05$) различия в содержании общих липидов в среде с пониженным ($WC*1$, -N, -N-P) и повышенным содержанием азота ($WC*10$ и -P). По сравнению со средой $WC*10$ увеличение накопления общих липидов в клетках, растущих в среде с пониженным содержанием фосфора (-P), было статистически незначимым ($P = 0,45$) (Рисунок 25Б, В).

Для оценки внутриклеточного содержания нейтральных липидов проводили окрашивание нильским красным с последующей проточной цитометрией (Рисунок 25Е, Таблица 18). Результаты, полученные при окрашивании нильским красным, хорошо коррелируют с гравиметрическим методом и другими методами анализа содержания липидов (Chen, W. et al. 2009).

В образцах штаммов, культивируемых в среде $WC*1$ с недостатком питательных веществ, количество клеток, окрашенных нильским красным, составило 58 % - 66 %. В тоже время в условиях с избытком питательных веществ $WC*10$ аналогичная величина была равна всего 14 %.

Кроме того, клетки, выращенные в среде $WC*10$, демонстрировали самое низкое содержание ТАГ и относительно высокое ДАГ - 1,4 % и 5,4 % сухого веса, соответственно (Рисунок 25Г, Д, Таблица 18).

Ожидаемо, в клетках, выращенных при пониженных концентрациях питательных веществ ($WC*1$, -N, -P и -N-P), наблюдалось увеличение ТАГ (8,3 % - 10,9 %) за счет снижения количества ДАГ (2,7 % - 3,7 %) (Таблица 18). Моноацилглицеролы в исследованных образцах обнаружены не были. Относительно низкая корреляция содержания ТАГ и общих липидов может быть результатом недостаточной эффективности применяемой методики экстракции ТАГ из биомассы.

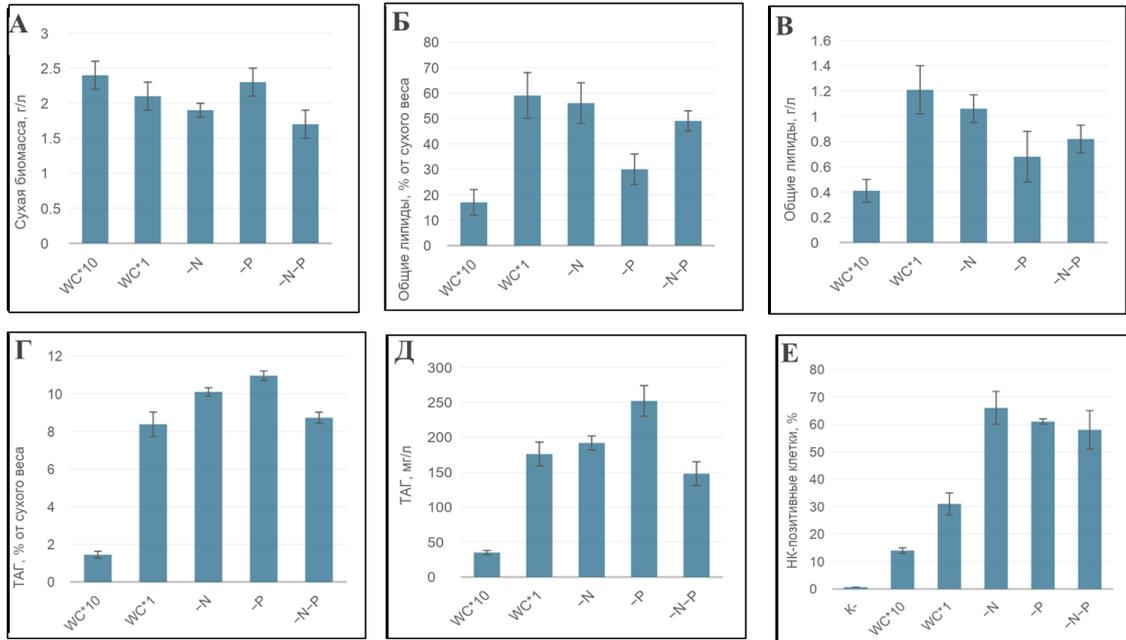


Рисунок 25 - Результаты культивирования *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 в различных условиях. В среде WC*10 и WC*1; в условиях нитратного голодания (-N), в условиях фосфатного голодания (-P), а также в условиях депривации азота и фосфора (-N-P). Данные представлены как среднее трех независимых биологических повторов. Разброс соответствует стандартной ошибке среднего значения (SEM) (Mamaeva, A. et al. 2018). А - Сухая биомасса, г/л, Б - Общее содержание липидов, % от сухого веса, В - Общее содержание липидов, г/л, Г - Содержание ТАГ, % от сухого веса, Д - Содержание ТАГ, мг/л, Е - Количество клеток, окрашиваемых нильским красным, %.

3.4 Изучение жирнокислотного профиля штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

Преобладающими жирными кислотами штамма MZ-Ch11 в различных условиях культивирования были олеиновая (48 % - 64 %), линолевая (14 % - 24 %) и пальмитиновая (9 % - 13 %) (Таблица 19). В нормальных условиях роста в среде WC*10 в биомассе наблюдалось наибольшее содержание олеиновой кислоты (48 %), за ней следовали линолевая кислота (24 %) и пальмитиновая кислота (13 %). При культивировании MZ-Ch11 в среде с десятикратным снижением концентрации азота и фосфора, содержание олеиновой кислоты увеличивалось до 64 %. Кроме того, депривация азота и фосфора привела к снижению содержания других жирных кислот (C16:0, 16:2 и 18:2).

Таблица 19 - Жирнокислотный профиль *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 при различных условиях культивирования (Мамаева, А. et al. 2018).

МЭЖК	Содержание МЭЖК (% от всех жирных кислот)				
	WC*10	WC*1	-N	-P	-N-P
C16:4	НД	1,32 ^{+0,10} _{-0,09}	1,31 ^{+0,08} _{-0,08}	2,44 ^{+0,13} _{-0,12}	1,51 ^{+0,19} _{-0,17}
C16:2	10,08 ^{+1,5} _{-1,4}	5,10 ^{+0,27} _{-0,25}	4,42 ^{+0,32} _{-0,30}	8,24 ^{+0,77} _{-0,72}	5,38 ^{+0,40} _{-0,36}
C16:1 ω9	4,51 ^{+0,51} _{-0,46}	4,69 ^{+0,30} _{-0,28}	4,82 ^{+0,40} _{-0,37}	8,24 ^{+0,41} _{-0,38}	5,33 ^{+0,66} _{-0,59}
C16:0	13,15 ^{+0,94} _{-0,86}	9,40 ^{+0,61} _{-0,57}	10,22 ^{+0,58} _{-0,54}	10,15 ^{+0,67} _{-0,63}	11,0 ^{+1,5} _{-1,3}
C18:3	НД	НД	0,21 ^{+0,05} _{-0,05}	НД	0,27 ^{+0,06} _{-0,06}
C18:4	НД	НД	0,17 ^{+0,05} _{-0,04}	НД	0,15 ^{+0,05} _{-0,05}
C18:2	23,7 ^{+2,4} _{-2,2}	13,9 ^{+1,6} _{-1,5}	15,41 ^{+0,97} _{-0,90}	17,3 ^{+2,0} _{-1,9}	15,6 ^{+1,3} _{-1,1}
C18:1 ω9	47,8 ^{+4,2} _{-3,9}	63,8 ^{+4,3} _{-4,0}	62,0 ^{+4,5} _{-4,2}	55,3 ^{+3,2} _{-3,0}	59,2 ^{+7,4} _{-6,6}
C18:0	НД	1,43 ^{+0,07} _{-0,07}	1,20 ^{+0,11} _{-0,10}	0,68 ^{+0,07} _{-0,07}	1,26 ^{+0,14} _{-0,12}
C20:1	НД	0,31 ^{+0,07} _{-0,06}	0,24 ^{+0,05} _{-0,05}	0,24 ^{+0,04} _{-0,04}	0,34 ^{+0,05} _{-0,05}

*НД - не детектируется.

Необходимо отметить, что содержание жирных кислот коррелировало с общим содержанием липидов.

С биотехнологической точки зрения, идеальный штамм должен обеспечивать быстрый рост, выражающийся в скорости накопления биомассы и высокую продуктивность целевого метаболита. Однако, в случае продуцентов липидов необходимо экспериментальным путём искать баланс: в стрессовых условиях происходит максимальное накопление липидов, но существенно снижается скорость роста микроводорослей. В среднем для зеленых водорослей показано почти двукратное увеличение содержания липидов при переходе к стрессовым условиям культивирования - с 25,5 % до 45,7 % сухого веса (Hu, Q. et al. 2008). В экспериментах было показано, что критичным для накопления биомассы является именно концентрация азота. Так, статистически достоверно показано, что минимальная скорость роста биомассы была в экспериментах со средой с депривацией нитратов (WC*1 - N). Снижение концентрации азота в 10 раз (среда WC*1) или равно как и полное отсутствие фосфатов (WC*1 -P) практически не влияло на скорость роста биомассы.

Зависимость накопления липидов от концентрации нитратов носила обратный характер: снижение концентрации азота вплоть до полной депривации приводило к повышению накопления липидов (Таблица 19).

В отличие от общих липидов, содержание ТАГ в значительной степени зависело как от содержания нитратов, так и фосфатов в культуральной среде. В контрольной среде

WC*10 содержание ТАГ было минимальным и составляло 1,45 %, в то время как в среде без азота и/или фосфора было в 10 раз больше.

Полученные данные подтверждались в экспериментах с нильским красным: количество окрашиваемых клеток при различных типах голодания увеличивалось с 14 % до 61 %.

Ранее было показано, что снижение питательных веществ в культуральной среде зачастую приводило к увеличению накопления ТАГ. В результате депривации азота, содержание ТАГ в биомассе ряда штаммов, таких как *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans* и *Scenedesmus obliquus*, может увеличиться с 5 % до 40 % (Breuer, G. et al. 2012). В тоже время нехватка фосфора может приводить к увеличению накопления ТАГ у *Monodus subterraneus* с 6,5 % до 39,3 % (Khozin-Goldberg, I. et al. 2006).

Фосфорное голодание снижает содержание общих липидов и жирных кислот при одновременном увеличении ТАГ. Это может быть связано со снижением накопления фосфолипидов в условиях недостатка фосфатов.

В работе (Maltsev, Y., et al., 2018) для штамма *Parietochloris grandis* sp. nov. были получены сходные результаты: депривация нитратов и фосфатов в культуральной среде приводила к трехкратному увеличению содержания жирных кислот в биомассе (с 150 мг/г до 443 мг/г сухой биомассы). При этом, однако, наблюдалось снижение выхода сухой биомассы с 2,2 г/л до 1,6 г/л, поэтому для максимизации объемной продуктивности по жирным кислотам целесообразно осуществлять азотную и фосфорную депривацию по окончании фазы экспоненциального роста.

3.5 Определение биотехнологического потенциала штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

Полученные результаты накопления липидов в культуре *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 превышают известные значения для большинства промышленных штаммов. При этом у зеленых микроводорослей-продуцентов, как правило, среднее содержание липидов в условиях стресса может увеличиваться лишь до 45,7 % (Wang, C. et al. 2017).

Показано, что в стрессовых условиях *Desmodesmus* sp. WC08 накапливает 31,3 % липидов от сухого веса биомассы (Zhang, S. et al. 2014), *Scenedesmus obliquus* SAG 276-3 - 43 % от сухого веса биомассы (Mandal, S. et al. 2009), а максимально накопление липидов показано для *Nannochloropsis oceanica* - 64,3 % (Wan, C. et al. 2013).

Одним из наиболее важных критериев в промышленной биотехнологии является волюметрическая продуктивность штамма - число грамм целевого метаболита на один литр культуральной среды. Показано, что для штамма MZ-Ch11 в условиях азотного или фосфорного дефицитов объемная концентрация ТАГ составила 190,8 мг/л и 250,9 мг/л, соответственно.

Для определения потенциала использования штамма MZ-Ch11 в промышленных условиях, было проведено измерение волюметрической продуктивности в условиях культивирования в среде WC*1 в панельном фотобиореакторе закрытого типа полезной емкостью 260 л.

Измеренная объемная продуктивность липидов для штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 составила 80 мг/л/день, что является одним из самых больших значений, зафиксированных при полупромышленном культивировании. В работе (Griffiths, M. J. et al. 2009) на примере 55 видов микроводорослей из различных в лабораторных масштабах в среде с нормальным содержанием азота и фосфора, была показана волюметрическая продуктивность от 17 до 160 мг/л/день.

Несмотря на это, максимальное значение волюметрического выхода липидов при периодическом культивировании штамма *N. Gaditana* в 100 л колончатом фотобиореакторе было значительно меньше и составило 7,2 - 17,8 мг/л/день (Nogueira, N. et al. 2020). А при выращивании в трубчатом фотобиореакторе объемом 340 л было достигнута волюметрическая продуктивность только 50-60 мг/л/день (San Pedro, A. et al. 2014).

Выводы по разделу

Высокая объемная продуктивность и сбалансированный состав жирных кислот, наряду с относительно высокой скоростью накопления биомассы, позволяет предположить, что *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 может быть интересен с точки зрения производства биодизельного топлива.

В настоящее время биотопливу уделяется большое внимание в связи с его потенциалом в качестве устойчивой и экологически чистой альтернативы ископаемому топливу. Обычно его получают путем трансэтерификации растительного масла, выделенного в основном из семян рапса, сои, подсолнечника или пальмы. Микроводоросли являются перспективным альтернативным источником растительного масла. Было рассчитано, что продуктивность микроводорослей в пересчете на единицу площади в 20 раз выше, чем у лучших масличных культур. Кроме того, микроводоросли можно выращивать

в засушливых регионах и в морской воде, что снижает конкуренцию с продовольственными культурами за сельскохозяйственные угодья и пресную воду. Несмотря на отсутствие технических ограничений, производство биодизельного топлива из микроводорослей (биотопливо третьего поколения) на сегодняшний день экономически неоправданно. Основным препятствием является относительно низкая продуктивность микроводорослей в сравнении с капитальными и операционными затратами. Поиск быстрорастущих штаммов, продуктивных в конкретных климатических условиях, имеет критическое значение для промышленного применения микроводорослей, особенно когда речь идет об относительно низкомаржинальных продуктах, таких как биодизельное топливо.

3.6 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов фукоксантина

На следующем этапе проводили поиск более маргинальных продуктов, которые, согласно литературным данным, могут быть получены из микроводорослей. Фукоксантин является одним из самых распространенных каротиноидов в природе (Matsuno, T. 2001). Это основной пигмент гетероконтных и гаптофитовых водорослей, насчитывающих более 20 тысяч видов (Andersen, R. A. 2004). Фукоксантин обладает многими полезными свойствами, включая противораковые, антигипертензивные, противовоспалительные эффекты, а также способностью снижать риск возникновения ожирения (Martin, L. J. 2015). Водоросли являются основным источником фукоксантина для коммерческого производства. При этом основным источником получения фукоксантина в промышленных масштабах являются макроводоросли, такие как *Laminaria japonica*, *Eisenia bicyclis*, *Undaria pinnatifida* и *Hijikia fusiformis*.

Чтобы найти наиболее эффективные штаммы микроводорослей, продуцирующие фукоксантин, проводили изучение параметров роста и содержания пигмента как у депонированных ранее штаммов, так и у семи новых штаммов диатомовых и золотистых микроводорослей, выделенных из разных локаций России и Вьетнама.

К числу последних относились *Cyclotella meneghiniana* SBV23, SBV11; *Cyclotella* cf. *cryptica* SBV12, *Nitzschia* sp. SBV25, *Nitzschia* sp. SBV26; *Mallomonas furtiva* SBV13, *Paralia longispina* SBV19.

Культуры выращивались в течение двух недель в среде WC*10 в термостатируемом лабораторном инкубаторном шейкере при температуре 24 °C, постоянном перемешивании 150 об/мин и 5 % объемной доле CO₂ в подаваемом воздухе. Освещение интенсивностью 160 мкмоль фотонов/м²/с осуществлялось с фотопериодом 16 ч свет : 8 ч темнота.

Микроскопия и определение оптической плотности культур при длине волны 680 нм выполнялось ежедневно. Каждый два дня производили забор образца биомассы, которую последовательно собирали центрифугированием с последующей лиофилизацией и взвешиванием. Дополнительно в культуральной среде измеряли содержания нитратов и фосфатов (Рисунок 26).

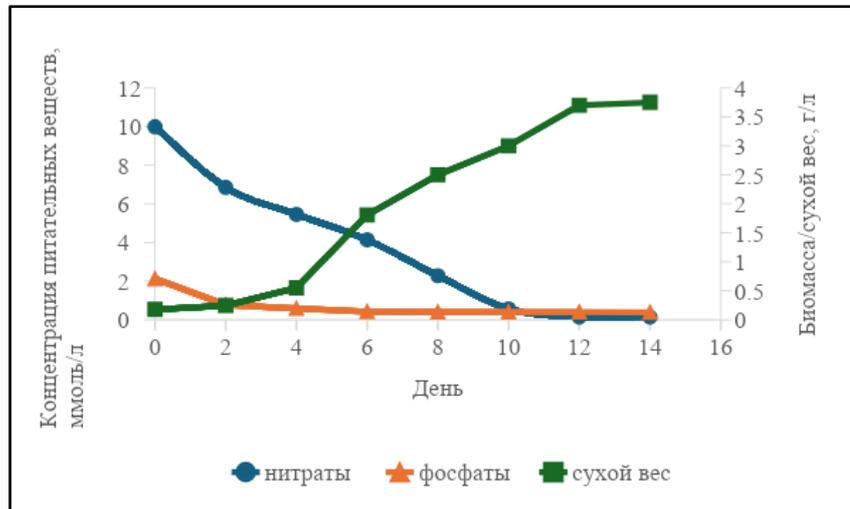


Рисунок 26 - Кривые роста и поглощения нитратов/фосфатов *Mallomonas furtiva* SBV13 (Sorokin, B. et al. 2024).

Спустя 14 дней роста в лиофилизате образца биомассы проводили количественное определение содержания фукоксантина. Для этого соответствующие экстракты анализировали методом ВЭЖХ с использованием градуировочных растворов фукоксантина.

В качестве положительного контроля использовался штамм диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* UTEX L642, имеющий широкое применение в биотехнологии в качестве продуцента фукоксантина.

Результаты, приведенные в Таблице 20, свидетельствуют о том, что в обнаруженном штамме *Mallomonas furtiva* SBV13 содержание фукоксантина было значительно больше чем в других изучаемых образцах микроводорослей и составило 26,6 мг/г сухого веса. Кроме того, было показано, что скорость накопления биомассы в 1,5 раза быстрее по сравнению с промышленным продуцентом фукоксантина *Phaeodactylum tricornutum* UTEX L642.

Таблица 20 - Скорость роста и содержание фукоксантина у исследуемых штаммов (Petrushkina, M. et al 2017).

Штамм	Биомасса/сухой вес г/л	Содержание фукоксантина, мг/г сухого веса
<i>Mallomonas furtiva</i> SBV13	3,75 ± 0,15	26,6 ± 0,5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX L642	2,4 ± 0,65	10,2 ± 0,6
<i>Nitzschia</i> cf. <i>carinospeciosa</i> SBV25	0,37 ± 0,06	5,5 ± 0,2
<i>Nitzschia</i> cf. <i>carinospeciosa</i> SBV26	0,33 ± 0,02	4,0 ± 0,1
<i>Cyclotella meneghiniana</i> SBV11	0,07 ± 0,01	2,0 ± 0,01
<i>Cyclotella meneghiniana</i> SBV23	0,08 ± 0,015	2,3 ± 0,03
<i>Cyclotella</i> cf. <i>cryptica</i> SBV12	0,16 ± 0,03	0,7 ± 0,2
<i>Paralia longispina</i> SBV-19	0,07 ± 0,009	1,4 ± 0,1

Проведенный молекулярно-генетический анализ *Mallomonas furtiva* SBV13 позволяет утверждать, что выделенный новый штамм относится к отделу Heterokontophyta, классу Chrysophyceae, порядку Synurales, семейству Mallomonadaceae рода *Mallomonas furtiva* SBV13 (Рисунок 27).

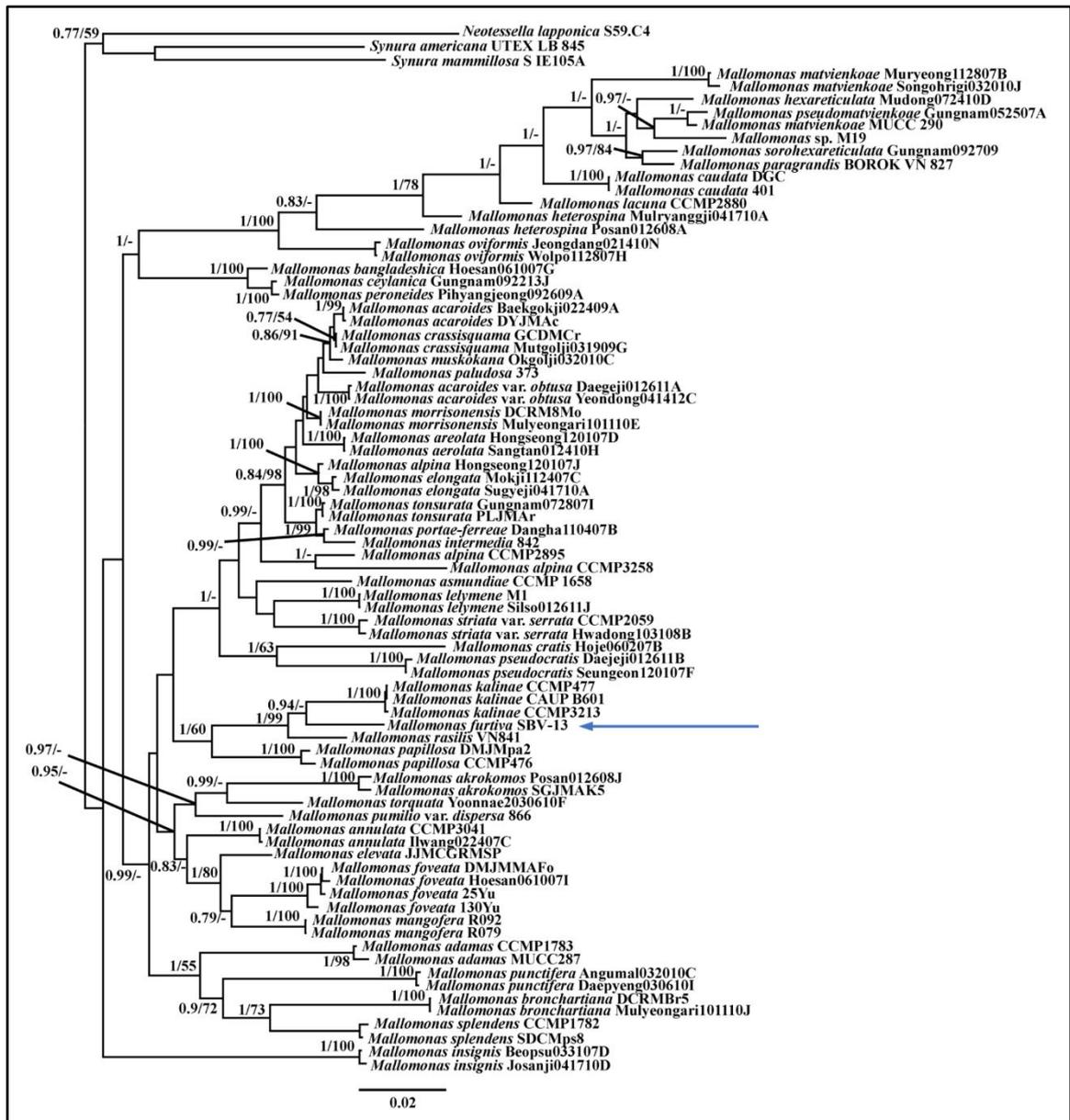


Рисунок 27 - Байесовское древо штаммов рода *Mallomonas furtiva* SBV13 на основе комбинированного анализа генов 18S рДНК и *rbcL* хлоропластной ДНК. Значения байесовских апостериорных вероятностей и бутстрепа максимального правдоподобия приведены слева и справа от разделительных линий, соответственно. Масштабная линейка отражает число замен на 1 сайт. Два штамма рода *Synura* и штамм *Neotessella lapponica* использованы в качестве аутгруппы (Petrushkina, M. et al 2017).

Клетки *Mallomonas furtiva* SBV13 имеют удлиненно-эллипсоидную форму, размером 18-25×8-15 мкм, покрыты овальными кремнеземными чешуйками размером 3,6-4,3×2,2-2,5 мкм. Хлоропласт одиночный, двухлопастной. Клетки с двумя жгутиками, коротким и длинным (виден только длинный). При длительном хранении без пересева клетки становятся неподвижными и образуют скопления в слизи (Рисунок 28).

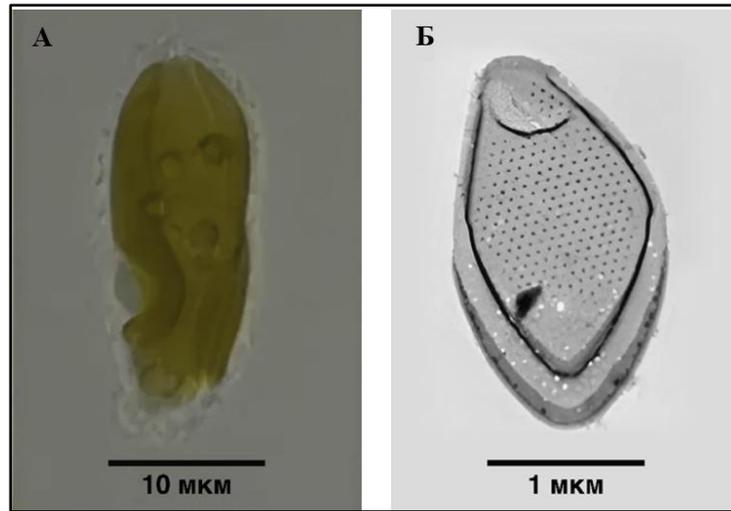


Рисунок 28 - А - Микрофотография вегетативной клетки *Mallomonas furtiva* SBV13 и Б - его кремнеземных чешуек (Petrushkina, M. et al 2017).

В Таблице 21 приведены данные о концентрациях фукоксантина у представителей основных таксономических групп.

Таблица 21 - Содержание фукоксантина в биомассе микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании.

Штамм	Среда обитания	Содержание фукоксантина, мг/г сухого веса	Ссылка на литературный источник
<i>Mallomonas furtiva</i> SBV13	пресноводный	26,6	Данная работа
<i>Odontella aurita</i> SCCAP K-1251	морской	21,7	Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., Zhang, C. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom <i>Odontella aurita</i> // Marine Drugs. - 2013. - Vol. 11(7). - P. 2667-2681.
<i>Isochrysis aff. galbana</i> CCMP1324	морской	18,2	Kim, S. M., Kang, S. W., Kwon, O. N. et al. Fucoxanthin as a major carotenoid in <i>Isochrysis aff. galbana</i> : Characterization of extraction for commercial application // Journal of Applied Biological Chemistry. - 2012. - Vol. 55. - P. 477-483.
<i>Isochrysis sp.</i>	морской	17	Crupi, P., Toci, A. T., Mangini, S., Wrubl, F., Rodolfi, L., Tredici, M. R., Coletta, A., Antonacci, D. Determination of fucoxanthin isomers in microalgae (<i>Isochrysis sp.</i>) 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.
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	морской	15,71	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

KMMCC (B-007)			the microalga <i>Phaeodactylum tricornutum</i> // Applied Biochemistry and Biotechnology. - 2012. - Vol. 166(7). - P. 1843-1855.
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 646	морской	10,3	Eilers, U., Bikoulis, A., Breitenbach, J. et al. Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> // Journal of Applied Phycology. - 2016. - Vol. 28. - P. 123-129.
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> KMMCC-14	морской	8,55	Kim, S. M., Kang, S. W., Kwon, O. N. et al. Fucoxanthin as a major carotenoid in <i>Isochrysis aff. galbana</i> : Characterization of extraction for commercial application // Journal of Applied Biological Chemistry. - 2012. - Vol. 55. - P. 477-483.
<i>Prymnesium parvum</i>	пресноводный	7,91	Allen, M. B., Goodwin, T. W., Phagpolngarm, S., Carotenoid distribution in certain naturally occurring algae and in some artificially induced mutants of <i>Chlorella pyrenoidosa</i> // The Journal of General Microbiology. - 1960. - Vol. 23. - P. 93-103.
<i>Sellaphora minima</i>	пресноводный	7,2	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.
<i>Isochrysis galbana</i> KMMCC-12	морской	6,04	Kim, S. M., Kang, S. W., Kwon, O. N. et al. Fucoxanthin as a major carotenoid in <i>Isochrysis aff. galbana</i> : Characterization of extraction for commercial application // Journal of Applied Biological Chemistry. - 2012. - Vol. 55. - P. 477-483.
<i>Cylindrotheca closterium</i>	морской	5,34	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.
<i>Nitzschia palea</i>	пресноводный	5,3	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.
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	морской	5,25	Foo, S. C., Yusoff, F., Ismail, M., Basri, M., Chan, K.W., Khong, N., Yau, S. (2015). Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, <i>Chaetoceros calcitrans</i> (Paulsen) Takano 1968 // Algal Research. - 2015. - Vol. 12. - P. 26-32.
<i>Nitzschia sp.</i> KMMCC-308	морской	4,92	Kim, S. M., Kang, S. W., Kwon, O. N. et al. Fucoxanthin as a major carotenoid in <i>Isochrysis aff. galbana</i> : Characterization of extraction for commercial application // Journal of Applied Biological Chemistry. - 2012. - Vol. 55. - P. 477-483.
<i>Ochromonas danica</i>	пресноводный	3,16	Allen, M. B., Goodwin, T. W., Phagpolngarm, S., Carotenoid distribution in certain naturally occurring algae and in some artificially induced mutants of <i>Chlorella pyrenoidosa</i> // The Journal of General Microbiology. - 1960. - Vol. 23. - P. 93-103.

<i>Chaetoceros gracilis</i> KMMCC-27	морской	2,24	Kim, S. M., Kang, S. W., Kwon, O. N. et al. Fucoxanthin as a major carotenoid in <i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i> : Characterization of extraction for commercial application // Journal of Applied Biological Chemistry. - 2012. - Vol. 55. - P. 477-483.
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> UTEX 640	морской	1,81	Reboloso-Fuentes, M. M., Navarro-Pérez, A., García-Camacho, F., Ramos-Miras, J. J., Guil-Guerrero, J. L. Biomass nutrient profiles of the microalga <i>Nannochloropsis</i> // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2001. - Vol. 49(6). - P. 2966-2972.
<i>Chromulina ochromonoides</i>	пресноводный	1,32	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.
<i>Mougeotia</i> sp.	пресноводный	0,9	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.
<i>Selenastrum bibrainum</i>	пресноводный	0,4	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.
<i>Desmodesmus denticulatus</i> var. <i>linearis</i>	пресноводный	0,07	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.

Содержание фукоксантина у *Mallomonas furtiva* SBV13 является самым высоким среди всех изученных штаммов микроводорослей. Ранее максимальное содержание данного пигмента было показано для диатомовой микроводоросли *Odontella aurita* SCCAP K-125 (21,67 мг/г сухого веса) и гаптофитовой микроводоросли *Isochrysis* aff. *Galbana* CCMP1324 (18,2 мг/г сухого веса) (Таблица 21). Содержание фукоксантина в сухой биомассе *Phaeodactylum tricornerutum* UTEX L642 было значительно ниже (10,2 мг/г), чем в *Mallomonas furtiva* SBV13. Также содержание фукоксантина в биомассе *Phaeodactylum tricornerutum* UTEX L642 ниже, чем у другого штамма того же вида из коллекции КММСС *Phaeodactylum tricornerutum* В-007 (15,7 мг/г), но сопоставимо с данными для штаммов *Phaeodactylum tricornerutum* UTEX 646 (10,3 мг/г) и КММСС-14 (8,55 мг/г).

Из Таблицы 21 следует, что наибольшее содержание фукоксантина демонстрируют три группы микроводорослей: диатомовые (до 21,67 мг/г), золотистые (до 26,6 мг/г) и примнезиевые (до 18,23 мг/г). Способность накапливать фукоксантин у представителей других групп микроводорослей (Chrysophyceae, Pelagophyceae, Phaeophyceae, Raphidophyceae) значительно ниже (0,02-9,01 мг/г). Следует отметить, что концентрация фукоксантина может существенно варьировать в культурах, относящихся даже к одной

таксономической группе, что и было продемонстрировано для группы диатомовых водорослей. Дополнительные исследования микроводорослей, относящихся к группе гетероконтных водорослей, могут выявить новые штаммы с высоким содержанием фукоксантина.

В отличие от *Phaeodactylum tricornutum*, *Mallomonas furtiva* SBV13 является пресноводным штаммом. Выращивание пресноводных штаммов, как правило, требует меньших затрат на поддержание инфраструктуры: пресноводные системы могут быть проще в эксплуатации и менее подвержены коррозии.

Для определения потенциала использования штамма *Mallomonas furtiva* SBV13 в промышленных условиях проводили определение волюметрической продуктивности в условиях двухнедельного культивирования в среде WC*10 в панельном фотобиореакторе закрытого типа полезной емкостью 260 л. Показано, что при интенсивности освещения 120 мкмоль фотонов/м²/с, температуре 28 °С, нейтральных рН, в среде WC с десятикратным содержанием нитратов и фосфатов (0,85 г/л NaNO₃ и 0,114 г/л K₂HPO₄*3H₂O) - волюметрический выход фукоксантина составил 3,7 мг/л/день. При этом скорость роста *Mallomonas furtiva* SBV13 составила 2,07 г/л. Было проведено сравнение соответствующих биотехнологических параметров с результатами, которые ранее были получены другими научными группами. Так Hugo Pereira (Pereira, H. et al. 2021) в условиях культивирования в 15 м³ в трубчатом фотобиореакторе при сопоставимой скорости роста биомассы, была достигнута объемная продуктивность всего 1,05 мг/л/день для *Phaeodactylum tricornutum* и 0,54 мг/л/день для *Tisochrysis lutea*.

Необходимо отметить, что в условиях полупромышленного микотрофного двухстадийного культивирования, когда на первом этапе создаются максимально благоприятные условия для роста биомассы, а на втором этапе - условия повышающие накопление фукоксантина (в основном за счет изменения длины волны и снижения интенсивности освещения), авторам удалось достичь более высоких значений объемной продуктивности 8,22 мг/л/день (Yang, R. et al. 2020).

В работе были изучены различные представители синуровых: штаммы *Mallomonas mangofera* var. *mangofera* R079 и R092, выделенные в России, а также штаммы *Mallomonas mangofera* var. *foveata* 25Yu, 130Yu и B2/25, выделенные во Вьетнаме (Gusev, E. S. et al. 2024a). Филогенетическая принадлежность штаммов была определена с помощью анализа последовательностей фрагментов генов 18S рДНК и *rbcL* хлоропластной ДНК (Рисунок 29).

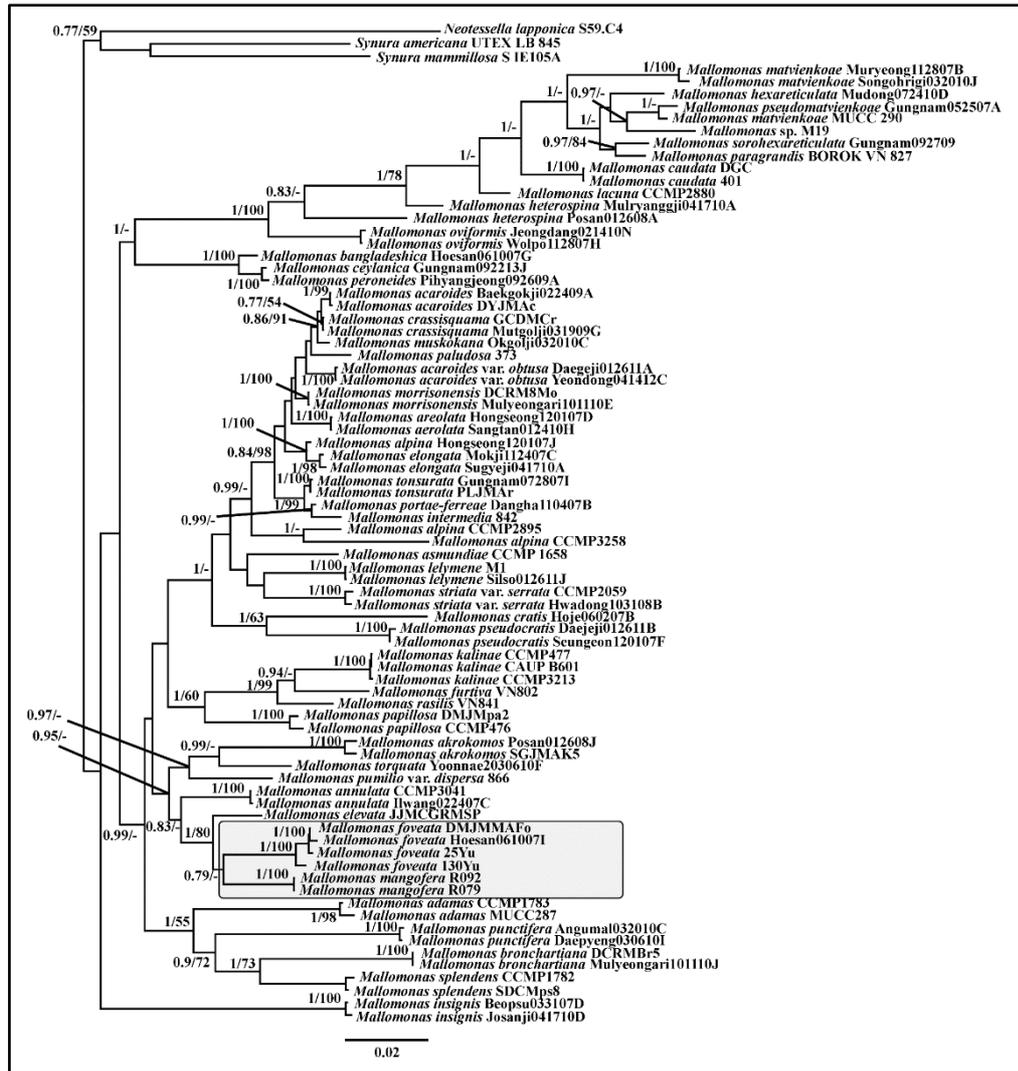


Рисунок 29 - Байесовское древо на основе секвенирования фрагментов генов 18S рДНК и *rbcL* хлоропластной ДНК. Значения Байесовской апостериорная вероятности (>0,80) и бутстрэпа максимального правдоподобия (>50%) приведены слева и справа от разделительной линии. Два представителя *Synura sp.* и *Neotessella lapponica* были использованы в качестве внешней группы. Исследованная клада выделена серым (Gusev, E. S. et al. 2024a).

Штаммы *Mallomonas mangofera* var. *mangofera* R079 и R092 сформировали отдельную кладу на филогенетическом древе, построенном на основании данных последовательностей фрагментов генов 18S рДНК и *rbcL* хлоропластной ДНК, и находились недалеко от нескольких представителей секции *Torquatae*, а именно *M. elevata* и *M. mangofera* var. *foveata* (Рисунок 29). Ультраструктура чешуек *Mallomonas mangofera* var. *mangofera* R079 и R092, установленная с помощью сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, оказалась идентичной морфологии чешуек штамма *Mallomonas mangofera*, выделенного в Великобритании и описанного в работе (Harris, K., 1960) (Рисунок 30 и Рисунок 31). К сожалению, авторы данной публикации не указали тип описанного штамма, поэтому его название не может считаться валидным (Turland, N. J. et

al. 2018). Кроме того, в ходе ревизии данной группы (Dürschmidt, M. 1983) в описание таксона был ошибочно включен посторонний морфотип чешуек, обладающий рядом признаков, свидетельствующем о принадлежности к другому виду согласно современным представлениям, что привело к путанице в некоторых публикациях. В настоящем исследовании, на основании полученных молекулярно-генетических и морфологических данных, было предложено новое валидированное формальное описание *Mallomonas mangofera* (вид был заново описан с учётом ранее сделанной находки), указан голотип и существенно дополнено оригинальное описание, данное в (Harris, K., 1960), (Gusev, E. S. et al. 2024b).

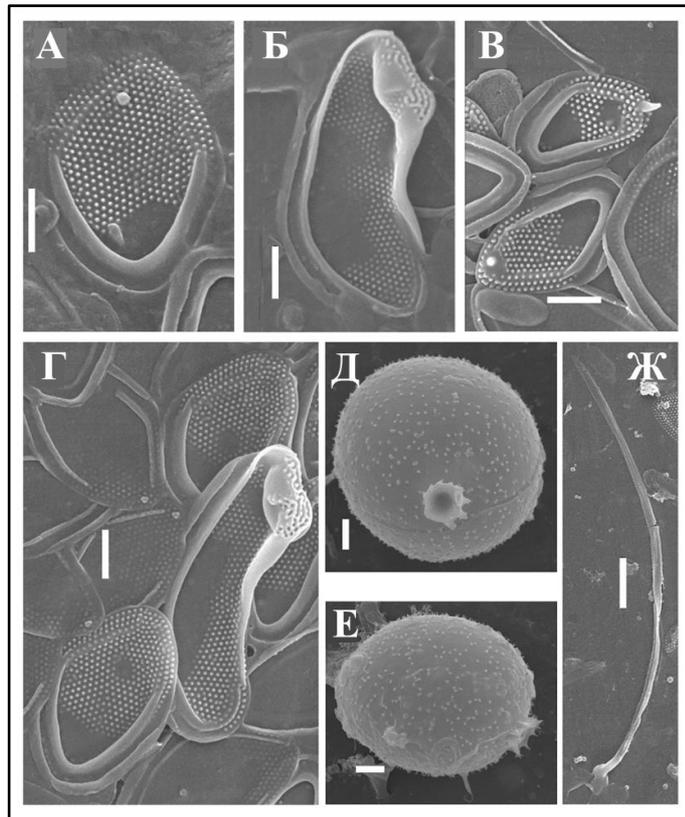


Рисунок 30 - Результаты сканирующей электронной микроскопии *Mallomonas mangofera* R092 (А,Б,В,Г,Ж) и R079 (Д,Е): А,Б,В,Г - чешуйки, Д,Е - стоматоциты, Ж - жгутик. Масштабная линейка: А,Б,В,Г - 1 мкм, Д,Е,Ж - 2 мкм. (Gusev, E. S. et al. 2024a).

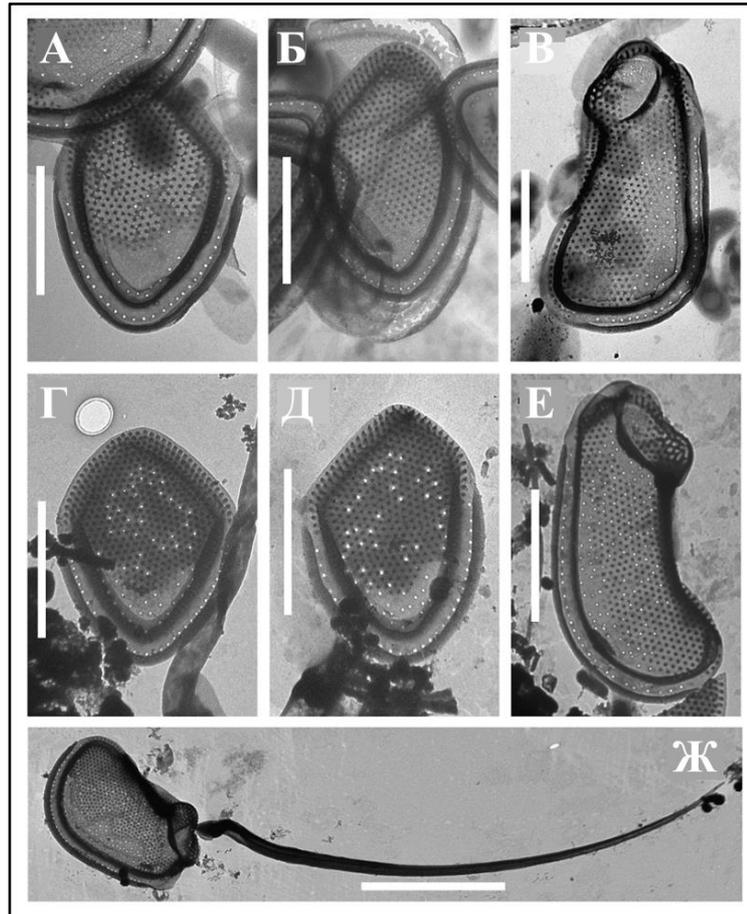


Рисунок 31 - Результаты просвечивающей электронной микроскопии *Mallomonas mangofera* R092: А,Б,В,Г,Д,Е - чешуйки, Ж - чешуйка со жгутиком. Масштабная линейка: 5 мкм. (Gusev, E. S. et al. 2024a).

Три штамма, сходные по строению с *Mallomonas mangofera*, а именно 25Yu, 130Yu и B2/25, изолированные во Вьетнаме, показали как морфологическое, так и молекулярно-генетическое отличие от морфотипа *Mallomonas mangofera sensu stricto*. Чешуйки данных штаммов обладали рядом отличительных признаков, характерных для *Mallomonas mangofera f. foveata* (Dürschmidt, M. 1983) (Рисунок 32). Штаммы сформировали кладу на древе, построенном на основании данных последовательностей фрагментов генов 18S рДНК и *rbcL* хлоропластной ДНК, отличную от клады *M. mangofera* (Рисунок 29). Полученные молекулярно-генетические данные свидетельствуют о необходимости присвоения данному таксону статуса вида. На основании анализа молекулярно-генетической информации предложена новая таксономическая комбинация *Mallomonas foveata comb. et stat. nov.*, а *Mallomonas sp.* 130Yu выбран в качестве аутентичного штамма.

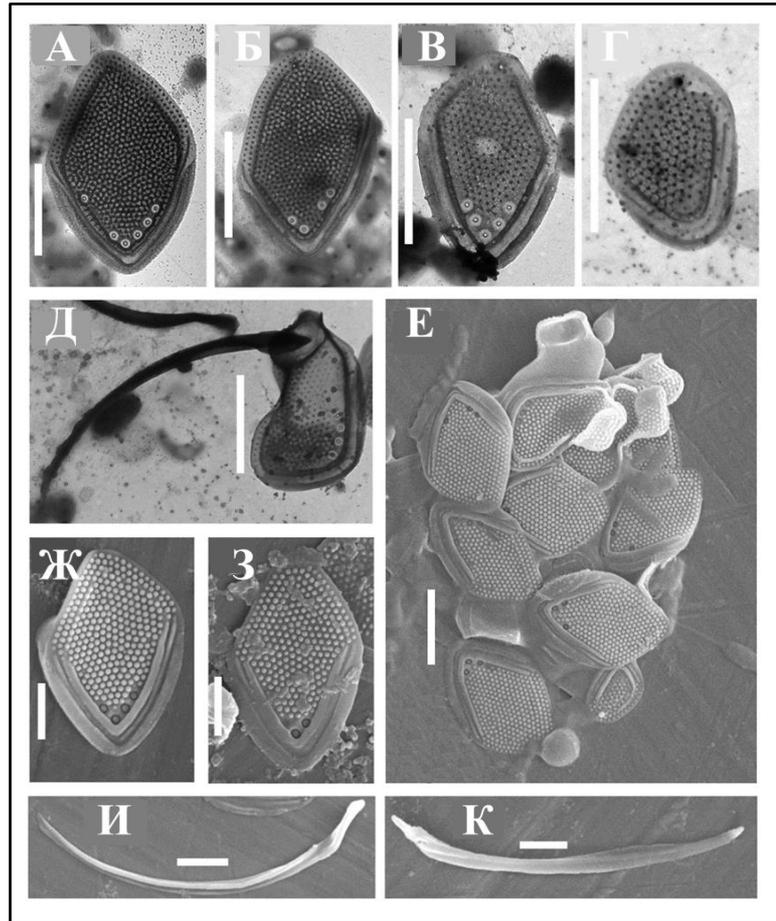


Рисунок 32 - Результаты сканирующей (СЭМ) и просвечивающей (ПЭМ) электронной микроскопии *Mallomonas foveata* comb. et stat. nov 25Yи (А, Б) и 130Yи (В, Г, Д, Е, Ж, З, И, К): А, Б, В, Г - чешуйки (ПЭМ), Д - чешуйка со жгутиком (ПЭМ), Е - группа чешуек (СЭМ), Ж, З - чешуйки (СЭМ), И, К - жгутики (СЭМ). Масштабная линейка: А, Б, В, Г, Д, Е - 2 мкм, Ж, З, И, К - 1 мкм. (Gusev, E. S. et al. 2024a).

В ходе исследования трех штаммов рода *Mallomonas* (629Yи, 2_18 и 12_18), выделенных из водоемов Вьетнама, была уточнена филогенетическая позиция вида *M. favosa* и известной формы этого таксона. Исследованные штаммы формируют отдельную кладу на филогенетическом древе, построенном на основании данных последовательностей фрагментов генов 18S рДНК и *rbcL* хлоропластной ДНК, и находятся рядом с несколькими представителями секции *Torquatae*, в частности *M. foveata* (Dürschmidt, M. 1983), (Gusev, E. S. et al. 2024a) и *M. mangofera* (Harris, K., 1960), (Gusev, E. S. et al. 2024a) (Рисунок 33).

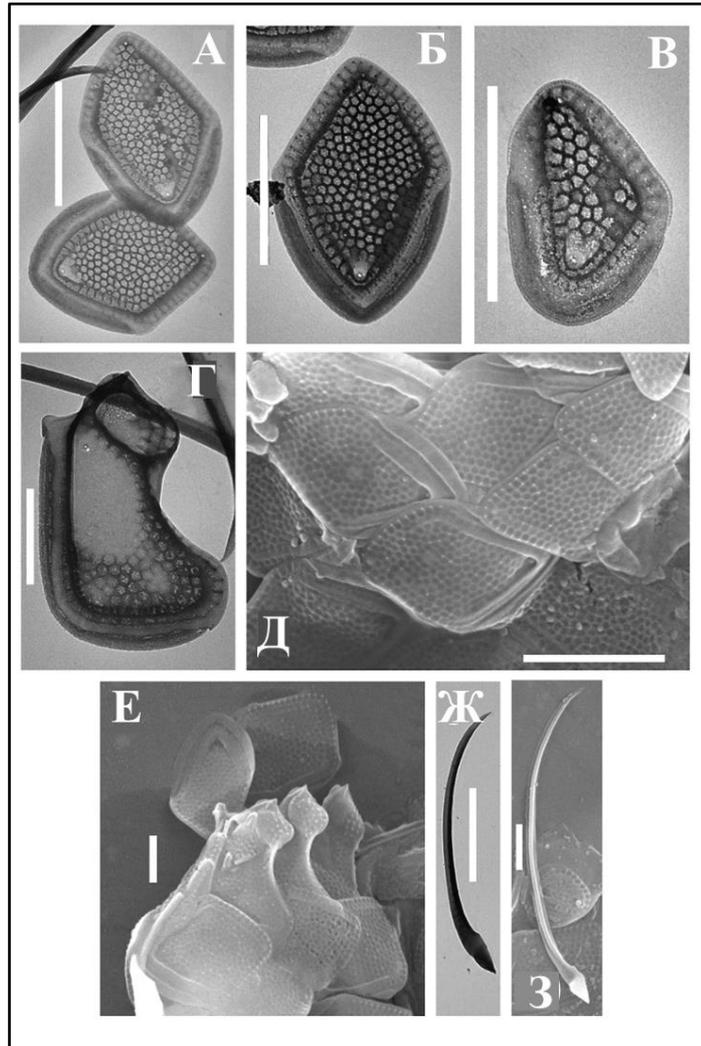


Рисунок 34 - Результаты сканирующей (СЭМ) и просвечивающей (ПЭМ) электронной микроскопии *Mallomonas favosa* 629Yu: А, Б, В, Г - чешуйки (ПЭМ), Д, Е - чешуйки (СЭМ), Ж - жгутик (ПЭМ), З - жгутик (СЭМ). Масштабная линейка: Г, Е, Ж – 1 мкм, А, Б, В, Д, З - 2 мкм. (Gusev, E. S. et al. 2024b).

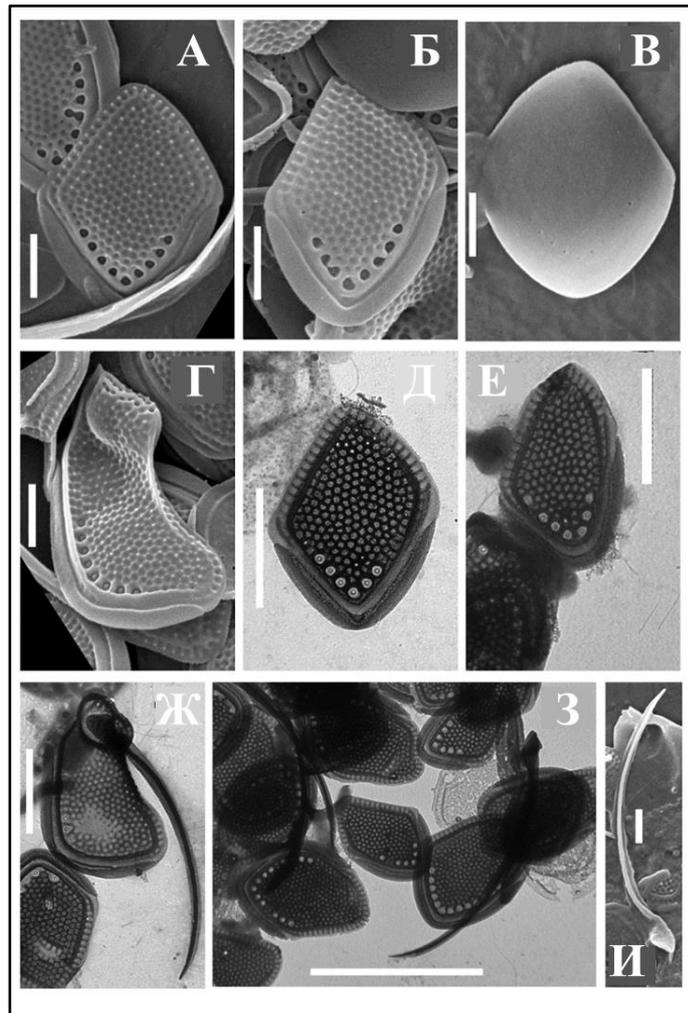


Рисунок 35 - результаты сканирующей (СЭМ) и просвечивающей (ПЭМ) электронной микроскопии *Mallomonas gemina comb. et stat. nov.* 12_18: А, Б, В, Г - чешуйки (СЭМ), Д, Е - чешуйки (ПЭМ), Ж - чешуйка со жгутиком (ПЭМ), З - группа чешуек и жгутиков (ПЭМ), И - жгутик (СЭМ). Масштабная линейка: А, Б, В, Г, И - 1 мкм, Д, Ж – 2 мкм, З - 5 мкм. (Gusev, E. S. et al. 2024b).

Было установлено, что чешуйки *Mallomonas sp.* 2_18 и 12_18 обладают отличительными характеристиками, присущими *Mallomonas favosa f. gemina* (Dürschmidt, M. et al. 1985). Кроме того, данные штаммы характеризуются значительными молекулярно-генетическими различиями по сравнению с группой *Mallomonas favosa f. favosa* (Рисунок 33). Полученные данные свидетельствуют о необходимости повышения таксономического статуса *Mallomonas favosa f. gemina* в ранг вида. На основании анализа молекулярно-генетической информации и ультраструктуры чешуек, предложена новая таксономическая группа *Mallomonas gemina comb. et stat. nov.*, а *Mallomonas sp.* 12_18 выбран в качестве аутентичного штамма.

Выводы по разделу

Обнаруженный и охарактеризованный в работе штамм *Mallomonas furtiva* SBV13 содержит наибольшее удельное количество фукоксантина в биомассе (26,6 мг/г) среди известных на сегодняшний день природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании (Khaw, Y. S. et al. 2022). Высокая объемная продуктивность, наряду с относительно высокой скоростью накопления биомассы, позволяет рассматривать *Mallomonas furtiva* SBV13 в качестве перспективного промышленного продуцента коммерчески значимого пигмента фукоксантина.

Полученные результаты ревизии двух видовых комплексов рода *Mallomonas* важны при планировании дальнейших работ по изучению биотехнологического потенциала этих перспективных продуцентов каротиноидов. Широкая распространённость в разнотипных водоёмах *Mallomonas foveata*, доказанная молекулярно-генетическими данными, позволяет ожидать высокие показатели при массовом культивировании этого организма, так как он обладает широкой экологической толерантностью, в том числе к температурным условиям. В связи с этим, штаммы этого вида могут включены в биотехнологические исследования в первую очередь.

3.7 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов эйкозапентаеновой кислоты

Одним из наиболее коммерчески успешным продуктом, выделенным из микроводорослей, можно считать омега-3 полиненасыщенную жирную кислоту (эйкозапентаеновую).

Эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) способствует снижению уровня триглицеридов в крови, уменьшает воспалительные процессы и может снижать риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, эта кислота необходима для синтеза других биологически активных соединений, таких как простагландины, которые регулируют множество физиологических процессов в организме (Bellou, S. et al. 2016).

Для того чтобы найти новые, эффективные продуценты ЭПК, были изучены параметры роста и продуктивности у штаммов коллекции Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA) (Коллекция живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA). URL: <https://ib.komisc.ru/sykoa>). Преимущественно были

исследованы микроводоросли класса Eustigmatophyceae, для которых в ранних работах была показана способность накапливать различные полиненасыщенные жирные кислоты.

Культуры выращивали в течение двух недель в среде WC*10 и 3NBVM в термостатируемом лабораторном инкубаторном шейкере при температуре 24 °С, постоянном перемешивании 150 об/мин и 5 % объемной доле CO₂ в подаваемом воздухе. Освещение интенсивностью 160 мкмоль фотонов/м²/с осуществлялось с фотопериодом 16 ч свет : 8 ч темнота. Микроскопия и определение оптической плотности культур при длине волны 680 нм выполнялось ежедневно. Каждые два дня производили забор образца биомассы, которую последовательно собирали центрифугированием с последующей лиофилизацией и взвешиванием. Дополнительно в культуральной среде измеряли содержания нитратов и фосфатов.

Спустя 14 дней роста в лиофилизате образца биомассы измеряли содержание ЭПК. Количественное определение эйкозапентаеновой кислоты проводили методом внешнего стандарта по калибровочному графику с использованием внутреннего стандарта нонадекановой кислоты для учета потерь во время пробоподготовки.

Охарактеризован штамм *Vischeria magna* SBV108, в биомассе которого содержание ЭПК к четырнадцатому дню культивирования составило 46,1 мг/г сухого веса. Биомасса *V. magna* SBV108 на среде 3NBVM составила 4 г/л (сухого веса) к 14-му дню эксперимента (Рисунок 36).

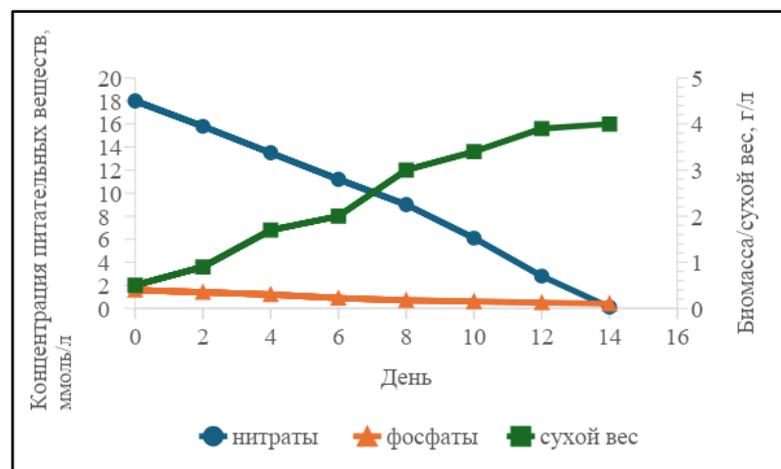


Рисунок 36 - Кривые роста и поглощения нитратов/фосфатов *Vischeria magna* SBV108 (Sorokin, V. et al. 2024).

Штамм *Vischeria magna* SBV108 депонирован в Коллекции живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA) под регистрационным номером SYKOA E-07-09 (SYKOA, Сыктывкар, Россия, (Коллекция живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA). URL:

<https://ib.komisc.ru/sykoa>). Детальное описание местообитания, включая химию почвы, представлено в публикации (Patova, E. N. et al 2023).

Согласно проведенному молекулярно-генетическому анализу *Vischeria magna* SBV108 относится к отделу Heterokontophyta, классу Eustigmatophyceae, порядку Eustigmatales, семейству Chlorobotryaceae, роду *Vischeria*. Сравнение с другими штаммами рода *Vischeria* на основе ITS2 рДНК показало, что штамм относится к кладе *Vischeria magna* SBV108 (Рисунок 37).

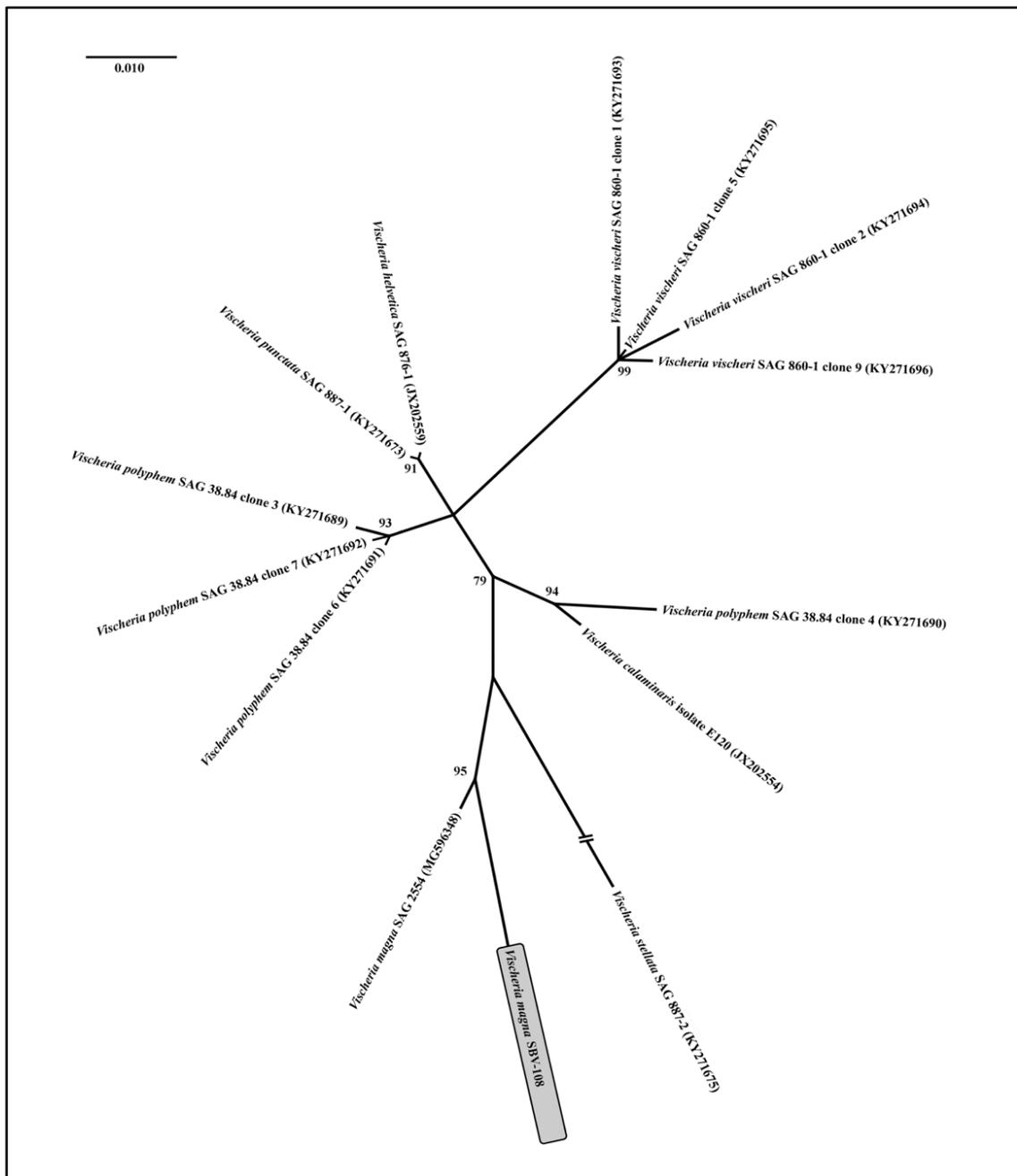


Рисунок 37 - Неукорененное Байесовское древо ITS2 рДНК штаммов рода *Vischeria*. Значения бутстрепа приведены у узлов. Масштабная линейка отражает число замен на 1 сайт (Sorokin, B. et al. 2024).

Клетки *Vischeria magna* SBV108 имеют шаровидную форму размером 6-14 мкм, диаметром 10-11 мкм; пиреноид полигональный, крупный, угловой, без обкладки и тилакоидов; хроматофор чашевидный, с глубоко вырезанными лопастными краями. Размножение происходит зоо- и автоспорами (по 2-4 шт). Зооспоры имеют один жгутик. При длительном хранении клетки увеличиваются в размерах за счет вакуолизации, цитоплазма гранулируется, происходит обесцвечивание хлоропластов (Рисунок 38).



Рисунок 38 - Микрофотография вегетативных клеток *Vischeria magna* SBV108 (Sorokin, B. et al. 2024).

Анализ существующих данных позволяет утверждать, что *V. magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом среди всех почвенных и пресноводных микроводорослей (Таблица 22). Содержание ЭПК в биомассе *V. magna* SBV108 составляет 46,1 мг/г. Среди солоноводных штаммов только для *Nannochloropsis oceanica* CY2 показано большее содержание ЭПК - 55,7 мг/г сухого веса (Chen, С.-У. et al. 2013). Полученные результаты подтверждают ранние наблюдения о перспективности изучения классов Bacillariophyceae, Chrysophyceae и Eustigmatophyceae в качестве источника полиненасыщенных жирных кислот.

Таблица 22 - Содержание эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в биомассе микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании (Sorokin, B. et al. 2024).

Штамм	Среда обитания	Содержание ЭПК, мг/г сухого веса	Ссылка на литературный источник
<i>Nannochloropsis oceanica</i> CY2	морской	55,7	Chen C.-Y., Chen Y.-C., Huang H.-C., Huang C.-C., Lee W.-L., Chang J.-S. Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i> CY2 // <i>Bioresource Technology</i> . - 2013. - Vol. 147. - P. 160-167.
<i>Vischeria magna</i> SBV108	пресноводный	46,1	Настоящее исследование
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	морской	38,9	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 // <i>Bioresource Technology</i> . - 2022. - Vol. 344. - P. 126250.
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> П242	морской	38,6	Alonso, D. L., Segura del Castillo, C. I., Grima, E. M., Cohen, Z. First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in <i>Phaeodactylum tricornerutum</i> (Bacillariophyceae) by induced mutagenesis // <i>Journal of Phycology</i> . - 1996. - Vol 32. - P. 339-345.
<i>Pavlova</i> sp. CS-50	морской	35,2	Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., Southgate, P. C. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (<i>Pinctada margaritifera</i> , L.) larvae // <i>Aquaculture</i> . - 2006. - Vol 257(1-4). - P. 491-503.
<i>Nannochloropsis oceanica</i> IMET1	морской	31,2	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 // <i>Bioresource Technology</i> . - 2022. - Vol. 344. - P. 126250.
<i>Nannochloropsis oculata</i>	морской	30,8	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 // <i>Bioresource Technology</i> . - 2022. - Vol. 344. - P. 126250.
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i> NIVA BAC 2	морской	28,4	Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // <i>Aquaculture International</i> . - 2007, - Vol. 15. - P. 1-9.
<i>Nannochloropsis oceanica</i> NIVA 2/03	морской	23,4	Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // <i>Aquaculture International</i> . - 2007, - Vol. 15. - P. 1-9.
<i>Porphyridium cruentum</i> SRP-6	морской	23,2	Cohen, Z., Didi, S., Heimer, Y. M. Overproduction of γ -linolenic and eicosapentaenoic acids by algae // <i>Plant physiology</i> . - 1992. - Vol. 98. - P. 569-572.
<i>Nitzschia</i> sp. FD397	пресноводный	23,1	Peltomaa, E., Hällfors, H., Taipale, S. J. Comparison of Diatoms and Dinoflagellates from Different Habitats as Sources of PUFAs // <i>Marine Drugs</i> . - 2019. - Vol. 17(4). - P. 233.

<i>Pavlova lutheri</i>	морской	23,1	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 // <i>Bioresource Technology</i> . - 2022. - Vol. 344. - P. 126250.
<i>Diatoma tenuis</i> CPCC 62	пресноводный	18,9	Peltomaa, E., Hällfors, H., Taipale, S. J. Comparison of Diatoms and Dinoflagellates from Different Habitats as Sources of PUFAs // <i>Marine Drugs</i> . - 2019. - Vol. 17(4). - P. 233.
<i>Aurantiochytrium</i> sp. SD116::PfaA-D	морской	18,7	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 <i>Aurantiochytrium</i> // <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> . - 2020. - Vol. 68(40). - P. 11253-11260.
<i>Pavlova</i> sp. NIVA 4/92	морской	18,0	Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // <i>Aquaculture International</i> . - 2007. - Vol. 15. - P. 1-9.
<i>Chaetoceros</i> sp. CS-256	морской	15,4	Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., Southgate, P. C. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (<i>Pinctada margaritifera</i> , L.) larvae // <i>Aquaculture</i> . - 2006. - Vol 257(1-4). - P. 491-503.
<i>Gymnodinium fuscum</i> K-1836	пресноводный	13,7	Peltomaa, E., Hällfors, H., Taipale, S. J. Comparison of Diatoms and Dinoflagellates from Different Habitats as Sources of PUFAs // <i>Marine Drugs</i> . - 2019. - Vol. 17(4). - P. 233.
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> CPCC 267 (CCAP 1079/4)	пресноводный	12,6	Peltomaa, E., Hällfors, H., Taipale, S. J. Comparison of Diatoms and Dinoflagellates from Different Habitats as Sources of PUFAs // <i>Marine Drugs</i> . - 2019. - Vol. 17(4). - P. 233.
<i>Chaetoceros muelleri</i> CS-176	морской	10,4	Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., Southgate, P. C. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (<i>Pinctada margaritifera</i> , L.) larvae // <i>Aquaculture</i> . - 2006. - Vol 257(1-4). - P. 491-503.
<i>Peridinium cinctum</i> K-1721	пресноводный	10,2	Peltomaa, E., Hällfors, H., Taipale, S. J. Comparison of Diatoms and Dinoflagellates from Different Habitats as Sources of PUFAs // <i>Marine Drugs</i> . - 2019. - Vol. 17(4). - P. 233.
<i>Rhodomonas baltica</i>	морской	8,0	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 // <i>Frontiers in Marine Science</i> . - 2019. - Vol. 6. - P. 95.
<i>Porphyridium cruentum</i> NIVA 1/92	морской	6,1	Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // <i>Aquaculture International</i> . - 2007. - Vol. 15. - P. 1-9.
<i>Tetraselmis suecica</i> NIVA 3/92	морской	4,8	Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // <i>Aquaculture International</i> . - 2007. - Vol. 15. - P. 1-9.

<i>Rhodomonas baltica</i> NIVA 5/91	морской	4,4	Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // Aquaculture International. - 2007, - Vol. 15. - P. 1-9.
-------------------------------------	---------	-----	--

Для определения биотехнологического потенциала штамма *V. magna* SBV108 проводили измерение волюметрической продуктивности в условиях двухнедельного культивирования в среде 3NBVM в панельном фотобиореакторе закрытого типа полезной емкостью 260 л. Показано, что при интенсивности освещения 160 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, температуре 28 °С, нейтральных рН - объемный выход ЭПК составил 13,4 мг/л/день. При этом скорость роста *V. magna* SBV108 составила 3,9 г/л сухой биомассы. Согласно этим данным, волюметрическая продуктивность *V. magna* SBV108 превышает таковую для *Nannochloropsis oceanica* CY2 почти на 30 % (Chen, C. Y. et al. 2018), (Camacho-Rodríguez, J. et al. 2014) в сопоставимых условиях полупромышленного культивирования получена волюметрическая продуктивность ЭПК для штамма *N. Gaditana* В-3 - 4,85 мг/л/день.

Средняя волюметрическая продуктивность, полученная при культивировании различных штаммов в промышленных условиях (объем более 50 л) не превышала 5,7 мг/л/день.

При этом в экспериментах с *Nannochloropsis* sp. культивируемом в объеме 500 л (плоский панельный фотобиореактор) продуктивность ЭПК составила 6,5 мг/л/день. (Benavides, A. M. S. et al. 2013), (Chen, Y. C. et al. 2015), (Chen, C. Y. et al. 2018), (Nogueira, N. et al. 2020), (Cheng-Wu, Z. et al. 2001).

Несмотря на относительно высокую продуктивность ЭПК в открытых системах, низкие капитальные и операционные затраты, такой способ культивирования не позволят контролировать ряд важнейших параметров (температура, режим освещения) и создает риски контаминации другими микроорганизмами (Muys, M. et al. 2019).

Выводы по разделу

Охарактеризован новый пресноводный штамм-продуцент эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) - *Vischeria magna* SBV108. Анализ существующих данных позволяет утверждать, что *V. magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом среди всех почвенных и пресноводных микроводорослей. Удельное содержание ЭПК в сухой биомассе *V. magna* SBV108 составляет 46,1 мг/г сухого веса. Волюметрическая продуктивность эйкозапентаеновой кислоты в условиях полупромышленного

культивирования *V. magna* SBV108 - составляет 13,4 мг/л/день, что сопоставимо с лучшими промышленными штаммами-продуцентами ЭПК.

Пресноводность *V. magna* SBV108 является существенным биотехнологическим преимуществом, так как позволяет снизить затраты на культивирование штамма за счет более низкой стоимости питательных сред и отсутствия издержек, связанных с повышенной коррозионной нагрузкой на оборудование.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАССЫ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В АКВАКУЛЬТУРЕ

4.1 Фотосинтезирующие микроорганизмы как перспективный корм для аквакультуры

Начиная с 1980-х годов мировое производство аквакультуры увеличилось с 7 % от мирового объема производства гидробионтов до более чем 40 %. Так как около половины себестоимости производства единицы аквакультурной продукции составляют затраты на корм, ожидается дальнейший рост спроса на корма со среднегодовым приростом в 11,7 %. Развивающийся сектор аквакультуры требует новых устойчивых источников кормовых ингредиентов (Tacon, A. G. J. et al. 2015).

Основным источником белка, омега-3 жирных кислот и других соединений в составе корма в настоящее время является рыбная мука, но при сохранении существующих темпов вылова природные промысловые ресурсы рыбы будут исчерпаны к 2050 году (Worm, B. et al. 2006). Высокий спрос на рыбную муку и сокращение вылова привели к росту цен на рыбный кормовой продукт. Попытка заменить рыбную муку на корма, имеющие растительное происхождение, позволили лишь частично решить эту проблему.

Качественный корм должен содержать большое количество белка и полиненасыщенных жирных кислот (Watters, C. et al. 2012). Практика искусственного разведения рыб продемонстрировала, что высокая жизнеспособность молоди зависит от наличия качественных функциональных кормов, особенно на ранних стадиях постэмбрионального развития, когда происходит переход на активное питание (Sarker, P. K. et al. 2018).

Живые микроводоросли или переработанная микроводорослевая биомасса в замороженном или высушенном виде используется либо для прямого кормления моллюсков, ракообразных и рыбы, либо для «обогащения» (путем скармливания артемиям и коловраткам) живого корма, который затем служит пищей личинкам и молодняку вышеупомянутых видов.

Микроводоросли являются природным стартовым кормом для многих аквакультурно-значимых видов и содержат биологически-активные вещества, незаменимые для полноценного роста и развития малька. В этой связи добавление

биомассы микроводорослей в стартовые корма для аквакультуры представляет собой перспективную биотехнологическую задачу.

В настоящее время только ограниченное количество штаммов микроводорослей было изучено в качестве добавок к кормам для аквакультуры. В основном это цианобактерии рода *Arthrospira*, а также эукариотические штаммы родов *Chlorella* и *Schizochytrium*. (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), (Tadesse, Z. et al. 2003), (Sarker, P. K. et al. 2016).

Показано, что омега-3 жирные кислоты, в основном эйкозапентаеновая и докозагексаеновая, могут оказывать стимулирующее влияние на рост рыб, особенно на ранних стадиях развития (Watters, C. et al. 2012). Кроме того, добавление ЭПК и ДГК в рацион аквакультуры повышает пищевую ценность рыбного мяса (Sarker, P. K. et al. 2016a).

Многочисленные исследования показывают важность антиоксидантов для здоровья гидробионтов. Фукоксантин - это природный антиоксидант, часто встречающийся в микроводорослях (в основном у представителей гетероконтовых и гаптофитовых водорослей), которые являются естественным кормом для личинок и молоди многих гидробионтов.

Были использованы штаммы микроводорослей, охарактеризованные на предыдущих этапах работы, в качестве кормовых ингредиентов для аквакультуры: *Mallomonas furcivata* SBV13, который обладает наибольшим содержанием фукоксантина в биомассе среди известных природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании (Khaw, Y. S. et al. 2022), и *Vischeria magna* SBV108, отличающийся одной из самых высоких массовых концентраций эйкозапентаеновой кислоты.

В качестве тестового аквакультурного организма были выбраны мальки красной тилапии *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*.

Мировое аквакультурное производство тилапии устойчиво растет и по данным FAO в 2021 году составило 6,5 млн тонн или 9,7 млрд долларов США. В России в тот же период производство тилапии составило 500 тонн или 74,6 млн руб.

4.2 Приготовление тестовых кормов на основе биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов

Биомассу *V. magna* SBV108 и *M. furcivata* SBV13 нарабатывали в фотобиореакторе Lumian AGS 260 согласно полученным ранее протоколам. В течение 14-дневного периода

роста обоих штаммов питательные вещества были полностью использованы. Итоговая плотность штамма *V. magna* SBV108 составляла 4 г/л, а *M. furtiva* SBV13 - 2 г/л.

Общий химический состав лифилизированной биомассы штаммов *V. magna* SBV108 и *M. furtiva* SBV13 приведен в Таблицах 23,24.

Таблица 23 - Химический состав биомассы *V. magna* SBV108 (Sorokin, B. et al. 2024).

Компонент	Содержание, % сухого веса
Белки	23,2
Всего липидов	38,6
Всего углеводов	28,2
Зола	10,0
Жирнокислотный профиль	Содержание, мг/г сухого веса
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

Таблица 24 - Химический состав биомассы *M. furtiva* SBV13 (Sorokin, B. et al. 2024).

Компонент	Содержание, % сухого веса
Белки	41,3
Всего липидов	15,4
Всего углеводов	15,7
Зола	25,0
Фукоксантин	2,6
Жирнокислотный профиль	Содержание, мг/г сухого веса
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) EPA	2,1

Было приготовлено три тестовых корма: Корм 1, содержащий 10 % масс биомассы *V. magna* SBV108; Корм 2, содержащий 10 % масс *M. furtiva* SBV13; Корм 3, содержащий 5 % масс *V. magna* SBV108 и 5 % масс *M. furtiva* SBV13. Гомогенизированный корм Supreme-15 использовался в качестве контроля (Таблица 25).

Таблица 25 - Расчетный химический состав тестируемых кормов (Sorokin, B. et al. 2024).

Компонент	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3
<i>M. furtiva</i> SBV13 биомасса (% от веса)	0	0	10	5
<i>V. magna</i> SBV108 биомасса (% от веса)	0	10	0	5
Белки (% сухого веса)	46,0	43,7	45,8	45,1
Липиды (% сухого веса)	15,0	17,3	15,1	16,2
Углеводы (% сухого веса)	8,0	9,9	8,9	9,3
Общая энергия (кДж/г)	21	22	21	22

Тестируемые Корма 1 и 3 содержали биомассу *V. magna* SBV108, что привело к более высокому конечному содержанию липидов и меньшему содержанию белка. В составе Корма 2, где использовалась только биомасса *M. furtiva* SBV13, общее содержание белка и липидов почти соответствовало контрольному корму Supreme-15 (Таблица 25).

4.3 Оценка ростовых характеристик и показателей эффективности кормления мальков красной тилапии

Итоговый вес всех рыб по завершении эксперимента превысил 1 г, что говорит об эффективности исследованных кормов. За время эксперимента не было зафиксировано гибели рыб ни в одном из аквариумов. Лучший результат был получен при использовании Корма 1 (10 % по весу *V. magna* SBV108), конечный вес тилапии составил 1,27 г, что почти на 25 % выше чем в контрольной группе (1,03 г) ($p < 0,05$). Конечный вес рыб, которым давали Корм 3 (5 % по весу *V. magna* SBV108 + 5 % по весу *M. furtiva* SBV13) или Корм 2 (10 % по весу *M. furtiva* SBV13), статистически не отличался от веса рыб в экспериментах с коммерческим кормом. Средние значения абсолютного прироста и абсолютной скорости роста рыб во всех экспериментальных группах превысили показатели контрольной группы, однако только для Корма 1 эта разница была статистически значимой: удельная скорость роста была на 25 % выше. Удельная скорость роста при кормлении Кормом 2 и 3 не отличалась от контроля. Обобщенные данные ростовых характеристик приведены в Таблице 26.

Таблица 26 - Влияние тестируемых кормов на ростовые характеристики мальков красной тиляпии (Sorokin, B. et al. 2024).

Параметры	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-значение	P-значение
Начальный вес, г	0,57 ± 0,02	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,53 ± 0,01	1,72	0,167
Финальный вес, г	1,03 ± 0,03	1,27 ± 0,07	1,08 ± 0,05	1,10 ± 0,04	4,56	0,005
Абсолютный прирост, г	0,46 ± 0,04	0,70 ± 0,07	0,50 ± 0,05	0,57 ± 0,04	4,56	0,005
Средняя скорость роста, г/день	0,03 ± 0,002	0,05 ± 0,005	0,03 ± 0,003	0,04 ± 0,003	4,07	0,009
Удельная скорость роста, % /день	3,97 ± 0,31	5,16 ± 0,37	4,06 ± 0,32	4,81 ± 0,26	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).

Коэффициент конверсии корма, а также эффективность использования белка и энергии являются важнейшими параметрами кормов. В экспериментах было показано, что Корм 1 статистически значимо превосходит тестируемые Корм 2 и 3, а также коммерческий корм, по следующим параметрам: конверсия корма, прирост на грамм кормового белка, эффективность использования белка и энергии. Показатель эффективности использования белка при добавлении микроводорослей существенно повысился для Корма 1 и Корма 3, 26 % и 20 %, соответственно. Экспериментальные результаты представлены в Таблице 27.

Таблица 27 - Влияние тестируемых кормов на эффективность использования мальками красной тиляпии энергии и белка (Sorokin, B. et al. 2024).

Параметр	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-значение	P-значение
Конверсия корма	1,56 ± 0,17	1,07 ± 0,11	1,43 ± 0,13	1,13 ± 0,09	3,27	0,024
Прирост на грамм кормового белка	1,77 ± 0,14	2,84 ± 0,27	1,94 ± 0,18	2,23 ± 0,14	5,77	0,001
Эффективность использования белка, %	14 ± 1	26 ± 2	18 ± 1	20 ± 1	13,36	<0,001
Эффективность использования энергии, %	11 ± 1	16 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	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).

4. 4 Химический анализ кормов и мяса красной тиляпии

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 начального химического состава мяса. Сухая масса и содержание воды определяли высушиванием образцов при 103 °С в течение 4 часов до постоянного веса (ISO 6496). Содержание золы определяли путем сжигания образцов в муфельной печи при 550 °С в течение 4 часов (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.

Обобщенные результаты влияния экспериментальных кормов на химический состав мяса рыб приведены в Таблице 28. Содержание белка, жира, а также энергетическая ценность мяса рыб увеличилось по сравнению с начальным, что свидетельствует о хорошей усвояемости тестируемых кормов. В то же время, добавление микроводорослей в коммерческий корм Supreme-15 не привело к изменению состава мяса мальков тиляпии.

Таблица 28 - Влияние тестируемых кормов на химический состав мяса мальков красной тиляпии (Sorokin, B. et al. 2024).

Параметр	Начальное значение	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-значение	P-значение
Белок (% сухого веса)	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 (% сухого веса)	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 (% сухого веса)	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 (% сухого веса)	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 мокрого веса)	1,89 ± 010	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). Значения с разными индексами в пределах одной строки статистически-значимо различаются (p<0,05).

Микроводоросли являются незаменимым источником питания для молодняка рыб, моллюсков и ракообразных в естественной среде обитания. Многие штаммы содержат биологически-активные вещества (например, полиненасыщенных жирных кислот), необходимые для успешного развития молоди рыб.

Одним из основных барьеров применения микроводорослей в аквакультуре является высокая стоимость производства. Отчасти поэтому сегодня микроводоросли используют преимущественно в небольших объемах в качестве стартерных кормов для личинок и малька.

В литературе встречаются исследования, посвященные изучению влияния микроводорослей на ростовые характеристики различных аквакультурно-значимых видов рыб, таких как мозамбикская тилапия, нильская тилапия, радужная форель, атлантический лосось и африканский сом (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. 2016), (Sprague, M. et al. 2016), (Raji, A. A. et al. 2020). Добавление биомассы микроводорослей приводило к ускорению 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) и повышению выживаемости аквакультурных видов (Nagarajan, S. et al. 2021). В основе этого эффекта лежит повышение иммунитета гидробионтов и регуляцией белкового и липидного обмена (Hayashi, O. et al. 1994).

Для стартовых аквакультурных кормов особое значение имеет содержание ЭПК и ДГГ, так как потребность личинок и мальков рыб в этих соединениях практически вдвое превосходит потребность взрослых особей. Вероятно, это связано с активным неврологическим развитием мальков (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. 2016).

Описанные в литературе данные согласуются с теми результатами, которые были получены в работе. Наибольшая эффективность была продемонстрирована при кормлении малька тилапии Кормом 1, содержащим 10 % масс богатой ЭПК биомассы *V. magna* SBV108. Итоговый вес и удельная скорость роста рыб, получавших Корм 1, превышала показатели контрольной группы на 25 %, в то время как Корма 2 и 3, содержащие биомассу

M. furtiva SBV13, не показали статистически-значимых отличий от контрольного корма по тем же параметрам. Добавление в корм 10 % масс биомассы *V. magna* SBV108 также приводило 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. Добавление в стартерный корм биомассы *M. furtiva* SBV13, обогащенной природным антиоксидантом фукоксантином, не привело к статистически-значимому улучшению эффективности кормления малька в рамках двухнедельного эксперимента. Возможно, добавление антиоксидантов имеет отсроченный эффект за счет стимулирования обмена веществ и иммунитета рыб, однако для подтверждения данной гипотезы необходимы дополнительные эксперименты.

Выводы по разделу

Микроводоросли являются естественным кормом для множества видов аквакультуры и содержат все необходимые элементы для правильного роста и развития мальков.

В данном исследовании было установлено, что биомасса *V. magna* SBV108 может улучшить качество стартовых кормов для рыб. Хотя добавление микроводорослей, содержащих фукоксантин, таких как *M. furtiva* SBV13, может способствовать улучшению здоровья и иммунной системы рыб, в данном исследовании это не привело к значительным изменениям показателей эффективности корма. Напротив, добавление 10 % по весу биомассы *V. magna* SBV108, богатой омега-3 эйкозапентаеновой кислотой, значительно улучшило почти все параметры более чем на 20 %. На сегодняшний день нет биотехнологического штамма микроводорослей, богатого ЭПК, который получил бы широкое промышленное применение в качестве корма или кормовой добавки для аквакультуры. В этом контексте биомасса *V. magna* SBV108 может быть рассмотрена в качестве прототипа одного из важнейших компонентов стартерного корма для мальков красной тилапии.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ВЕЩЕСТВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

5.1 Проблема устойчивости бактерий к антимикробным препаратам

Антибиотикорезистентность - феномен устойчивости штаммов возбудителей инфекций к действию одного или нескольких антибактериальных препаратов - ежегодно уносит десятки тысяч жизней и наносит огромный экономический ущерб. При сохранении текущей тенденции развития и распространения лекарственной устойчивости, к 2050 году суммарные потери мировой экономики превысят 100 трлн долларов США, а суммарные человеческие потери составят 300 млн смертей. Только в 2019 году антибиотикорезистентность стала причиной гибели 4,95 млн людей (Antimicrobial Resistance Collaborators. 2022). Существование проблем мульти- и кросс-резистентности делает необходимым поиск антимикробных препаратов с принципиально новыми механизмами действия. Однако в течение последних 45 лет в клиническую практику были введены всего несколько классов антибиотиков. Из находящихся сейчас в разработке лекарств меньше 5 % - новые антибиотики. Стоит также отметить и тот факт, что большинство подходов при разработке новых антибиотических препаратов связано с получением модификаций уже существующих молекул, что позволяет лишь временно снизить, но не решить проблему резистентности патогенных микроорганизмов. В настоящее время основным подходом к получению новых антимикробных веществ является скрининг химических библиотек специализированных соединений и соединений природного происхождения, использование сочетаний нескольких антибиотиков, а также использование лекарственных средств, в которых сочетаются антимикробные вещества и ингибиторы ферментов, ответственных за развитие лекарственной устойчивости у микроорганизмов.

В 15 странах Евросоюза более 10 % всех септических инфекций вызвано метициллин-резистентным золотистым стафилококком (MRSA, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), распространенность устойчивости в некоторых из этих стран составляет от 40 % до 70 % всех штаммов *S. aureus* (Grossi, A. P. et al. 2022), (Potashman, M. H. et al. 2016). Внутрибольничные инфекции, вызываемые MRSA, являются одной из основных причин смертности, продолжительности пребывания в больнице и расходов на лечение. Почти 10 % всех случаев госпитализаций в США и 15 % всех обращений к врачу, связанных с инфекционными заболеваниями в Европе, ассоциированы с острыми бактериальными инфекциями кожи и структур кожи (ОБИККС). При этом основными

причинами мономикробных ОБИККС являются аэробные грамположительные кокки, в частности *S. aureus* и Methicillin-resistant *S. aureus*.

Согласно текущим рекомендациям Американского общества инфекционистов, рекомендуемыми антибиотиками для лечения инфекции MRSA являются ванкомицин, линезолид, клиндамицин, даптомицин и др. (Stevens, D. L. et al. 2014). Однако стремительное развитие бактериальной резистентности делает часть этих препаратов клинически неэффективными (Chen, С.-Н. et al. 2023), (Maraki, S. et al. 2023), (Werth, B. J. 2018), (Kusmann, M. et al. 2018).

В России доля устойчивых к антибиотикам штаммов золотистого стафилококка на протяжении последних 10 лет сохраняется в среднем на уровне 40 %. Частота распространения MRSA в некоторых отделениях реанимации, онкологии и гематологии превышает 50 % - 60 %, что создает крайне серьезные проблемы для терапии. Возрастающая частота циркуляции нозокомиальной формы MRSA приводит к увеличению числа полирезистентных штаммов CA-MRSA (Community Associated MRSA), что вовлекает в группы риска людей, не находящихся в ЛПУ, прежде всего, дети, спортсмены, военнослужащие. При этом, независимо от результатов оценки *in vitro* при инфекциях, вызываемых MRSA, все β -лактамы следует считать клинически неэффективными и не использовать в терапии.

Распространение антибиотикорезистентности делает необходимым поиск антимикробных препаратов с принципиально новыми механизмами действия.

5.2 Поиск антимикробных соединений из фотосинтезирующих микроорганизмов

В целях поиска более высокомаржинальных соединений, ориентированных, прежде всего, на фармацевтический рынок, проводили поиск биологически активных соединений из микроводорослей. В частности, были изучены антимикробные свойства спиртовых, водных экстрактов биомассы микроводорослей. Дополнительно исследовали противомикробную активность культуральной жидкости.

Для культуральной жидкости микроводорослей *Dunaliella salina*, которая была загрязнена нитчатými грибами *Streptomyces sp.*, была показана антимикробная активность против различных грамположительных бактерий, в том числе MRSA.

Было проведено исследование культуральной среды, заключающееся в последовательном фракционировании и определении противомикробной активности в

получаемых фракциях. При помощи методов ВЭЖХ, УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР-спектроскопии была определена химическая формула вещества, проявляющего антимикробную активность. Вещество получило название VX-SI001 (3-[(4-Метил-пиперазин-1-ил)диазенил]-1H-индол-2-карбоксилат) и относилось к классу триазеноиндолов, для которых ранее в экспериментах *in vitro* был показан ряд биологических эффектов, в том числе противоопухолевый, противогрибковый и антимикобактериальный (Majorov, K. V. et al. 2020), (Nikonenko, B. V. et al. 2016), (Reddyrajula, R. et al. 2024), (Iyer, K. R. et al. 2023). Активность триазениндолов против MRSA ранее не была показана.

5.3 Дизайн и синтез библиотеки соединений-модификаций VX-SI001

На первом этапе была проведена оптимизация свойств исходного соединения VX-SI001. Целью было создание производных оригинальной молекулы, обладающих большей антибактериальной активностью и лучшими фармакокинетическими свойствами триазениндольного ядра.

Согласно лучшим практикам, вещество-кандидат должно было соответствовать ряду параметров:

- молекулярная масса < 500 M
- коэффициент распределения вещества на границе раздела вода-октанол < 5
- топологическая площадь полярной поверхности > 70
- количество доноров водородных связей < 7
- количество акцепторов водородных связей < 12
- количество вращающихся связей < 8 .

На основании значений расчетов *in silico* была создана первичная библиотека, включающая 57 производных VX-SI001 (Приложение Б). После анализа рассчитанных *in silico* физико-химических характеристик и сопоставления с литературными данными, была отобрана и синтезирована 21 наиболее перспективная модификация вещества VX-SI001. В структуру VX-SI001 вводился дополнительный атом фтора (в положение 6 индольного кольца), применялись различные нитросодержащие заместители триазенового фрагмента, вводился дополнительный атом азота в индольное кольцо, проводилось метилирование индольного азота.

Были отброшены структуры, синтез которых был затруднен, а также большинство структур, для которых коэффициент распределения $\log P$ значительно превышал 4, так как

для них предполагалась низкая растворимость. Структуры вещества BX-SI001 и 21 синтезированной модификации представлены на Рисунке 39.

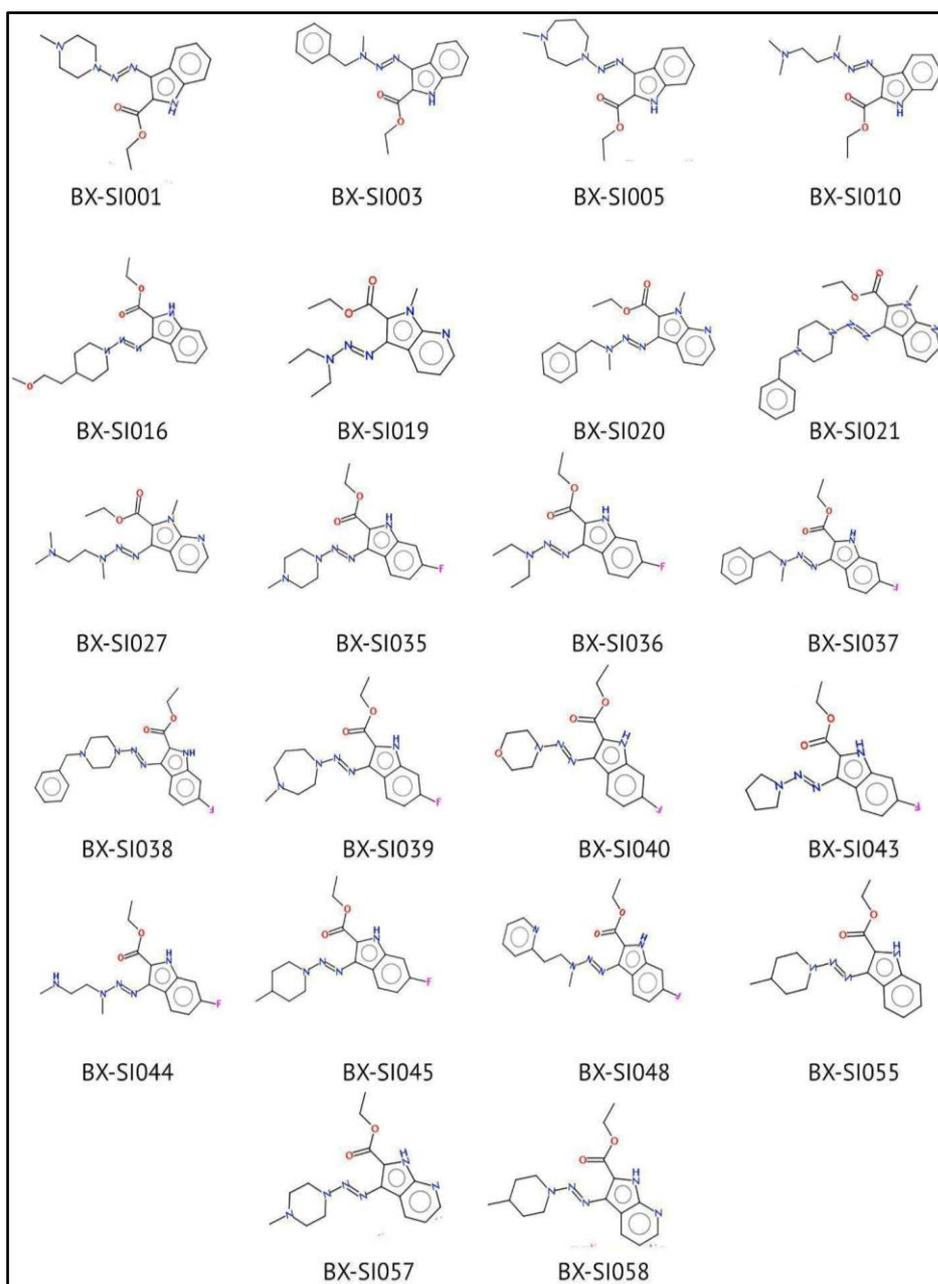


Рисунок 39 - Структура BX-SI001 и синтезированных модификаций.

Синтезированные соединения относились к трем основным группам: замещенные триазеноиндолы, замещенные 6-фтор-3-триазеноиндолы и замещенные 3-триазен-пирроло [2,3] пиридины. В качестве заместителей у триазеновой группы выступали различные циклические и ациклические вторичные амины. Каждое вещество было синтезировано в количестве 10 мг. Оценка растворимости синтезированных соединений в воде показала хорошую корреляцию с данными анализа *in silico*.

Для широкого спектра производных триазеноиндола был разработан простой двухстадийный синтез с использованием четырех соединений-предшественников.

Оценка химических структур проводилась методами масс-спектрометрии и протонного магнитного резонанса. Схемы синтезов представлены на Рисунках 18,19,20,21. Растворимость каждого синтезированного соединения в воде была проверена с помощью ВЭЖХ. Значения растворимости производных ВХ-SI001 варьировало от 0,00001 до 0,9 г/л (Приложение В).

После измерения растворимости ВХ-SI001 и его производных, было проведено определение активности и токсичности *in vitro*.

5.4 Определение антимикробной активности и цитотоксичности оригинального соединения ВХ-SI001 и его модификаций

Антимикробную активность вещества ВХ-SI001 и его модификаций изучали на панели 8 клинических изолятов MRSA с наиболее полным профилем резистентности к существующим антибиотикам. Профиль резистентности клинических изолятов представлен в Таблице 29.

Таблица 29 - Профиль устойчивости тестовых MRSA штаммов к антибактериальным препаратам.

Штамм	Профиль резистентности					
	Ц	К	Э	Г	Тг	Тт
2	S	R	R	R	R	R
7	S	R	R	R	S	R
8	R	S	R	R	R	R
9	S	S	R	R	R	R
13	R	S	S	R	R	R
21	R	R	R	S	S	R
48	R	R	R	R	S	R
50	R	R	R	R	S	R

*Обозначения в таблице: R - устойчив; S - чувствителен. Ц - Цефотаксим, К - Клиндамицин, Э - Эритромицин, Г - Гентамицин, Тг - Тигециклин, Тт - Тетрациклин.

Результаты определения антибактериальной активности 6 наиболее активных соединений приведены в Таблице 30. Для этих модификаций значения МИК (Минимальная Ингибирующая Концентрация) было в 2-4 раза ниже, чем у исходной молекулы ВХ-SI001. Ванкомицин и линезолид приведены в качестве контрольных соединений.

Таблица 30 - Антимикробная активность (МИК) вещества VX-SI001 и его модификаций.

Соединение	МИК, мг/л							
	2	7	8	9	13	21	48	50
VX-SI001	1	1	1	1	1	1	1	1
VX-SI035	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
VX-SI039	1	1	1	1	1	0,5	1	0,5
VX-SI043	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
VX-SI044	0,5	1	0,5	0,5	1	0,25	0,5	0,5
VX-SI045	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
VX-SI048	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5
Ванкомицин	2	2	2	2	2	2	2	2
Линезолид	2	2	2	2	2	2	2	2

Все 6 соединений относятся к группе замещенных 6-фтор-3-триазеноиндолов и подавляют рост резистентных штаммов золотистого стафилококка эффективнее по сравнению с применяемыми в клинике препаратами: ванкомицином и линезолидом (Рисунок 40). Структуры данных веществ были выбраны для включения в патентную заявку (Патент RU2712265C1.2020).

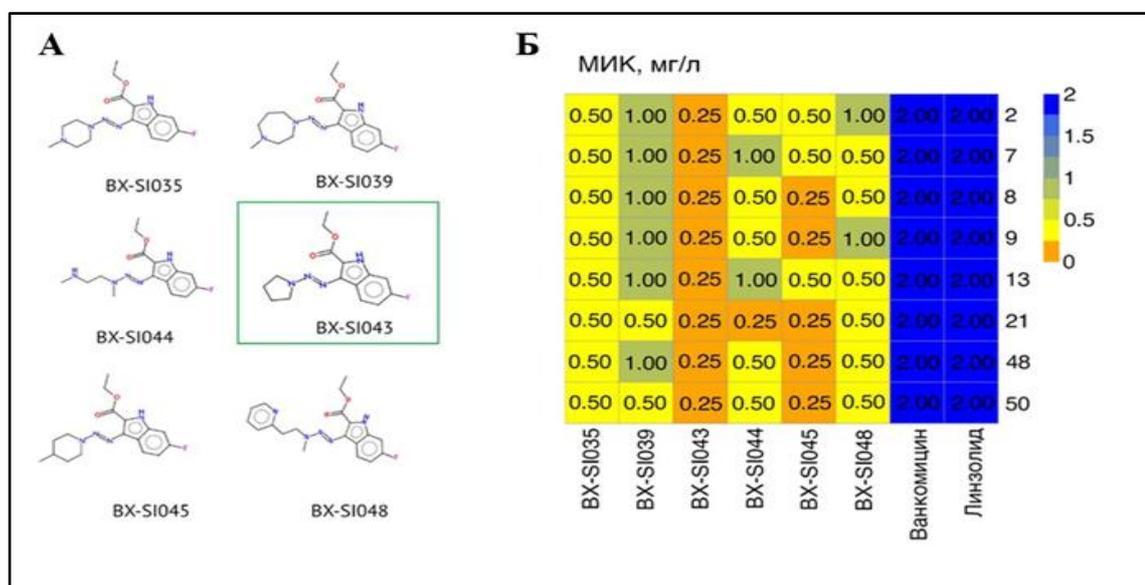


Рисунок 40 - А - Структурные формулы и Б - значения МИК наиболее активных модификаций VX-SI001.

В качестве лидирующего кандидата было выбрано соединение VX-SI043, поскольку для него значения МИК для восьми клинических изолятов MRSA составляли 0,25 мг/л.

Антимикробное действие вещества ВХ-SI043 было дополнительно изучено на расширенной панели, состоящей из 41 клинического изолята MRSA (Приложение Г). Штаммы были получены от НИИ «Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии», г. Смоленск. В качестве контроля профиля резистентности использовали эритромицин.

Было установлено, что почти для всех клинических изолятов значения МИК для вещества ВХ-SI043 были ниже в 2-4 раза в сравнении со значениями МИК вещества ВХ-SI001 и составляли 0,125-0,5 мг/л (Таблица 31).

Таблица 31 - Сравнение антимикробной активности веществ ВХ-SI001 и ВХ-SI043.

№ штамма MRSA	МИК (мг/л)		№ штамма MRSA	МИК (мг/л)	
	ВХ-SI001	ВХ-SI043		ВХ-SI001	ВХ-SI043
1	0,5	0,25	22	0,5	0,25
2	>0,5	0,5	23	>0,5	0,5
3	>0,5	0,5	24	>0,5	0,5
4	>0,5	0,5	25	>0,5	0,5
5	0,5	0,25	26	>0,5	0,5
6	0,5	0,5	27	>0,5	0,5
7	>0,5	0,5	28	>0,5	0,125
8	>0,5	0,25	29	>0,5	0,5
9	>0,5	0,5	30	>0,5	0,25
10	>0,5	0,25	31	>0,5	0,5
12	>0,5	0,25	32	>0,5	0,25
13	>0,5	0,5	33	>0,5	0,5
14	>0,5	0,25	34	>0,5	0,5
15	>0,5	0,25	35	>0,5	0,5
16	0,5	0,25	36	>0,5	0,5
17	>0,5	0,5	37	>0,5	0,5
18	>0,5	0,5	38	>0,5	0,5
19	>0,5	0,5	39	>0,5	0,25
20	>0,5	0,5	40	>0,5	0,5
21	>0,5	0,5	41	>0,5	0,5

Параллельно с исследованием антимикробной активности 21 модификации вещества ВХ-SI001 проводилась оценка их *in vitro* токсичности на клеточных линиях фибробластов и гепатоцитов. Влияние ВХ-SI001 и его производных на жизнеспособность клеток исследовали с помощью МТТ теста, позволяющего оценивать суммарную активность дыхательных ферментов митохондрий. Этот тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-4,5-диметилтиазол-2-

ил-2,5-дифенилтетразола бромид - МТТ-реагента до голубого кристаллического формазана. Данный метод широко распространен для изучения токсического действия различных соединений на клетки, в том числе и на этапе скрининга веществ-прототипов лекарственных препаратов.

Цитотоксичность исследовали на модели двух клеточных линий - эмбриональных фибробластах HEF (Human Embryonic Fibroblast) и гепатоцитах HepG2 с помощью МТТ-теста. Концентрации полумаксимального ингибирования IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50) для шести наиболее активных против MRSA модификаций BX-SI001 приведены в Таблице 32, Приложение Д, Е. Цитотоксичность наиболее активных против MRSA производных была сопоставима с исходной молекулой.

Таблица 32 - Цитотоксичность и индекс селективности BX-SI001 и его модификаций.

Вещество	C ₅₀ , мг/л		Индекс селективности
	HEF	HepG2	
BX-SI001	19	22	19
BX-SI035	20	21	41
BX-SI039	19	16	20
BX-SI043	19	19	76
BX-SI044	19	13	27
BX-SI045	29	22	74
BX-SI048	13	22	28

Цитотоксичность наиболее активных против MRSA производных была сопоставима с исходной молекулой. На основании полученных данных для каждого соединения был рассчитан индекс селективности, равный отношению средних значений IC₅₀ к средним значениям МИК. Наибольшей селективностью (76) обладало вещество BX-SI043 (Таблица 32).

5.5 Определение фармакокинетических свойств вещества BX-SI043

Соединение BX-SI043 было наработано в количестве 18 г и отправлено на ADME исследования и изучение острой токсичности *in vivo* на модельных животных.

В рамках определения фармакокинетических свойств было проведено:

- 1) Исследование стабильности в микросомах печени (крыс, человека) в присутствии кофактора окислительных ферментов НАДФН;
 - 2) Исследование стабильности в желудочном и кишечном соке и в плазме крови (крысы, человека);
 - 3) Изучение способности соединения ВХ-SI043 ингибировать основные изоформы цитохрома СYP450 печени человека (6 изоформ: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2C8 и 3A4);
 - 4) Исследование стабильности соединения ВХ-SI043 в плазме крови и связывания с белками плазмы (крыс, человека);
 - 5) Определение проницаемости и активного транспорта на модели Сасо-2/Pgp (с участием Pgp в клетках кишечника линии Сасо-2);
 - 6) Исследование потенциальной кардиотоксичности.
- Анализ биообразцов, получаемых в ходе данных исследований, кроме кардиотоксичности, проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с МС/МС детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

5.5.1 Исследование стабильности субстанции ВХ-SI043 в микросомах печени (крыс и человека)

Биодоступность лекарственного препарата при пероральном применении во многом зависит от его метаболической стабильности в среде желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также при первом прохождении препарата через печень. Для оценки скорости метаболизма препарата в печени используются микросомы - субклеточная фракция печени, содержащая основные метаболические ферменты, такие как цитохромы Р450, флавиномонооксигеназы, УДФ - глюкоуронозил трансферазы, карбоксиэстеразы, гидролазы и другие. Доступность микросом, получаемых из печени различных видов млекопитающих, делает их одним из широко используемых средств для оценки метаболизма новых химических соединений (предсказание возможных метаболитов, идентификация цитохромов, отвечающих за метаболизм исследуемого препарата).

Метаболизм субстанции изучали в микросомальной фракции печени человека и крыс в присутствии кофактора окислительных ферментов НАДФН.

В результате исследования было установлено, что субстанция ВХ-SI043 быстро подвергается метаболизму в микросомальной фракции печени человека и крыс, с периодом полураспада 2,7 и 1,3 мин, соответственно (Таблица 33).

Таблица 33 - Стабильность субстанции VX-SI043 и контрольного соединения в микросомальной фракции печени человека и крыс

Вещество	Микросомы человека			Микросомы крысы		
	$t_{1/2}$, мин	C_{int} , мкл/мин/мг белка	Остаток через 30 мин, %	$t_{1/2}$, мин	C_{int} , мкл/мин/мг белка	Остаток через 30 мин, %
VX-SI043	2,73	1015	0,00	1,30	2138	0,00
Верапамил	29,9	92,8	50,7	14,0	199	23,2

5.5.2 Исследование стабильности субстанции VX-SI043 в желудочном и кишечном соках

Для тестирования препарата на стабильность в ЖКТ применяются искусственные желудочный и кишечный соки. Модельная система, имитирующая желудочный сок, состояла из 0,2 % NaCl в 0,7 % HCl. Данная композиция раствора позволила воспроизвести электролитный состав среды желудка с pH 1,2, характерный для голодного состояния. Кишечный сок имитировал калий-фосфатный буфер с pH 6,8. Для расчетов использовали нормированные на площадь внутреннего стандарта значения площадей хроматографических пиков веществ в исследуемых образцах.

Исследования стабильности в искусственном кишечном и желудочном соке показали, что соединение VX-SI043 нестабильно в кислой среде (желудочном соке, pH 1,2) - $t_{1/2} < 10$ мин, и подвергается метаболизму на 90 % за 4 часа в нейтральной среде (кишечном соке, pH 6,8) - $t_{1/2} = 1$ час (Таблица 34,35; Приложение Ж).

Таблица 34 - Стабильность VX-SI043 и контрольной субстанции в искусственном желудочном соке.

Вещество	Время, ч	Содержание, % от начального		
		Среднее (n=2)	SD	CV, %
VX-SI043	0,25	0,00	0,00	0,00
	0,5	0,00	0,00	0,00
	1	0,00	0,00	0,00
	4	0,00	0,00	0,00
Хлорамбуцил	0,25	105	1,23	1,17

	0,5	93,4	0,57	0,61
	1	100	0,12	0,12
	4	91,1	0,72	0,79

Таблица 35 - Стабильность ВХ-SI043 и контрольной субстанции в искусственном кишечном соке.

Вещество	Время, ч	Содержание, % от начального		
		Среднее (n=2)	SD	CV, %
ВХ-SI043	0,25	84,5	1,95	2,31
	0,5	76,4	0,64	0,84
	1	57,5	1,27	2,22
	4	8,82	0,61	6,94
Хлорамбуцил	0,25	78,9	0,49	0,62
	0,5	49,1	3,03	6,17
	1	23,8	0,47	1,95
	4	0,42	0,09	21,5

Предположительно тестируемое вещество разрушалось в кислой среде по следующей схеме (Рисунок 41).

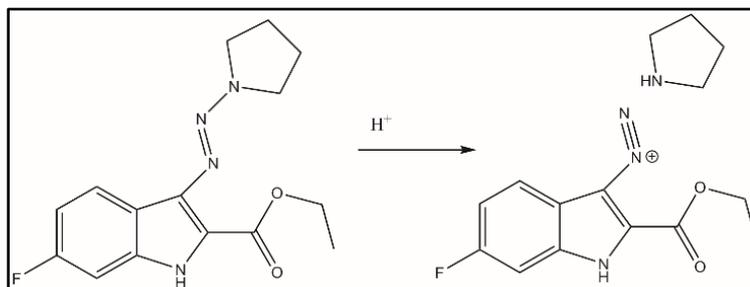


Рисунок 41 - Предположительная схема матаболизма ВХ-SI043 в кислой среде.

5.5.3 Изучение способности субстанции ВХ-SI043 ингибировать основные изоформы цитохрома СYP450 печени человека

Знание особенностей метаболизма лекарственного средства определенными изоформами системы цитохрома Р450 является необходимым при прогнозировании возможных нежелательных явлений, вызванных лекарственным взаимодействием.

Было изучено влияние субстанции ВХ-SI043 на активность основных изоформ микросомального цитохрома Р450 печени человека (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 2C8). В качестве контроля применяли известные специфические ингибиторы: альфа-нафтофлавон,

сульфафеназол, флувоксамин, хинидин, кверцетин, кетоконазол. Полученные результаты показали, что соединение ВХ в концентрациях до 10 мкМ не ингибирует перечисленные изоформы СYP450. Данные для контрольных ингибиторов приведены в Таблице 36, Приложение 3.

Таблица 36 - Влияние субстанции ВХ-SI043 на цитохромы микросомального P450 печени человека.

Изоформы цитохромов	1A2	2C19	3A4-M	3A4-T	2C9	2C8	2D6
Ингибиторы	α -нафтофлавон	Флувоксамин	Кетоконазол		Сульфафеназол	Кверцетин	Хинидин
IC ₅₀ , мкМ	0,011	0,37	0,07	0,04	0,546	2,604	0,285
ВХ-SI043, IC ₅₀ , мкМ	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и

*н/и - нет ингибирования

5.5.4 Исследование стабильности ВХ-SI043 в плазме крови и связывания с белками плазмы (крыс, человека)

Метаболическая активность ферментов плазмы крови в отношении лекарственного препарата влияет на его фармакокинетику. Кроме того, степень связывания соединения с белками плазмы крови критическим образом влияет на объем распределения, клиренс и время полужизни исследуемого препарата (Wanat, K. 2020). Так, соединения с высокими значениями связывания в меньшей степени депонируются в органах, не подвержены интенсивному метаболизму, однако в этом случае необходимо вводить большие дозы лекарственного средства, возрастает вероятность токсических эффектов. С другой стороны, низкие значения связывания соответствуют большим концентрациям свободного вещества, однако такие препараты в большей степени подвержены системному метаболизму в основном цитохромами печени, что в большинстве случаев приводит к снижению времени полезной экспозиции рецептора и необходимости более частого применения препарата.

Исследования стабильности в плазме крови человека и крыс показали, что субстанция ВХ-SI043 метаболизируется в плазме человека на 97 % за 4 ч инкубации и 1,7 % субстанции остается через 15 мин инкубации в плазме крови крыс (Таблица 37,38 и Приложение И). В качестве контрольного соединения использовали эукатропин, нестабильный в плазме крови человека.

Таблица 37 - Стабильность VX-SI043 и контрольной субстанций в плазме крови человека.

Вещество	Время, ч	Содержание, % от начального		
		Среднее (n=2)	SD	CV, %
VX-SI043	0,25	85,9	0,15	0,18
	0,5	73,7	1,29	1,75
	1	53,5	3,71	6,93
	4	3,38	0,22	6,55
Эукатропин	0,25	29,5	0,17	0,59
	0,5	17,9	1,13	6,31
	1	7,49	0,45	6,06
	4	0,07	0,02	25,7

Таблица 38 - Стабильность VX-SI043 и контрольной субстанций в плазме крови крыс.

Вещество	Время, ч	Содержание, % от начального		
		Среднее (n=2)	SD	CV, %
VX-SI043	0,25	1,69	0,02	1,25
	0,5	0,04	0,00	7,61
	1	0,00	0,00	36,6
	4	0,00	0,00	44,9
Эукатропин	0,25	105	2,77	2,63
	0,5	100	0,47	0,47
	1	96,4	4,30	4,46
	4	79,8	5,11	6,41

Связывание субстанции VX-SI043 с белками плазмы крови человека и крыс изучали с помощью равновесного диализа. Субстанция VX-SI043 нестабильна в плазме крови, процент связывания с белками плазмы крови для нее не может быть корректно определен (Таблица 39).

В качестве контрольного соединения использовали антикоагулянт варфарин.

Таблица 39 - Связывание VX-SI043 и контрольной субстанций с белками плазмы крови человека.

Вещество	Проницаемость, %	Массовый баланс, %	% связывания с белками плазмы человека		% связывания с белками плазмы крыс	
			Среднее	SD	Среднее	SD
Варфарин	87,0	74,0	96,5	2,46	99,0	0,21
VX-SI043	86,5	6,08	н/о	н/о	н/о	н/о

*н/о - не определено

5.5.5 Определение проницаемости и активного транспорта субстанции VX-SI043 на модели Caco-2/Pgp

Для оценки проницаемости и абсорбции в ЖКТ, а также для изучения активного транспорта лекарственного кандидата успешно применяется тест-система Caco-2 (van Breemen, R. V. et al. 2005). Клетки эпителиальной аденокарциномы Caco-2 морфологически и функционально похожи на барьерный эпителий кишечника, а также экспрессируют ряд транспортеров, включая Р-гликопротеин (Pgp). Данные по проницаемости в клетках Caco-2 и связыванию с Pgp также используются для прогнозирования межлекарственного взаимодействия

В Таблице 40 приведены результаты по проницаемости субстанции VX-SI043, определенные на модели Caco-2. В качестве контрольных веществ параллельно тестировались ранитидин (низкая проницаемость), пропранолол (высокая проницаемость), родамин 123 (субстрат Pgp), циклоспорин А (ингибитор Pgp).

Таблица 40 - Проницаемость и асимметрия транспорта субстанции VX-SI043 и контрольных соединений на модели клеток Caco-2.

Вещество	P_{app} А-В, 10^{-6} см/с	SD (А-В)	P_{app} В-А, 10^{-6} см/с	SD (В-А)	Индекс асимметрии	Массовы й баланс
VX-SI043	0,51	0,03	0,19	0,01	0,37	49,0/25,1
Ранитидин	1,48	0,13	-*	-	-	96,0
Пропранолол	44,6	1,94	-*	-	-	91,7
Родамин 123	1,14	0,12	3,65	0,42	3,20	92,1/95,8
Родамин + циклоспорин А	0,89	0,07	0,97	0,12	1,09	91,5/84,6

* - не тестировалось, т.к. для этих веществ асимметрия транспорта не характерна.

Вещество VX-SI043 обладает низкой проницаемостью через клеточную мембрану в обоих направлениях - со стороны апикальной мембраны к базолатеральной мембране и наоборот ($P_{app} < 1 * 10^{-6}$ см/с). Также для VX-SI043 характерно низкое значение массового баланса, вероятней всего по причине нестабильности в клеточной среде.

5.5.6 Исследование потенциальной кардиотоксичности субстанции ВХ-SI043

hERG - потенциал-зависимый калиевый канал, блокировка которого приводит к нарушению реполяризации миокарда, увеличению продолжительности QT интервала и желудочковой тахикардии. Разработанные *in vitro* тест-системы для изучения калиевых каналов позволяют провести предварительную оценку кардиотоксичности фармацевтических субстанций.

Для исследуемой субстанции ВХ-SI043, либо ее метаболитов, характерно слабое ингибирование hERG-зависимых калиевых каналов на 33 % при значении IC_{50} более 50 мкМ. Полученное значение $IC_{50} = 39,3$ нМ для E-4031 соответствует спецификации тест-системы (Приложение К).

5.6 Исследование острой токсичности соединения ВХ-SI043 *in vivo*

На следующем этапе исследовали острую токсичность лидирующего кандидата ВХ-SI043 *in vivo* при внутрижелудочном введении. Работу проводили совместно с ООО «Институт доклинических исследований». В качестве тестовых организмов брали половозрелых самцов и самок аутбредных крыс. Такие животные успешно используются в токсикологических экспериментах и имеют достаточную массу и площадь поверхности тела с точки зрения возможности введения такого количества исследуемых веществ, которое является необходимым для регистрации токсических эффектов. Планирование и проведение всей работы осуществлялось в строгом соответствии с требованиями МЗ РФ и международными стандартами в области доклинических исследований безопасности новых фармакологических средств - системы GLP (Good Laboratory Practice) (ГОСТ 33044-2014. 2014), (Guidance for Industry M4S: The CTD - Safety. 2001). Исследование соответствовало требованиям нормативных документов и входило в комплекс доклинических исследований продукта, необходимых для осуществления регистрационных действий с препаратом на территории Российской Федерации и в рамках ЕАЭС (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. 2012), (ГОСТ Р 56701-2015. 2016), (Решение Совета Евразийской экономической комиссии. 2016).

Внутрижелудочное введение лекарственных препаратов крысам часто используется для моделирования перорального применения у людей, поскольку ранее была показана

высокая корреляция получаемых результатов (Harloff-Helleberg, S. et al. 2017). Животных поделили на группы: 1 группа - контроль (4 самца + 4 самки); 2-10 группы - тестируемая субстанция (6 самцов + 6 самок в каждой группе). Возраст животных к началу эксперимента составлял 8-12 недель, а их масса тела не отклонялась от среднего по всем группам больше чем на 20 %. Самки не были беременными или рожавшими. Общий дизайн эксперимента представлен в Таблице 41.

Таблица 41 - Схема эксперимента по определению острой токсичности вещества VX-SI043.

Манипуляции	Дни эксперимента, начиная с дня введения препарата														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Взвешивание															
Внутрижелудочное введение препарата															
Клинический осмотр															
Клиническое наблюдение															
Регистрация потребления корма и воды															
Оценка индивидуального поведения															
Эвтаназия животных															

Эксперимент был проведен поэтапно, поиск летальных доз субстанции был инициирован с введения дозы 300 мг/кг (группа № 2). В течение первых 24-х ч после введения тестируемой субстанции (1-й и 2-й дни исследования) гибель животных отсутствовала. Далее для установления летальных доз была введена доза 2000 мг/кг. Гибель животных была отсроченной, первые летальные исходы зарегистрированы на 3-ий день эксперимента. Далее были введены дозы 1000 мг/кг и 600 мг/кг.

Расчет ЛД50 не производили, поскольку не было достигнуто условие, при котором при введении, как минимум, трех из запланированных доз летальность была в пределах: $0\% \leq \text{летальность} \leq 100\%$. Доза 2000 мг/кг, согласно плану исследования и регламентирующим документам, является лимитирующей при определении параметров острой токсичности в эксперименте (Таблица 42).

Таблица 42 - Летальные эффекты (пало/всего) после внутрижелудочного введения крысам тестируемого вещества VX-SI043.

Группы	№1	№2	№5	№4	№3
Доза, мг/кг	0	300	600	1000	2000
Контрольная группа, самцы	0/4	-			

Контрольная группа, самки	0/4	-			
Тестируемая субстанция, самцы	-	0/6	0/6	1/6	3/6
Тестируемая субстанция, самки	-	0/6	0/6	1/6	1/6

Гибель животных и признаки интоксикации фиксировали с 3-го по 8-й дни эксперимента. У животных, получивших тестируемую субстанцию в дозах 1000 и 2000 мг/кг, отмечали угнетение поведения, изменение реакции на раздражители. В группе, получившей тестируемую субстанцию в дозе 2000 мг/кг, также наблюдали взъерошенность шерсти и выделения из носа. Начиная с 9-го дня эксперимента, состояние и внешний вид животных, получивших тестируемую субстанцию, не отличалось от состояния контрольной группы.

Масса тела животных до начала эксперимента не различалась между группами. Влияния субстанции на массу тела животных не выявлено.

Тестируемая субстанция снизила потребление корма животными, получившими тестируемую субстанцию в дозах 1000 и 2000 мг/кг на второй день эксперимента. Тестируемая субстанция не оказала влияния на потребление воды экспериментальными животными.

Отсроченного влияния тестируемой субстанции на индивидуальное поведение экспериментальных животных не обнаружено.

Влияния внутрижелудочного введения тестируемой субстанции на массовые коэффициенты органов животных не установлено.

При проведении плановой некропсии выявлены патологические изменения в желудке у животных, получивших субстанцию в дозах 600, 1000 и 2000 мг/кг. В ряде случаев обнаружено ороговение эпителия безжелезистой части желудка. Других отклонений при плановой некропсии не обнаружено.

У павших животных в группах, получивших субстанцию в дозе 1000 и 2000 мг/кг, также отмечено патологическое ороговение эпителия безжелезистой части желудка с пропитыванием кровью пораженных участков, гиперемия слизистой оболочки, а также примесь крови в содержимом кишечника. В группе, получившей субстанцию в дозе 2000 мг/кг, в одном случае выявлены эрозивные поражения слизистой оболочки желудка. Полученные результаты свидетельствуют о наличии местно-раздражающего действия у тестируемой субстанции.

Таким образом, по результатам исследования была установлена максимально переносимая (МПД) доза тестируемой субстанции, которая составила 600 мг/кг.

По параметрам острой токсичности тестируемую субстанцию можно отнести к 3-му классу умеренно опасных веществ по ГОСТ 12.1.007-76 (151 мг/кг <ЛД50 (в/ж) <5000 мг/кг).

Все синтезированные производные триазенеиндола проявляли выраженную антимикробную активность против широкой панели штаммов MRSA с множественной лекарственной устойчивостью. При этом МИК соединения BX-SI043 был от 4 до 8 раз ниже, чем МИК ванкомицина и линезолида.

Был разработан относительно простой механизм синтеза широкой линейки производных триазениндола. Было показано, что биологическая активность триазеноиндолов может быть изменена за счет введения различных функциональных групп.

Наиболее активные производные соединения BX-SI001 содержали атомы фтора (в положение 6 индольного кольца), в связи с чем Препарат 3 (Рисунок 38) может рассматриваться как основа для синтеза будущих библиотек антимикробных соединений.

Ранее было показано, что антимикробная активность фторхинолонов связана с ингибированием ДНК-гиразы бактерий (Liu, H. et al. 2020), (Hu, Y. et al. 2020). При этом, фторирование хинолонов значительно увеличивало прочность связывания с ДНК-гиразой (Shah, P. et al. 2007), (Domagala, J. M. et al. 1986), (Wright, D. H. et al. 2000). Исходя из полученных результатов, а также некотором структурном сходстве индолов и хинолонов, можно предположить, что фторированные триазениндолы и фторхинолоны имеют одну и ту же внутриклеточную мишень.

В тоже время синтезированные в работе соединения были эффективны против штаммов, устойчивых к фторхинолонам. Наблюдаемый эффект может быть связан с диазонием - продуктом распада триазеноиндола в кислой среде. Данное соединение было обнаружено в экспериментах по стабильности BX-SI043 в желудочном соке.

В ранних экспериментах было показано, что триазены обладают противоопухолевой, противогрибковой и антимикробной активностями. В основе этих биологических эффектов лежит способность метаболитов триазена, в частности диазония, ингибировать синтез ДНК (Figueirêdo, P. de M. S. et al. 2021), (Vajs, J. et al. 2017).

Можно предположить, что антимикробная активность триазеноиндолов опосредована как триазеновым, так и на индольным фрагментами.

Для соединения BX-SI043 показан высокий индекс селективности - 76 и хороший токсикологический профиль *in vitro* и *in vivo*. Вещество относительно хорошо переносилось животными. Видимые признаки интоксикации и смерть наступали только при дозах выше 1000 мг/кг. В работе показано, что BX-SI043 оказывало местно-раздражающее действие при

концентрациях выше 600 мг/кг, однако, эти концентрации не оказывали дополнительных пагубных эффектов на животных, поэтому они были определены как максимально переносимая доза.

Фармакокинетические свойства BX-SI043, без дополнительных модификаций молекулы, делают соединение плохо применимым для перорального введения, несмотря на относительно низкую токсичность при внутрижелудочном введении.

Кроме того, исследования показали, что в случае ОБИККС эффективность препаратов местного действия выше, чем у системных антибиотиков.

В целом, топическая форма BX-SI043 может иметь ряд преимуществ. Во-первых, в такой форме активное вещество будет стабильно. Во-вторых, наиболее распространенные топические препараты против MRSA, такие как фузидиевая кислота, мупироцин и ретапамулин, не эффективны против ряда резистентных штаммов. В-третьих, учитывая выраженную противогрибковую активность триазеноиндолов, соединение BX-SI043 может стать новым препаратом для лечения различных кожных инфекций.

Исследования эффективности соединения BX-SI043 на модели крыс с ОБИККС, вызванной MRSA, при топическом пути введения может стать следующим этапом развития данной работы. Кроме того, важнейшее значения в последующих исследованиях будет иметь определение конкретного механизма, лежащего в основе бактерицидного эффекта соединения BX-SI043.

Изучение микроорганизмов, ассоциированных с водорослями, позволило обнаружить более 400 новых биологически активных молекул. Как правило, речь идет о низших грибах, являющихся сателлитами морских макроводорослей, таких как красные, бурые и зеленые водоросли (Xiong, Z. et al. 2023). Среди грибов, ассоциированных с макроводорослями, были идентифицированы актиномицеты 11 семейств и 22-х родов. Показано, что такие морские грибы могут быть источником множества природных соединений, обладающих широким спектром активностей: цитотоксины, антиоксиданты, антибиотики, противовирусные и противоопухолевые молекулы (Ghazawi, K. F., et al. 2023). Только за период с 2015 по 2019 годы более 35 новых антимикробных алкалоидов было выделено из морских грибов (Willems, T. et al. 2020). Среди них соединения, обладающие активностью против грамм-положительных и грамма-отрицательных бактерий. Несколько соединений продемонстрировали высокую противогрибковую активность (Jin, L. et al. 2016), (Liu, Z. et al. 2020), (Xu, K. et al. 2020).

Изучение структуры антимикробных алкалоидов морских грибов позволило выделить следующие группы соединений: пирролидины, пирролизидины, индолы, хиназолины, хинолины, дикетопиперазины и пурины (Willems, T. et al. 2020).

Преимущественно это высокомолекулярные соединения, внедрение которых в клиническую практику в качестве антимикробных препаратов маловероятно (Правило Липински, также известное как правило пяти). Молекулярная масса коммерчески успешных антибиотиков, как правило, не превышает пятисот (Altman, S. 2014).

Проблема создания препаратов на основе природных высокомолекулярных соединений заключается в том, что их зачастую невозможно получить синтетическим путем *de novo*. При этом биотехнологический и полусинтетический способ получения не всегда является экономически целесообразным. Кроме того, оптимизация физико-химических свойств высокомолекулярных алкалоидов значительно сложнее.

Несмотря на высокое разнообразие идентифицируемых антимикробных алкалоидов морских актиномицетов, их МИК в отношении социально-значимых резистентных бактерий, как правило, ниже чем у антибиотиков, применяющихся в клинической практике (Willems, T. et al. 2020). Это дополнительно обращает внимание на важность оптимизации свойств выделяемых оригинальных молекулы. В данной работе была показана принципиальная возможность синтеза природного тразеноиндола *de novo*, с последующим созданием библиотеки химических производных, одно из которых имело более высокую активность и селективность.

Выводы по разделу

Был разработан механизм синтеза *de novo* природного триазеноиндола (BX-SI001). С целью оптимизации физико-химических свойств исходной молекулы BX-SI001 была создана библиотека 21 модификации. Активность и селективность лидирующего кандидата BX-SI043 была в 4 раза выше исходной молекулы. Для BX-SI043 были проведены *in vitro* ADME исследования и определена острая токсичность в экспериментах на модельных животных при внутрижелудочном способе введения. Максимально переносимая концентрация для BX-SI043 при внутрижелудочном способе введения крысам составила 600 мг/кг, что позволяет отнести соединение к веществам третьего класса опасности.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ШИРОКОМАСШТАБНОГО СКРИНИНГА *IN SILICO* ЭКСТРАКТОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

6.1 Проблема существующих подходов к поиску новых противоопухолевых молекул из фотосинтезирующих микроорганизмов

Согласно данным ВОЗ в 2023 г. во всем мире было зарегистрировано 20 млн новых случаев рака и 9,7 млн случаев смерти от онкологических заболеваний. В России онкологические заболевания уносят более 300 тысяч человек в год, рак диагностируется более чем у 600 тысяч граждан РФ ежегодно (Cancer today. URL: <https://gco.iarc.fr/today/en>). Несмотря на развитие и совершенствование традиционных подходов к лечению онкологических заболеваний, проблема лечения большинства форм рака остается чрезвычайно актуальной и весьма далекой от решения.

Микроводоросли представляют собой многообещающий источник противоопухолевых веществ. Исследования показывают, что такие компоненты, как альгинаты, фукоидан, зостерин и уникальные сульфатированные полисахариды и пептиды, содержащиеся в микроводорослях, обладают активностью против опухолей (Galasso, C. et al. 2019). Водные экстракты различных морских микроводорослей продемонстрировали цитостатическую активность по отношению к клеточным линиям рака человека, включая рак легкого, простаты, желудка, молочной и поджелудочной железы (Somasekharan, S. P. et al. 2016). Противоопухолевые свойства различных неочищенных экстрактов микроводорослей были описаны в экспериментах *in vitro* для целого ряда штаммов (Jabeen, A. et al., 2017).

Большинство исследователей при поиске оригинальных биологически активных соединений придерживаются следующего подхода: 1) сбор биомассы или культуральной жидкости; 2) экстракция согласно протоколам, соответствующим химической природе изучаемого соединения; 3) тестирование экстрактов *in vitro* в различных модельных системах; 4) очистка и описание структуры индивидуальной молекулы (препаративная и высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, ЯМР и др.)

Такой подход имеет ряд существенных ограничений, из-за чего значительная часть исследований ограничивается предварительной оценкой/описанием биологической активности. Чаще всего фиксируются свойства неочищенного экстракта, реже - фракции и в исключительных случаях - отдельной молекулы (Savio, S. et al. 2021).

Идентификация конкретной молекулы, ответственной за тот или иной биологический эффект, может быть затруднена в связи с ее химической нестабильностью вне экстракта. Отдельно стоит проблема комплексных тест-систем, позволяющих фиксировать не одну, а несколько биологических активностей (к примеру, антиоксидативную и антимикробную).

В основе тест-систем должна быть заложена возможность дискриминационного анализа: необходимо фиксировать не только биологический эффект, но и его селективность (например, в зависимости от типа клеточной линии).

Кроме того, изучение конкретного механизма действия выделенной молекулы на ранних стадиях имеет значение не только для адекватной оценки ее потенциала, но и для выявления возможных терапевтических мишеней.

Текущая организация процесса исследований и разработок приводит к тому, что терапевтический и рыночный потенциал нового соединения определяется только на поздних стадиях, что несет дополнительный временные и финансовые риски.

Для расширения использования микроводорослей в качестве платформы для разработки лекарственных препаратов нужны новые подходы, позволяющие вероятностно оценить наличие молекул с интересующей биологической активностью. Такого рода данные на предварительных этапах позволят существенно снизить риски практически любой фармацевтической разработки (Savio, S. et al. 2021).

6.2 Технология Онкобокс

В целях оптимизации поиска биологически активных веществ из микроводорослей была использована технология Онкобокс (Патент WO2019168426A1. 2019), позволяющая эффективно оценивать клиническую эффективность существующих таргетных лекарственных средств для индивидуального пациента с пролиферативным или онкологическим заболеванием. В основе подхода лежит использование широкого спектра экспериментальных данных, получаемых из образцов патологических тканей пациентов и соответствующих контрольных образцов: данные по генным мутациям, по профилю связывания транскрипционных факторов, по уровню экспрессии белков (с учетом гармонизации), мРНК (с учетом гармонизации) и микроРНК (Tkachev, V. et al. 2020), (Zolotovskaia, M. et al. 2020). Технология также использует информацию по молекулярным мишеням таргетных лекарственных средств (Sorokin, M. et al. 2018). Автоматизация

ключевых процессов позволяет учитывать изменения, характерные для конкретного пациента, в тысячах молекулярных путей, включающих десятки и сотни генных продуктов.

Используя результаты мультиомиксного профилирования, платформа Онкобокс вычисляет профили активации внутриклеточных сигнальных путей на основе интегрированной модели сигнала человека клетки, а затем оценивает потенциальную эффективность воздействия препаратов с известным спектром молекулярных мишеней на индивидуального больного (Tkachev, V. et al. 2020), (Zolotovskaia, M. et al. 2022) (Рисунок 42).

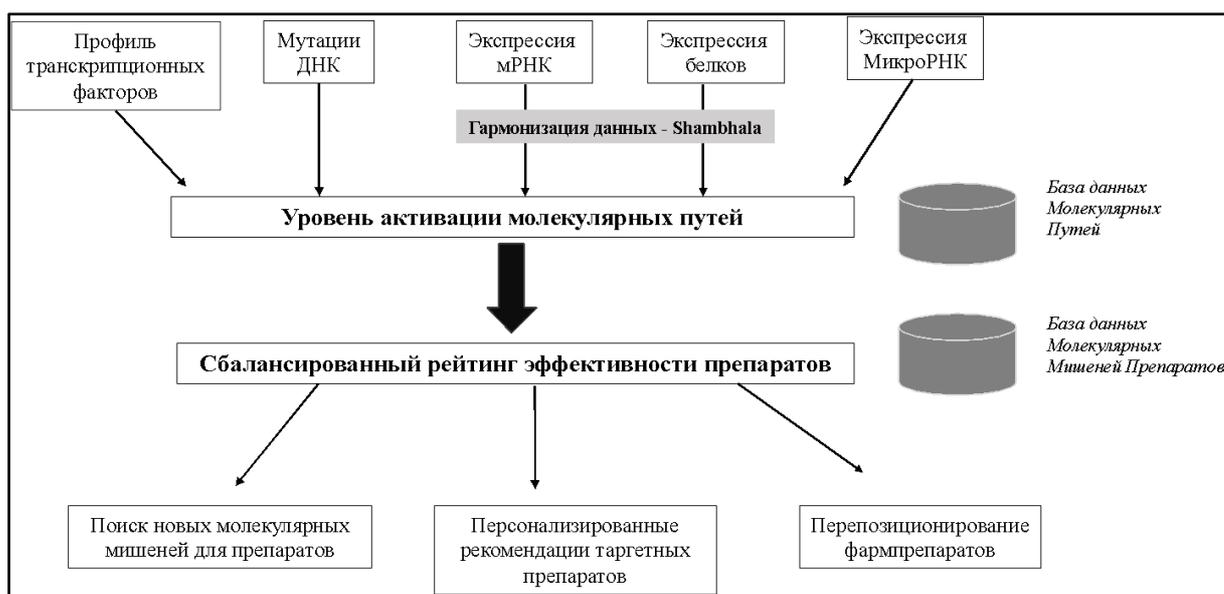


Рисунок 42 - Принципиальная схема технологии Онкобокс (Патент RU2741703С1. 2021)

Профили активации внутриклеточных сигнальных путей или PAL (Pathway Activation Level) (Sorokin, M. et al. 2021) позволяют оценивать совокупное влияние изменения генной экспрессии на состояние активации отдельных молекулярных путей. Отдельный ген зачастую может быть вовлечен во множество регуляторных механизмов, и его дифференциальная экспрессия не может однозначно свидетельствовать о том, какие процессы оказываются изменены в клетке (Buzdin, A. et al. 2018). В терминах PAL можно охарактеризовать любой сигнальный путь, при условии, что известны взаимоотношения между генами в этом пути.

Изначально технология Онкобокс создавалась для персонализированной терапии онкологических заболеваний. Анализируя активацию тех или иных сигнальных путей (внутриклеточных мишеней) в биообразце конкретного онкобольного, можно рекомендовать определенный набор противоопухолевых препаратов, способных дать

оптимальный эффект при терапии. Эффективность данной технологии была подтверждена в ряде исследований, включающих клинически аннотированные биообразцы, содержащие информацию по ответу на таргетные противоопухолевые препараты (Poddubskaya, E. et al. 2019), (Moisseev, A. et al. 2020).

6.3 Моделирование влияния экстрактов фотосинтезирующих микроорганизмов на жизнеспособность клеток опухолевой линии HL-60 на основе транскриптомных данных

Потенциал предиктивной аналитики данной технологии был валидирован в отношении противоопухолевой активности тотальных экстрактов биомассы микроводорослей. В качестве модели была выбрана клеточная линия HL-60 (острый промиелоцитарный лейкоз), АТСС. Изменения профилей активности отдельных генов в ответ на воздействия тысяч различных препаратов были детально каталогизированы в предварительных модельных экспериментах исследовательского консорциума Broad Institute (Subramanian, A. et al. 2017).

Для экспериментального тестирования была отобрана группа из 50 про- и эукариотических микроводорослей, относящихся к следующим 9 классам (Таблица 43) (Namsaraev, Z. et al. 2023).

Таблица 43 - Распределение изучаемых микроводорослей по классам.

Эукариотические микроводоросли	Число штаммов
Chlorophyceae	10
Zygnematomphyceae	6
Trebouxiophyceae	5
Bacillariophyceae	3
Xanthophyceae	2
Chrysophyceae	1
Eustigmatophyceae	1
Rhodophyceae	1
Прокариотические микроводоросли	Число штаммов
Суанoprokaryota	21

В качестве положительного контроля был выбран β -спилечный антимикробный пептид полифемузин III, выделенный из гемоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus*. Антимикробные пептиды (АМП) - компоненты системы врождённого иммунитета многих живых организмов. Они представляют собой небольшие биомолекулы, состоящие из остатков аминокислот, количество которых может варьировать от нескольких единиц до десятков. Противоопухолевая активность антимикробных пептидов обусловлена нарушением целостности мембраны раковых клеток. Внутримолекулярные мишени полифемузина III, запускающие некроз, были хорошо изучены ранее (Marggraf, M. V. et al. 2018).

Для оценки цитотоксического эффекта изучаемых экстрактов был проведен анализ числа активируемых генов и сигнальных путей, ассоциированных с клеточной гибелью (согласно литературным данным). Результаты показаны в Таблице 44.

Таблица 44 - Число активированных сигнальных путей, ассоциированных с клеточной гибелью, в зависимости от типа экстракта.

Название штамма	Число активированных молекулярных сигнальных путей
<i>Nostoc sp.</i>	25
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	6
<i>Nanochloropsis oculata</i>	5
<i>Closterium sp.</i>	1
<i>Cosmarium sp.</i>	1
Полифемузин III	3

Согласно данным, полученным при использовании технологии Онкобокс, только 5 из 50 экстрактов вызывали активацию хотя бы одного внутриклеточного сигнального пути, ассоциированного с клеточной гибелью. Можно предположить, что в этих экстрактах содержатся вещества, обладающие цитотоксическим эффектом в отношении клеточной опухолевой линии HL-60.

При этом наибольшую активность (25 активированных путей) при анализе транскриптомных данных проявлял экстракт цианобактерии рода *Nostoc sp.* (Рисунок 43).

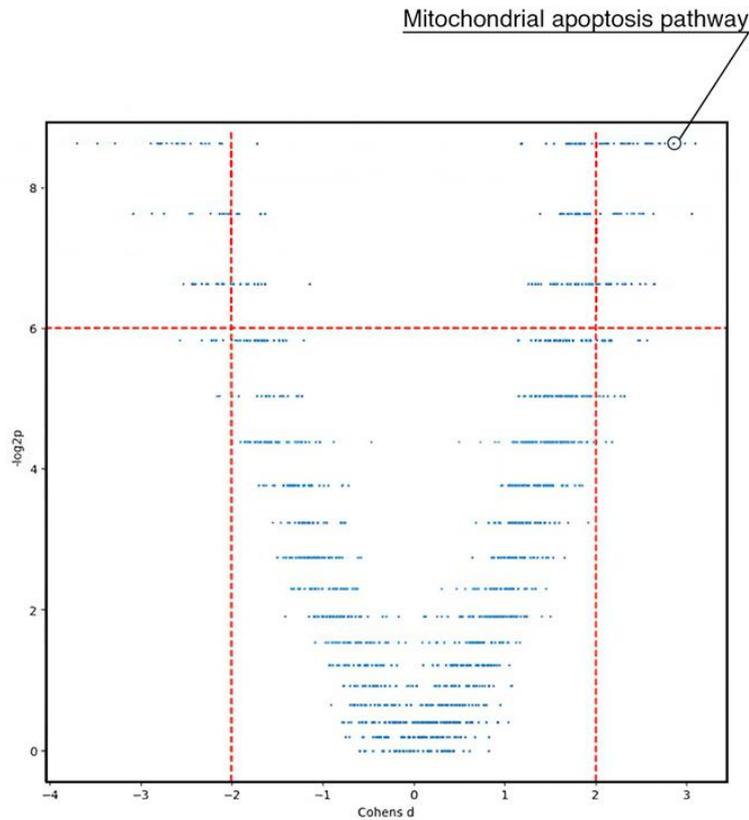


Рисунок 43 - Диаграмма рассеяния для уровней активации 1763 сигнальных путей в клеточной линии HL-60 в ответ на добавление экстракта из *Nostoc sp.* Пунктирными линиями обозначены выбранные границы значимости для путей.

Для представления результатов дифференциальной активации сигнальных путей, по аналогии с классическим анализом дифференциальной экспрессии генов, был использован график рассеяния для большого массива данных (англ. Volcano plot).

Штрихованные линии делят диаграмму рассеяния на шесть частей. Актуальными для анализа являются верхние левые и правые части. В них находятся пути, p -значение которых меньше выбранного порога, а значение Cohen's D (выбранной меры эффекта) больше. Верхняя правая область соответствует статистически значимым положительным эффектам (после воздействия путь достоверно активируется), верхняя левая - статистически значимым отрицательным эффектам (после воздействия путь достоверно ингибируется).

Как и ожидалось, обработка полифемузином III опухолевых клеток приводила к активации нескольких сигнальных путей, ассоциированных согласно литературным данным с клеточной смертью (Рисунок 44).

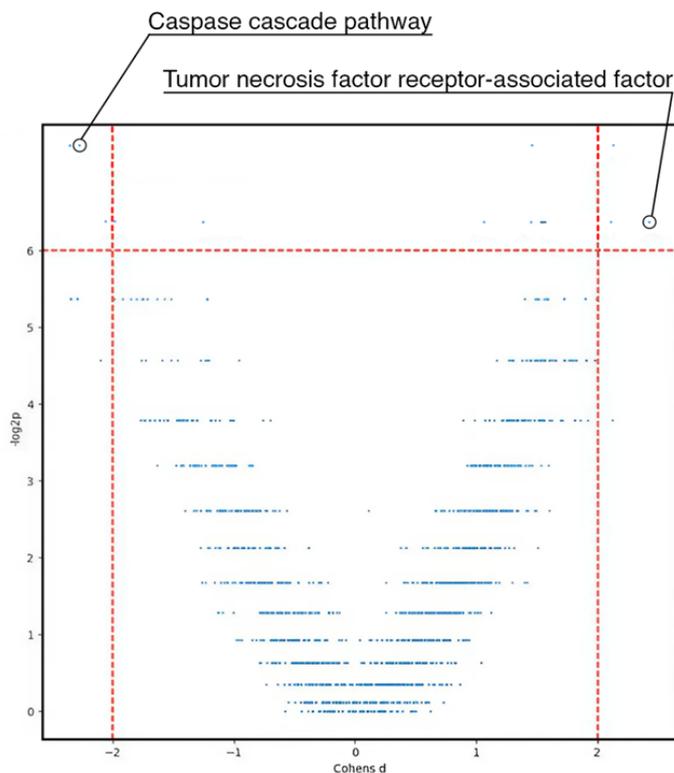


Рисунок 44 - Диаграмма рассеяния для уровней активации 1763 сигнальных путей в клеточной линии HL-60 в ответ на добавление полифемузина. Пунктирными линиями обозначены выбранные границы значимости для путей.

6.4 Изучение влияния экстрактов на жизнеспособность клеток опухолевой линии HL-60 *in vitro*

На следующем этапе проводили сравнение результатов, полученных при помощи технологии Онкобокс, с результатами *in vitro*. Для этого проводили изучение влияния экстрактов из микроводорослей на жизнеспособность клеточной линии HL-60 (ATCC) в МТТ-тесте.

МТТ-тест осуществляли с использованием стандартной колориметрической процедуры с рядом изменений (Denizot, F. et al. 1986).

Предварительно был определен максимальный объем и состав растворителя для экстрактов (этанол, ДМСО), который не влиял на жизнеспособность клеток в МТТ-тесте. Он составил 0,5 % от общего объема среды культивирования клеток, при больших концентрациях проявлялась цитотоксичность растворителя.

В Таблице 45 приведены основные показатели результатов тестирования экстрактов микроводорослей с оценкой их цитотоксичности, измеренной на клетках линии HL-60.

Максимальной дозой в серийных разведениях стала концентрация 1 мг/мл (исходная концентрация 200 мг/мл). Титровка состояла из 8 последовательных разведений. На каждый экстракт было поставлено три эксперимента, в каждом эксперименте было три биологических повтора. Инкубация клеток с экстрактами проводилась в течение 72 часов. После инкубации проводили снятие эксперимента и построение кривых выживаемости. Растворы были стерильны и практически не содержали остатков разрушенных клеток микроводорослей.

Все экстракты были разделены на две группы согласно цитотоксической активности (ЦА): цитотоксичные (ЦА>50) - 7 штук и нецитотоксичные (ЦА<20%) - 43 штуки.

Для 7 токсичных экстрактов была определена величина полумаксимального ингибирования (IC₅₀). Данные представлены в Таблице 45.

Таблица 45 - Значения цитотоксичности изучаемых экстрактов.

Название штамма	IC ₅₀ , мкг/мл
<i>Nostoc sp.</i>	9 ± 0,57
<i>Mallomonas sp.</i>	114 ± 5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	280 ± 55,5
<i>Closterium sp.</i>	461 ± 31,3
<i>Stichococcus sp.</i>	764 ± 34
<i>Cosmarium sp.</i>	807 ± 7
<i>Phormidium mucicola</i>	828 ± 10

Значение IC₅₀ для препарата полифемузина III составило 2,5 ± 0,1 мкМ, что хорошо коррелирует с ранее полученными данными (Marggraf, M. B. et al. 2018).

Результаты, основанные на транскриптомных данных, хорошо коррелируют со значениями IC₅₀ в случае наиболее токсичного экстракта *Nostoc sp.* Показано совпадение результатов обоих методов для экстрактов штаммов *Phaeodactylum tricornutum*, *Cosmarium sp.* и *Closterium sp.* Кроме того, в обоих экспериментах был подтвержден эффект положительного контроля - полифемузина III.

Показано, что метод предсказания цитотоксичности, разработанный с использованием технологии Онкобокс, дал результаты, совпадающие с результатами классического МТТ-теста на 92 %. Расхождения двух методов было отмечено лишь для 4 из 50 экстрактов.

На следующем этапе были изучены конкретные сигнальные пути и молекулярные мишени, которые могут быть затронуты в ответ на воздействие на клетки HL-60 экстрактов биомассы *Nostoc sp.* Согласно проведенному статистическому анализу, одними из наиболее сильно измененных сигнальных путей оказались пути, ассоциированные с клеточной гибелью. Например, значение активации молекулярного пути Mitochondrial apoptosis pathway составило 17,3, при норме 0.

Для полифемезина III наиболее меняющимися сигнальными путями оказались связанные с апоптозом Caspase cascade pathway (PAL = - 20,36) и некрозом Tumor necrosis factor receptor-associated factor (PAL = 18,6).

6.5 Изучение цитотоксического эффекта экстракта биомассы *Nostoc sp.*

На следующем этапе, в ходе фракционирования и очистки методами ТФЭ, ВЭЖХ и масс-спектрометрии с последующей идентификацией структуры ЯМР было выявлено, что действующим веществом экстракта биомассы *Nostoc sp.* является цианобактериальный пептидный токсин криптофицин-1 (Рисунок 45). Содержание в активных фракциях составляла 0,01 %.

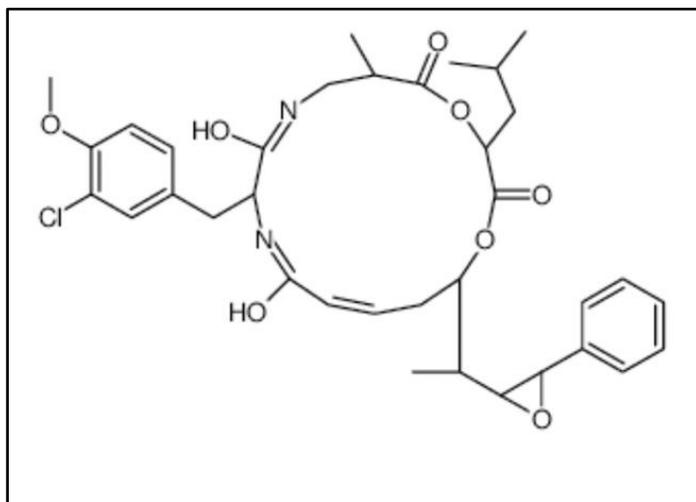


Рисунок 45 - Структура криптофицина -1.

Криптофицины - это основные представители класса макроциклических депсипептидов. Впервые криптофицин был выделен еще в 1990 г. из сине-зеленых водорослей (цианобактерий) рода *Nostoc* (GSV 224) (Shwartz, R. E. et al. 1990). Он оказывал фунгицидное воздействие на грибы и дрожжи семейства *Cryptococcus*, которое и дало название этому классу соединений. Было показано, что большинство криптофицинов

проявляют противоопухолевую активность (Jones, M. R. et al. 2021). Предположительный механизм цитотоксического эффекта криптофицинов - деполяризация микротрубочек, вызывающая арест митоза в фазе G1/M. На сегодняшний день открыто множество различных криптофицинов, получены их синтетические аналоги, часть которых проходит клинические испытания в качестве противоопухолевого агента (Bolatkhan, K. et al. 2017).

Результаты, полученные при помощи технологии Онкобокс, хорошо согласуются с литературными данными, описывающие свойства криптофицина-1.

В экспериментах с использованием технологии Онкобокс был предсказан высокий цитотоксический эффект экстракта из *Nostoc sp.*: статистически значимо оказались изменены 25 молекулярных сигнальных путей, ассоциированных с клеточной гибелью. Более того, анализ отдельных путей показал, что соединения, содержащиеся в экстрактах *Nostoc sp.*, наиболее значимо затрагивают два пути: Mitochondrial apoptosis pathway (Рисунок 46) и Integrin-linked kinase signaling pathway actin polymerization cytoskeletal reorganization.

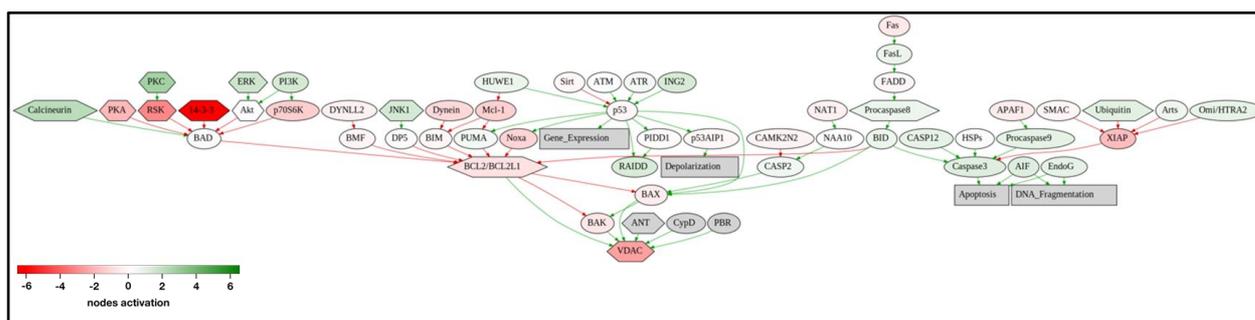


Рисунок 46 - Визуализация узлов сигнального пути Mitochondrial apoptosis pathway клеточной линии HL-60 в ответ на добавление экстракта из *Nostoc sp.* Стрелки соответствуют активации, красные - ингибированию. Глубина цвета каждого узла графа соответствует логарифмам отношения частоты в эксперименте к норме для каждого узла.

Как видно из Рисунка 47, происходит повышение накопление миозина с одновременным снижением актина.

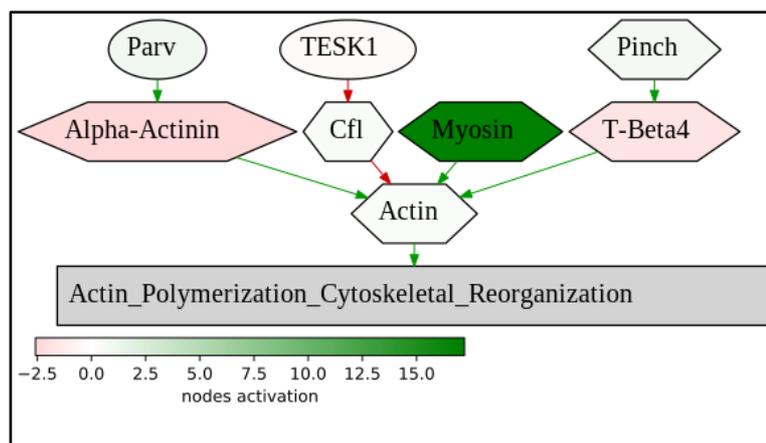


Рисунок 47 - Визуализация узлов сигнального пути Integrin-linked kinase signaling pathway actin polymerization cytoskeletal reorganization клеточной линии HL-60 в ответ на добавление экстракта из *Nostoc sp.* Зеленые стрелки соответствуют активации, красные - ингибированию. Глубина цвета каждого узла графа соответствует логарифмам отношения частоты в эксперименте к норме для каждого узла.

Перестроение цитоскелета в целом может быть следствием разрушения микротрубочек, вызванного добавлением криптофицина-1 (Petrásek, J. et al. 2009). Значение PAL в этом эксперименте составило 18, что указывает на высокий уровень подавления соответствующих сигнальных путей в клетках, обработанных экстрактом *Nostoc sp.*

Ряд исследований указывают на то, что криптофицин-1 способен индуцировать гиперфосфорилирование белка Bcl-2, что ингибирует его антиапоптотические функции (Lu, K. et al. 2001), (Adams, C. P. et al. 2006), (Bule, M. H. et al. 2018). В исследуемых образцах, обработанных экстрактом *Nostoc sp.*, было отмечено изменение митохондриального апоптотического пути (PAL = 17,3), в частности, за счет снижения содержания белка Bcl-2.

Для валидации технологии Онкобокс изучали *in vitro* механизм клеточной гибели, индуцируемой полифемузином III (Marggraf, M. B. et al. 2018).

Рекомбинантный аналог антимикробного пептида полифемузина III был получен с помощью гетерологичной экспрессии в бактериальной системе. Была применена схема экспрессии и очистки целевых пептидов, разработанная в Учебно-научном центре ГНЦ ИБХ РАН (Рисунок 48).

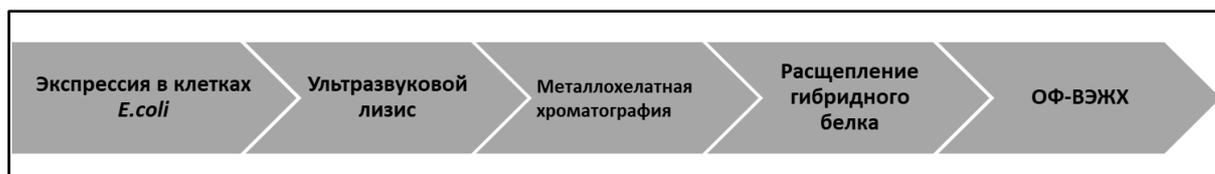


Рисунок 48 - Принципиальная схема экспрессии и очистки антимикробных пептидов.

С целью изучения механизма цитотоксического действия полифемузина III с помощью окрашивания трипановым синим предварительно был показан кратковременный пермеабилзирующий эффект пептида. Краситель трипановый синий проникает только в клетки с поврежденной мембраной. Клетки HL-60 инкубировали с полифемузином III в двух конечных концентрациях: равной IC_{50} (2,5 мкМ) и превышающей концентрацию IC_{50} в 2 раза (5 мкМ). Степень пермеабиллизации мембраны клеток HL-60 оценивали спустя 15 мин, 1 ч и 4 ч. Процентное соотношение клеток, окрашенных трипановым синим, и неокрашенных клеток определяли с помощью счетчика клеток (Рисунок 49) (Marggraf, M. B. et al. 2018).

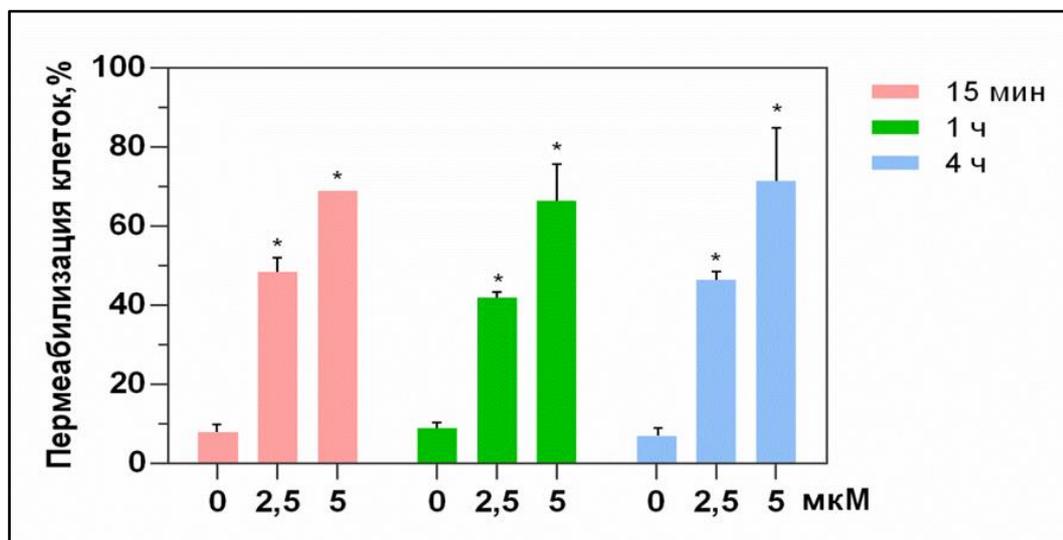


Рисунок 49 - Окрашивание трипановым синим клеток HL-60 после 15 мин (красные столбики), 1 ч (зеленые столбики), 4 ч (синие столбики) инкубации с полифемузином III (* $p < 0,05$ по отношению к отрицательному контролю 0 мкМ для каждой временной точки, соответственно, данные представлены в виде значений с учетом стандартного отклонения в двух независимых экспериментах).

Нарушение целостности мембраны клеток не зависело от времени инкубации с пептидом, поскольку в контрольном образце и в образцах с полифемузином III в концентрациях 2,5 и 5 мкМ процентное соотношение клеток после 15 мин, 1 ч или 4 ч инкубации было сходным. Степень пермеабиллизации мембраны под действием пептида

зависела от концентрации. В образцах с 2,5 мкМ полифемузина III количество мертвых клеток (то есть окрашенных трипановым синим) составило 48 %, 42 % и 46 % после 15 мин, 1 ч и 4 ч, соответственно. При концентрации 5 мкМ полифемузина III доля мертвых клеток составила 69 %, 66 % и 71 % для 15 мин, 1 ч и 4 ч инкубации, соответственно. Из описанного следует, что полифемезин III быстро разрушал мембраны клеток, эффект проявлялся в первые 15 мин, что может указывать на гибель клеток по пути некроза.

Затем проводили двойное окрашивание с последующей цитофлуориметрией клеток HL-60 после обработки полифемезином III. Клетки инкубировали с полифемезином III в концентрации, равной IC_{50} , и в концентрации $2xIC_{50}$. В качестве положительного контроля использовали индуктор апоптоза камптотecin. Клетки инкубировали с полифемезином III или камптотечином в присутствии и в отсутствии ингибитора каспаз Z-VAD-FMK. Данный подход основан на том, что в случае индукции клеточной гибели по пути апоптоза добавление Z-VAD-FMK в среду должно снизить процентное количество клеток, находящихся в раннем и/или позднем апоптозе.

Результаты двойного окрашивания представлены на Рисунке 50. Спустя 4 ч большинство клеток, обработанных 2,5 мкМ или 5 мкМ полифемезина III, находились в позднем апоптозе/некрозе, поскольку наблюдалось окрашивание обоими красителями – аннексином V-FITC и иодидом пропидия. При этом данный эффект практически не отменялся при добавлении ингибитора каспаз. В отсутствие Z-VAD-FMK процент аннексин V-FITC/PI-положительных клеток составил >40 % для концентрации 2,5 мкМ и > 80 % для концентрации 5 мкМ, в присутствии - > 30 % и > 70 % для концентрации 2,5 мкМ и 5 мкМ, соответственно. Z-VAD-FMK незначительно влиял на эффект полифемезина III. В отличие от действия на полифемезин III, Z-VAD-FMK в значительной степени ослаблял действие стандартного индуктора апоптоза камптотeciна (в отсутствие Z-VAD-FMK: > 20 % аннексин V-FITC/PI-положительных клеток и > 50 % аннексин V-FITC-положительных клеток, в присутствии Z-VAD-FMK: 6 % аннексин V-FITC/PI-положительных клеток и 2 % аннексин V-FITC-положительных клеток). Таким образом, цитотоксический эффект полифемезина III, вероятнее всего, не сопряжен с индукцией каспаза-зависимого апоптоза. В литературе есть полученные с помощью метода двойного окрашивания данные о гибели клеток лейкоза по пути некроза при действии полифемезина II (Paredes-Gamero, E. J. et al. 2012).

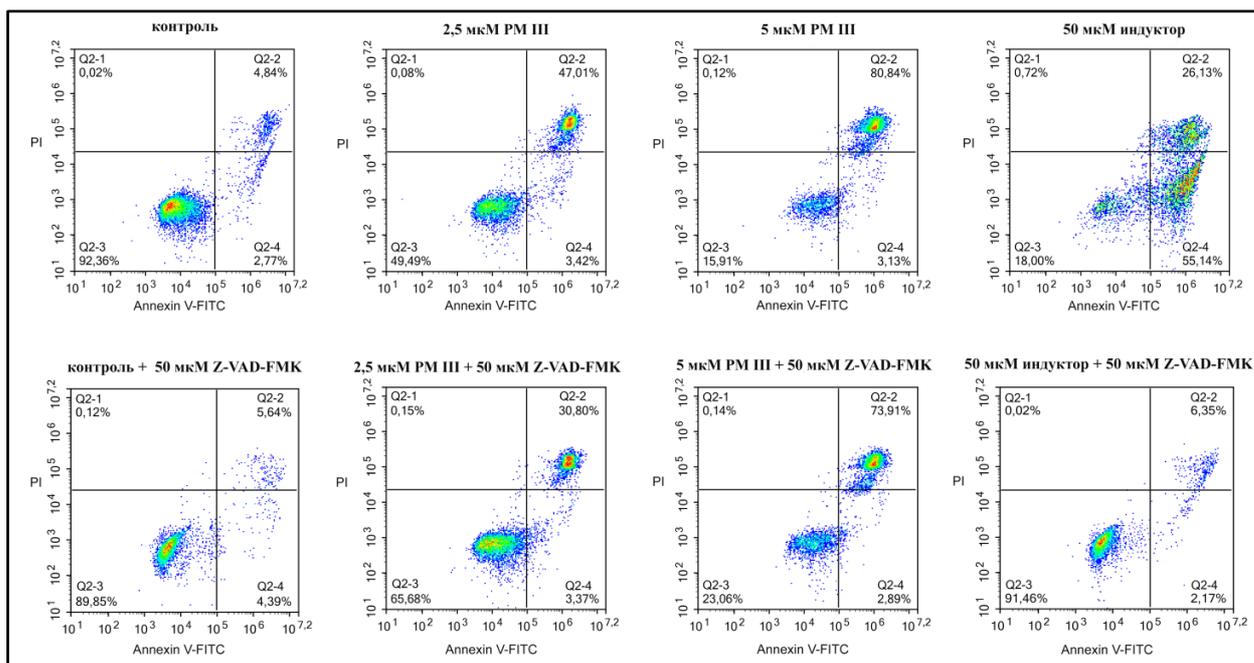


Рисунок 50 - Данные проточной цитофлуориметрии после двойного окрашивания аннексином V-FITC и иодидом пропидия (PI) клеток HL-60 спустя 4 ч инкубации с полифемузином III (РМ III) в концентрациях, равных IC50 и 2xIC50, в присутствии и отсутствии ингибитора каспаз Z-VAD-FMK. В столбцах слева направо: контроль (буфер), 2,5 мкМ РМ III, 5 мкМ РМ III, 50 мкМ индуктор апоптоза камптотecin. Верхний ряд: без добавления Z-VAD-FMK, нижний ряд - с добавлением 50 мкМ Z-VAD-FMK. Результаты представлены в виде процентной доли живых клеток (аннексин V-FITC-/PI-), клеток в раннем апоптозе (аннексин V-FITC+/PI-), клеток в позднем апоптозе/некрозе (аннексин V-FITC+/PI+).

Потеря целостности мембраны клеток была также показана методом количественного измерения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Высвобождение фермента ЛДГ происходит в процессе лизиса клетки. Наличие ЛДГ во внеклеточной среде может служить маркером нарушения проницаемости клеточной мембраны. Клетки были обработаны полифемузином III в концентрациях от 1,5 мкМ до 25 мкМ, инкубация проводилась в течение 1 ч (Рисунок 51) (Marggraf, M. B. et al. 2018).

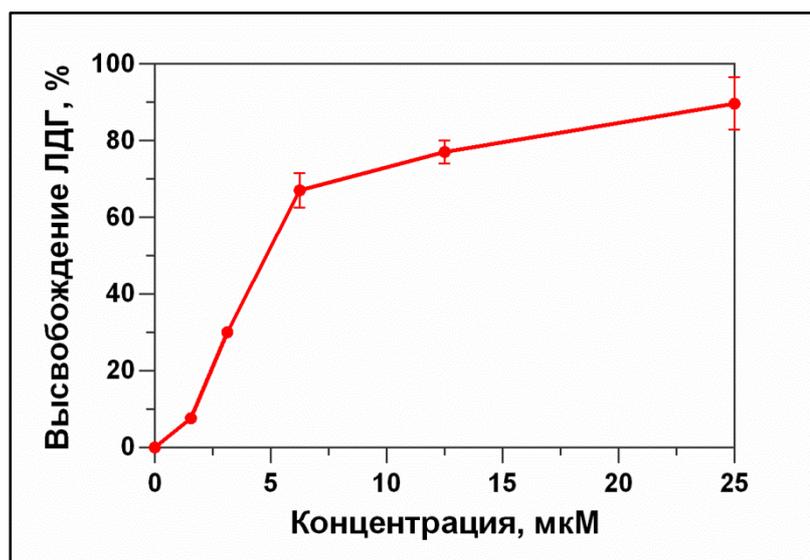


Рисунок 51 - Кривая высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из клеток HL-60 в зависимости от концентрации полифемузина III (данные представлены в виде значений с учетом стандартного отклонения в двух независимых экспериментах).

Полученные экспериментальные данные указывали на то, что степень лизиса клеток HL-60 под действием полифемузина III была прямо пропорциональна концентрации пептида.

В случае использования технологии Онкобокс для полифемузина III показано наиболее значимое воздействие на сигнальные пути, ассоциированные с некрозом/некроптозом. При этом путь, ассоциированный с апоптозом, был подавлен: PAL = - 20,36 (Рисунок 52).

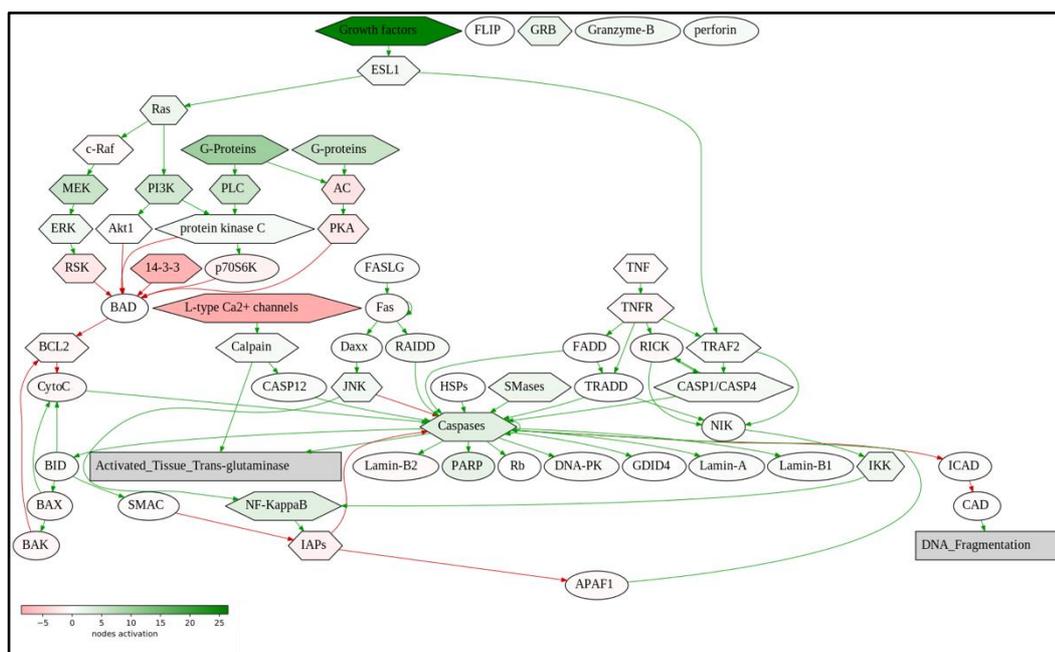


Рисунок 52 - Визуализация узлов сигнального пути Caspase cascade pathway клеточной линии HL-60 в ответ на добавление полифемузина III. Зеленые стрелки соответствуют активации, красные - ингибированию. Глубина цвета каждого узла графа соответствует логарифмам отношения частоты в эксперименте к норме для каждого узла.

По результатам данного эксперимента дополнительно была отмечена активации пути синтеза гиалуроновой кислоты: PAL = 21,7 (Рисунок 53), что может быть объяснено защитной ролью этой молекулы в предотвращении клеточной гибели (Dogné, S. et al. 2020).

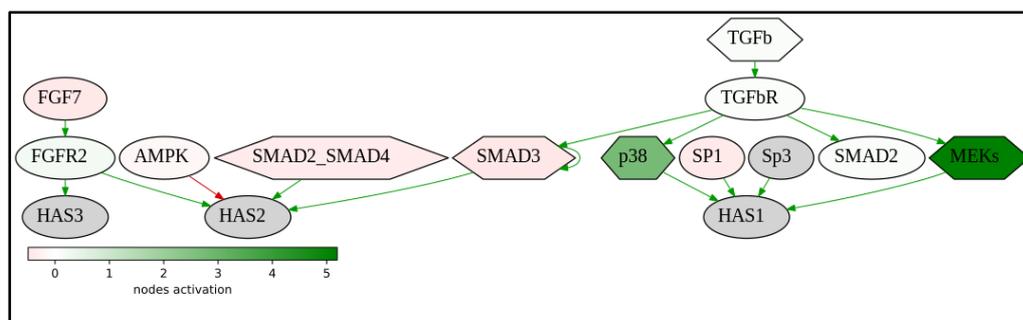


Рисунок 53 - Визуализация узлов сигнального пути Hyaluronic acid pathway клеточной линии HL-60 в ответ на добавление полифемузина III. Зеленые стрелки соответствуют активации, красные - ингибированию. Глубина цвета каждого узла графа соответствует логарифмам отношения частоты в эксперименте к норме для каждого узла.

Эти данные хорошо согласуются с описанным выше механизмом цитотоксического эффекта антимикробных пептидов (Marggraf, M. B. et al. 2018).

На основании полученных результатов можно утверждать, что использование технологии Онкобокс позволяет с высокой достоверностью предсказать наличие

биологически активных молекул, влияющих на жизнеспособность клеток человека, в биомассе микроводорослей.

В контексте поиска новых фармацевтических молекул из микроводорослей, технология Онкобокс позволяет на самых ранних этапах предположить механизм, лежащий в основе того или иного функционального эффекта изучаемой молекулы. Эти данные крайне важны для оценки терапевтического потенциала.

При этом могут быть реализованы два различных подхода. С одной стороны, чем больше молекулярных путей будет затронуто, тем более выраженной активностью будет обладать исследуемое соединение (примером может быть криптофицин-1). С другой стороны, если в изучаемом экстракте есть соединение, затрагивающее единичное количество молекулярных путей, это может свидетельствовать о высокой специфичности по отношению к тем или иным внутриклеточным мишеням. В качестве примера можно привести результаты, полученные для экстракта *Nannochloropsis oculata*.

По-видимому, представленная методика может быть применена не только для поиска противоопухолевых соединений. Дифференциальная активация внутриклеточных сигнальных путей, установленная экспериментальным путем, может быть сопоставлена с аннотированными ранее профилями внутриклеточных путей, полученными в ответ на воздействие на клетку тех или иных препаратов (Connectopedia: The CLUE Knowledge Base. URL: <https://clue.io/connectopedia/>).

В текущее исследование была взята панель из 50 экстрактов микроводорослей, однако, у данного подхода нет принципиального ограничения по масштабу выборки. Оптимизация состава профилируемых генов, использующихся для анализа образца, также может увеличить точность выбора штаммов-источников перспективных молекул.

Таким образом, использование омиксных технологий для количественной оценки уровня активации внутриклеточных молекулярных путей позволяет ускорить выделение новых биологически активных веществ из биомассы микроводорослей.

Выводы по разделу

Впервые для выделения противоопухолевых соединений из биомассы микроводорослей была применена технология Онкобокс. Анализ активации внутриклеточных сигнальных путей позволил предсказать наличие мощного цитотоксического соединения в биомассе одного из штаммов. Действующее вещество было выделено и охарактеризовано. Им оказался макроциклический депсипептид криптофицин-1, синтезируемый цианобактериями рода *Nostoc*. Полученные данные по биологической

активности хорошо согласуются с представленными ранее в литературе. Результаты эксперимента позволяют рассматривать технологию Онкобокс как перспективный подход для высокопроизводительной предсказательной аналитики содержания биологически активных веществ в микроводорослях.

ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

7.1 Типологизация существующих подходов к изучению фотосинтезирующих микроорганизмов

Текущие подходы к изучению фототрофных микроорганизмов в зависимости от штамма и конечного продукта могут быть классифицированы следующим образом:

- известный штамм - известный продукт,
- неизвестный штамм - известный продукт,
- известный штамм - неизвестный продукт,
- неизвестный штамм - неизвестный продукт.

7.1.1 Модель известный штамм - известный продукт

Большая часть исследователей сфокусирована на работе с известными промышленными микроорганизмами, которые продуцируют известный же коммерчески успешный продукт (Рисунок 54).



Рисунок 54 - Охарактеризованный продуцент как источник известного продукта.

Примером такого подхода может быть получение общих липидов или ПНЖК. Ключевым в этих работах является увеличение двух параметров: скорости роста штамма и продуктивности ценного метаболита (Morales, M. et al. 2021). Результат такого рода работ оценивается объемной продуктивностью того или иного штамма в сравнении с экономической эффективностью. Как правило, для этого проводится оптимизация условий культивирования: интенсивности освещения, температурных условий, pH, депривация нитратов и/или фосфатов, иные стресс-факторы (Breuer, G. et al. 2013), (Yun, J. H. et al. 2018). При этом исследователям приходится искать золотую середину между максимальной скоростью роста и продуктивностью целевого метаболита. К примеру, содержание липидов в биомассе *Schizochytrium sp.* может достигать 80 %. Однако скорость накопления биомассы, даже в лабораторных условиях, достаточно невысокая (Chisti, Y. 2007).

Альтернативно могут применяться подходы, связанные с так называемой метаболической инженерией. Как правило, они сводятся к модификации отдельных генов/группы генов, вовлеченных в метаболизм целевого продукта. На примере липидов эти подходы могут быть сведены к следующему: 1) активации генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в синтез липидов (Bellou, S. et al. 2016); 2) подавлению генов, кодирующих ферменты конкурирующих метаболических путей (Siaut, A. et al. 2011); 3) повышение активности ферментов, вовлеченных в фотосинтез (Stephenson, P. et al. 2011); 4) активация ферментов, участвующих процессах элонгации и десатурации углеводородной цепи (в случае ПНЖК) (Bellou, S. et al. 2016).

Поиск новых внутриклеточных мишеней и путей оптимизации метаболизма липидов требует глубокого понимания фундаментальных аспектов физиологии микроводорослей (Bellou, S. et al. 2014).

Несмотря на то, что первый геном микроводорослей был секвенирован в начале 2000-х годов, в базе данных NCBI представлено не более 60 полных геномов микроводорослей, при этом около 30 генетически-модифицированных микроводорослей являются промышленными продуцентами липидов, пигментов и витаминов (Daboussi, F. et al. 2014), (Manfellotto, F. et al. 2020), (Steinbrenner, J. et al. 2006), (Griesbeck, C. et al. 2006).

7.1.2 Модель новый штамм - известный продукт

Вторым типом исследований является поиск новых продуцентов коммерчески значимого продукта (Рисунок 55).



Рисунок 55 - Неохарактеризованный продуцент как источник известного продукта.

Целью таких исследований является поиск нового продуцента известного метаболита, объемная продуктивность которого будет сопоставима или превосходить текущие промышленные штаммы (Sadvakasova, A. et al. 2019), (Erdoğan, A. et al. 2022). В этом случае задача упрощается за счет наличия отработанной методики детекции искомого соединения, а технологии массового скрининга позволяют существенно сократить временные затраты. При этом, в основе методологии поиска нового штамма-продуцента лежат литературные данные и/или анализ филогенетических деревьев. К примеру, в качестве новых продуцентов астаксантина чаще всего рассматриваются микроводоросли рода *Haematococcus*, а *Dunaliella* и *Scenedesmus* как источники бета-каротина (Rajput, A. et al. 2022), (Razzak, S. A. 2024). Другим примером может служить поиск новых продуцентов фикоцианина среди цианобактерий, для которых и ранее было показано относительно высокое содержание данного пигмента (Patel, A. et al. 2005), (Aouir, A. et al. 2017).

Новые продуценты ЭПК в основном ищут среди представителей классов Bacillariophyceae и Eustigmatophyceae, значительно реже Chrysophyceae и Xanthophyceae (Long, J. et al. 2022).

С точки зрения автора, такой подход может приводить лишь к «еще одному перспективному продуценту», но редко позволяет открыть штамм-блокбастер.

7.1.3 Модель известный штамм - новый продукт

Третий класс исследований посвящен поиску новых молекул в уже хорошо зарекомендовавших себя в промышленной биотехнологии штаммах (Рисунок 56).

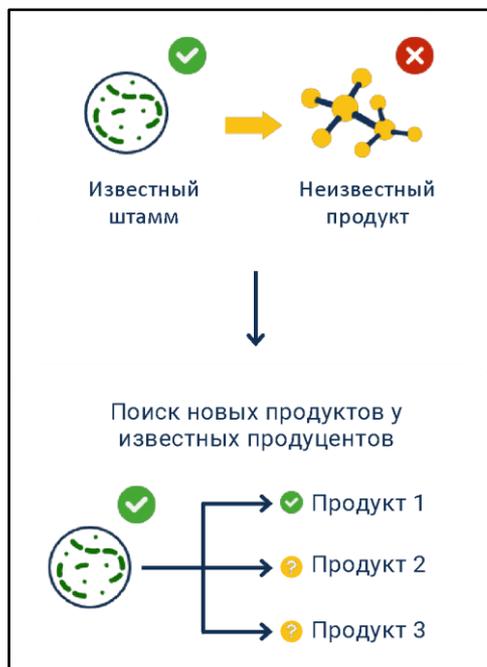


Рисунок 56 - Охарактеризованный продуцент как источник новых продуктов.

Известно, что продуктивность штамма в лабораторных условиях может слабо коррелировать с данными, получаемыми при промышленном культивировании. Показано, что масштабирование выращивания отдельных штаммов может приводить к снижению скорости накопления биомассы от 30 % до 80 % (Gao, F. et al. 2021), (Zhang, H. et al. 2021).

Текущий подход может снизить риски такого рода.

К числу наиболее популярных в такого рода работах штаммов можно отнести микроводоросли родов *Chlamydomonas* и *Arthrospira*. Фактически эти штаммы являются платформой, на базе которой идет попытка получения максимально широкого спектра как первичных, так и вторичных метаболитов.

Значительная часть исследований такого типа сосредоточены на генетической модификации этих микроорганизмов. При помощи технологии CRISPR/Cas9 на основе штамма *Chlamydomonas reinhardtii* был получен новый эффективный продуцент липидов (Nguyen, T. H. T. et al. 2020).

Проводятся многочисленные работы по получению мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, способных синтезировать различного рода эритропэтинов, антигенов и вакцины (Ortega-Berlanga, B. et al. 2018).

В недавних работах на основе *Parietochloris tricornutum* был создан трансгенный продуцент гераниола и ряда моноклональных антител (Fabris, M. et al. 2020), (Hempel, F. et al. 2017).

С другой стороны, проводится изучение новых биологических эффектов экстрактов ранее хорошо описанных штаммов. К примеру, описаны работы по определению противоопухолевой активности экстрактов *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus sp.*, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis oculata* и др. (Bouyahya, A. et al. 2023).

На сегодняшний день описано более 50 000 видов микроводорослей, при этом с биохимической точки зрения немногим более 300 были охарактеризованы. Из 2000 цианобактерий исследованы менее половины (Mata, T. M. et al. 2010), (Vincent, W. F. 2009).

7.1.4 Модель новый штамм - новый продукт

Несмотря на то, что из микроводорослей уже выделено несколько тысяч соединений, обладающих различными биологическими эффектами, в биотехнологической промышленности используются не более 30 штаммов. (Nagarajan, M. et al. 2012). Сложившаяся ситуация указывает на перспективность подхода, изображенного на Рисунке 57, то есть поиска новых молекул в ранее не описанных штаммах. При этом такого рода исследования являются крайне редкими. Это связано, с одной стороны, с проблемами культивации диких штаммов, а, с другой стороны, с ограничениями тест-систем, специализированных на детектировании конкретного эффекта (Jabeen, A. et al. 2017), (Galasso, C. et al. 2019, (Ghasemi, Y. et al. 2007).

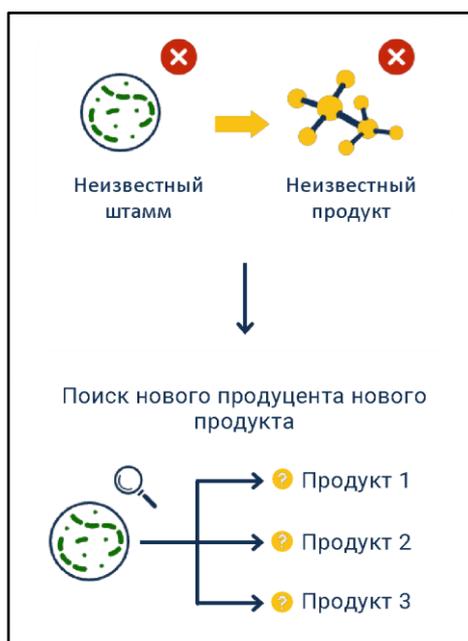


Рисунок 57 - Неохарактеризованный продуцент как источник новых продуктов.

Относительно недавно была разработана технология iChip, позволившая повысить вероятность культивирования почвенных микроорганизмов и обнаружить продуцента первого за последний 20 лет антибиотика - тейксобактина (dos Santos, J. D. N. et al. 2022), (Pidcock, L. et al. 2015). Возможно, адаптация данной технологии для фототрофных микроорганизмов позволит также культивировать в лабораторных условиях ранее недоступные виды.

7.2 Интегральная модель платформы для изучения биотехнологического потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов

Анализ существующих подходов к изучению биотехнологического потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов позволяет предложить новый обобщенный подход, в основе которого лежит платформенное решение (Рисунок 58).

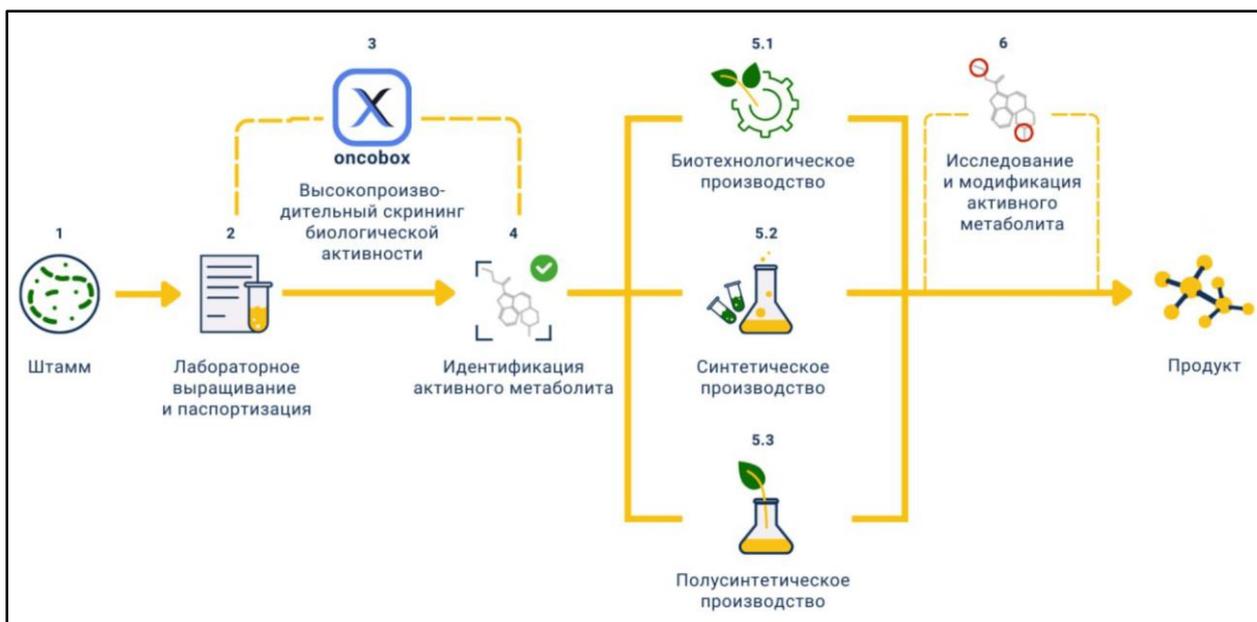


Рисунок 58 - Принципиальная схема биотехнологической платформы.

Суть предлагаемого решения заключается в реализации последовательных этапов:

1) описание новых видов с выделением моноклональных штаммов, их морфологическое, молекулярно-генетическое изучение и биохимический скрининг; 2) изучение ключевых биотехнологических параметров в лабораторных условиях; 3) предсказательная аналитика содержания биологически активных соединений в экстрактах биомассы изучаемых штаммов при помощи технологии Онкобокс; 3) выделение и идентификация активных метаболитов; 4) биотехнологическое/синтетическое и полусинтетическое получение в полупромышленном масштабе ценных молекул; 5) оптимизация физико-химических свойств метаболитов с целью улучшения их свойств.

Биотехнологическая платформа - это набор подходов и протоколов для систематического получения новых продуктов. Предложенная модель позволяет пройти путь от идентификации нового штамма до выделения оригинального соединения, имеющего практическую ценность и промышленные перспективы.

В данной работе был исследован биотехнологический потенциал более 200 штаммов эукариотических и прокариотических фототрофных микроорганизмов. Среди них были штаммы, активно используемые в промышленности, такие как *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX L642) и *Nanochloropsis oculata* (CCMP525), а также оригинальные штаммы, выделенные нами из различных источников.

Так, на первом этапе был выделен и охарактеризован *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 - новый высокоэффективный продуцент липидов. Была проведена успешная оптимизация условий культивирования *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11. В условиях

азотного и/или фосфорного голодания происходило увеличение содержания липидов с 17 % до 59 % от сухого веса. В условиях полупромышленного культивирования объемная продуктивность липидов для штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 составила 80 мг/л/день.

При таком подходе были задействованы следующие элементы платформы: 1, 2, 4, 5.1 (Рисунок 58). В этом случае исследование носило характер неизвестный штамм - известный продукт, а на последующей стадии оптимизации известный штамм - известный продукт.

Затем был применен подход неизвестный штамм - известный продукт. Обнаружен и охарактеризован новый штамм-продуцент коммерчески значимого антиоксиданта фукоксантина *Mallomonas furciviva* SBV13, определены оптимальные условия культивирования, позволяющие достичь содержания фукоксантина 26,6 мг/г сухой биомассы. Волюметрический выход фукоксантина в условиях полупромышленного культивирования составил 3,7 мг/л/день. Снова были задействованы элементы (1, 2, 4, 5.1) платформы (Рисунок 58).

Далее известный штамм *Vischeria magna* SBV108 из коллекции Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (СΥΚΟΑ) был исследован как потенциальный продуцент липидов и ПНЖК. Содержание эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в биомассе *V. magna* SBV108 составило 46,1 мг/г сухого веса. Волюметрический выход ЭПК в условиях полупромышленного культивирования составил 13,4 мг/л/день. Задействованы элементы (1, 2, 4, 5.1) платформы (Рисунок 58).

Последовательное прохождение элементов (1, 2, 4, 5.1) позволило выделить из культуральной жидкости микроводорослей новый антибиотик, активный против MRSA.

Кроме того, была разработана методика химического синтеза (стадия 5.2) исходной молекулы, проведена hit-to-lead оптимизация (стадия 6) и доклинические исследования лучшего производного BX-SI043.

Наконец, анализ активации внутриклеточных путей, ассоциированных с клеточной гибелью, позволил предсказать наличие мощного цитотоксического соединения в биомассе одного из штаммов. Действующее вещество было выделено и охарактеризовано. Им оказался макроциклический депсипептид криптофицин-1, синтезируемый цианобактерией рода *Nostoc*. На этом этапе работы были последовательно использованы элементы платформы (1, 2, 3, 4, 5.1).

Как уже говорилось ранее, ключевыми особенностями платформы являются многофункциональность, инновационность, гибкость и междисциплинарность.

Многофункциональность платформы подтверждается линейкой продуктов, полученных в ходе работы: липиды, ПНЖК, пигменты, антибиотики, цитотоксические агенты. С точки зрения инновационности, платформа включает в себя не только традиционные элементы - морфологическое описание отдельных штаммов (1) - но и передовые методы использования больших данных и машинного обучения (3). Платформа позволяет работать с широким спектром фотосинтезирующих микроорганизмов - исследовано более 200 видов, покрывающих 14 классов микроводорослей. Представленная биотехнологическая платформа интегрирует различные дисциплины: микробиология, биохимия, биоинформатика и др. Отдельные блоки платформы могут быть дополнены и модифицированы (5.1). К примеру, система промышленного культивирования может быть подобрана, исходя из ростовых характеристик штамма. Это могут быть как открытые, так и закрытые системы, трубчатые или панельные фотобиореакторы и т.д.

Согласно другой концепции, важнейшими свойствами платформенных решений являются наличие дифференцированной технологии и возможность масштабирования (Deep-dive into platform biotech companies: phenotypes, business models, destinations. URL: <https://biodraft.substack.com/p/deep-dive-into-platform-biotech-companies>). Одной из таких технологий является Онкобокс, позволяющая проводить высокопроизводительную предсказательную аналитику биологически активных веществ в биомассе микроводорослей. Данная технология позволит быстро, качественно оценить ценность вторичных метаболитов при моделировании стрессовых условий культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов. При этом входная воронка может быть увеличена до сотен и даже тысяч штаммов. Сопоставление результатов, получаемых для конкретных экстрактов микроводорослей с данными, описанными в (Connectopedia: The CLUE Knowledge Base. URL: <https://clue.io/connectopedia/>) позволит вести поиск молекул с различными биологическими эффектами. Таким образом, предложено решение проблемы создания универсальной тест-системы для использования на предварительных этапах массового скрининга.

Технологические этапы, изображенные на Рисунке 58 (3, 4, 5.1, 5.2, 5.3 и 6), могут значительно снизить риски, связанные с идентификацией конкретного соединения и масштабированием производства конечного продукта.

Выводы по разделу

На основании анализа текущих подходов к разработке новых продуктов из фотосинтезирующих микроорганизмов была предложена оригинальная

биотехнологическая платформа, отвечающая ключевым критериям: многофункциональность, инновационность, гибкость и междисциплинарность. Ключевым элементом платформы является технология Онкобокс, позволяющая проводить высокопроизводительную аналитику содержания ценных соединений в биомассе микроорганизмов. Использование отдельных элементов представленной платформы позволило получить линейку биотехнологических продуктов различной маржинальности: липиды, ЭПК, фукоксантин, корм для аквакультуры и др.

ВЫВОДЫ

1. Выделен и охарактеризован новый высокоэффективный продуцент липидов *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11. В условиях азотного и фосфорного голодания происходило увеличение содержания липидов с 17 % до 59 % сухой биомассы. Высокая объемная продуктивность (80 мг/л/день) и сбалансированный состав жирных кислот, наряду с относительно высокой скоростью накопления биомассы (2,1 г/л), позволяют предположить, что *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 может быть интересен с точки зрения производства биодизельного топлива. Поиск быстрорастущих штаммов, продуктивных в конкретных климатических условиях, имеет критическое значение для промышленного применения микроводорослей, особенно когда речь идет об относительно низкомаржинальных продуктах, таких как биодизельное топливо.

2. Обнаруженный и охарактеризованный новый штамм *Mallomonas furtiva* SBV13 содержит наибольшее количество фукоксантина в сухой биомассе (26,6 мг/г) среди известных на сегодняшний день природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании. Высокая объемная продуктивность (3,7 мг/л/день), наряду с относительно высокой скоростью накопления биомассы (2 г/л), позволяет рассматривать *Mallomonas furtiva* SBV13 в качестве перспективного промышленного продуцента коммерчески значимого пигмента фукоксантина.

3. Охарактеризован новый пресноводный штамм-продуцент омега-3 эйкозапентаеновой кислотой (ЭПК) - *Vischeria magna* SBV108. Штамм *Vischeria magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом ЭПК среди всех почвенных и пресноводных микроводорослей. Удельное содержание ЭПК в биомассе *Vischeria magna* SBV108 составляет 46,1 мг/г сухого веса. Волюметрическая продуктивность ЭПК в условиях полупромышленного культивирования *Vischeria magna* SBV108 составляет 13,4 мг/л/день, что сопоставимо с лучшими промышленными штаммами-продуцентами. Пресноводность *Vischeria magna* SBV108 является существенным биотехнологическим преимуществом, так как позволяет снизить затраты на культивирование штамма за счет более низкой стоимости питательных сред и отсутствия издержек, связанных с повышенной коррозионной нагрузкой на оборудование.

4. Добавление 10 % по весу биомассы *Vischeria magna* SBV108, богатой омега-3 эйкозапентаеновой кислотой, в рацион питания мальков красной тилапии (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) улучшает конверсию корма, ростовые характеристики мальков, эффективность использования ими белка и энергии более чем на 20 %. Добавление биомассы микроводоросли *Mallomonas furtiva* SBV13, содержащей фукоксантин, не

привело к значительным изменениям в показателях эффективности корма. Биомасса *Vischeria magna* SBV108 может быть рассмотрена в качестве прототипа одного из важнейших компонентов стартерного корма для мальков красной тилапии.

5. Из культуральной жидкости консорциума микроводоросли *Dunaliella salina* с гетеротрофными микроорганизмами, в том числе нитчатым грибом *Streptomyces sp.*, выделено оригинальное антибиотическое соединение - триазеноиндол (BX-SI001). Создана библиотека из 21 модификации исходной молекулы. Лидирующий кандидат BX-SI043 показал активность и селективность в 4 раза выше исходной молекулы. Для BX-SI043 были проведены *in vitro* фармакокинетические исследования и определена острая токсичность в экспериментах на модельных животных при внутрижелудочном способе введения. Максимально переносимая концентрация для BX-SI043 при внутрижелудочном способе введения крысам составила 600 мг/кг, что позволяет отнести соединение к веществам третьего класса опасности.

6. Впервые для поиска противоопухолевых соединений из биомассы микроводорослей была применена технология Онкобокс. Потенциал предиктивной аналитики данной технологии был валидирован в отношении цитотоксической активности тотальных экстрактов биомассы микроводорослей. Анализ активации внутриклеточных путей, ассоциированных с клеточной гибелью, предсказал наличие мощного цитотоксического соединения в биомассе одного из штаммов. Выделено действующее вещество - макроциклический депсипептид криптофицин-1, синтезируемый цианобактерией рода *Nostoc*. Полученные данные по биологической активности криптофицина-1 хорошо согласуются с описанными ранее в литературе. Результаты эксперимента позволяют рассматривать технологию Онкобокс как перспективный подход для высокопроизводительной предсказательной аналитики содержания биологически активных веществ в микроводорослях.

7. Предложена оригинальная биотехнологическая платформа, отвечающая ключевым критериям: многофункциональность, инновационность, гибкость и междисциплинарность. Ключевым элементом платформы является технология Онкобокс, позволяющая проводить высокопроизводительную аналитику содержания ценных соединений в биомассе микроорганизмов. Использование отдельных элементов представленной платформы позволило получить линейку биотехнологических продуктов различной маржинальности: липиды, ЭПК, фукоксантин, корм для аквакультуры и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше результаты отражают разработку единой платформы для поиска штаммов микроводорослей и цианобактерий, обладающих биотехнологическим потенциалом. Описанный подход позволяет пройти полный цикл от выделения новых моноклональных штаммов и проведения их биохимического скрининга до идентификации отдельных биологически активных молекул с последующим синтетическим или биотехнологическим производством в полупромышленном масштабе.

С помощью данного подхода было проанализировано более 200 различных штаммов микроводорослей, представляющих 14 классов. Обнаружены три оригинальных штамма микроводорослей, имеющих исключительное биотехнологическое значение в качестве источника липидов, фукоксантина и ЭПК. В полупромышленных реакторах для этих штаммов была изучена предельная объемная продуктивность целевых метаболитов, что позволило оценить биотехнологическую перспективность микроорганизмов. Важно отметить, что предложенная платформа обладает высокой степенью универсальности как с точки зрения объекта исследования, так и с точки зрения искомого соединения.

Разработанный алгоритм позволил последовательно выделить из культуральной жидкости антибиотическое соединение, провести его идентификацию, улучшить физико-химические свойства, разработать оптимальную схему синтеза *de novo*.

Предсказательная аналитика на основе технологического блока Онкобокс может сократить сроки и риски фармацевтической разработки препаратов из фотосинтезирующих микроорганизмов. Метод был успешно апробирован в рамках изучения экстракта биомассы цианобактерий, содержащих криптофицин-1.

Внедрение методов машинного обучения и использование омиксных технологий на одном из этапов позволит осуществлять воспроизводительный скрининг штаммов микроводорослей на предмет накопления биологически активных молекул высокой добавленной стоимости.

Созданное платформенное решение генерирует объекты интеллектуальной собственности на каждом отдельном этапе. Платформа также является модульной, гибкой и открытой для интеграции передовых методов и инструментов, от аналитической химии до генетического редактирования. Полученные результаты играют важнейшую роль в разработке новых интегральных подходов к раскрытию биотехнологического потенциала микроводорослей и цианобактерий.

Продемонстрирована принципиальная продуктовая логика, повышающая экономическую целесообразность использования биомассы микроводорослей в

промышленности. От более низкомаржинальных продуктов, таких как биотопливо и компоненты функциональных добавок, к соединениям с высокой добавленной стоимостью, таких как антибиотики и противоопухолевые препараты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП - антимикробные пептиды

А.о. - аминокислотный остаток

АДФ - аденозиндифосфорная кислота

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

АЦН - ацетонитрил

ВОЗ - всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГМО - генетически модифицированные организмы

ГХ/МС - газовая хромато-масс-спектрометрия

ДАГ - диацилглицерол

ДГК - докозагексаеновая кислота

ДМСО - диметилсульфоксид

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

рДНК - рибосомальна ДНК

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ЖХ/МС - жидкостная хромато-масс-спектрометрия

ИК - инфракрасный

КОЕ - колониеобразующая единица

ЛНЧ - липидные наночастицы

МАГ - моноацилглицерол

МИК - минимальная ингибирующая концентрация

МПД - максимально переносимая доза

МС - масс-спектрометрия

МТТ - 3-(4,5,-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид

ОБИККС - острая бактериальная инфекция кожи и структур кожи

ПЦР - полимеразная цепная реакция

П.н. - пар нуклеотидов

ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты

ПЭГ - полиэтиленгликоль

ПЭМ - просвечивающая электронная микроскопия

РНК - рибонуклеиновая кислота

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

ТАГ - триацилглицерол

ТФЭ - твердофазная экстракция

УДФ - уридин-5-дифосфат

УФ - ультрафиолет

ЦА - цитотоксическая активность

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПК - эйкозапентаеновая кислота

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

ADME - (absorption, distribution, metabolism, excretion) абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция

AGR - (absolute growth rate) абсолютная скорость роста

ALE - (adaptive laboratory evolution) адаптивная лабораторная эволюция

ARTP - (atmospheric and room-temperature plasma) плазма атмосферной и комнатной температуры

BCMA - (B-cell maturation antigen) антиген созревания В-клеток

BI - (Bayesian inference) Байесовского вывода

BIC - (Bayesian information criterion) Байесовский информационный критерий

CAR-T - (chimeric antigen receptor T-cell therapy) терапия на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором

CBC - (compensatory base change) компенсаторная замена оснований

hCMC - (half compensatory base change) компенсаторная замена оснований

CMAP - (connectivity map) карта взаимозависимостей

CNR - (normalized contrast-to-noise ratio) нормализованное отношение сигнал-шум

DLBCL - (diffuse large B-cell lymphoma) рефрактерная диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома

DSPC - (distearoylphosphatidylcholine) дистеароилфосфатидилхолина

EMS - (ethyl methanesulfonate) этилметансульфонат

EPV - (energy productive value) эффективность использования энергии

ER α - (estrogen receptor alpha) рецептор эстрогена альфа

ES - (electrochemical sensors) электрохимические датчики

FACS - (fluorescence-activated cell sorting) клеточная сортировка, активируемая флуоресценцией

FBS - (fetal bovine serum) эмбриональная телячья сыворотка

FC - (flow cytometry) проточная цитометрия

FCR - (feed conversion rate) конверсия корма

FDA - (Food and Drug Administration) управление еды и лекарств

- FP - (fluorescence protein) флуоресцентные белок
- FPA - (flat panel airlift) плоскопанельный эрлифтный фотобиореактор
- FRET - (Fluorescence Resonance Energy Transfer) резонансного переноса энергии Ферстера
- FTIR - (Fourier-transform infrared spectroscopy) ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье
- FTNIR - (Fourier transform near-infrared spectroscopy) ближняя ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье
- GLP - (good laboratory practice) надлежащая лабораторная практика
- GREACE - (genome replication engineering assisted continuous evolution) непрерывная эволюция с помощью технологии репликации генома
- HTS - (high throughput screening) высокопроизводительный скрининг
- IC₅₀ - (half maximal inhibitory concentration 50%) концентрация полумаксимального ингибирования
- ISO - (International Organization for Standardization) международная организация по стандартизации
- ITS - (internal transcribed spacer) внутренний транскрибируемый спейсер
- LD₅₀ - (lethal dose 50) полуметальная доза ингибирования
- MAGE - (multiplex automated genome engineering) мультиплексная автоматизированная геномная инженерия
- ML - (maximum likelihood) максимального правдоподобия
- ML - (machine learning) машинное обучение
- MMC - (microbial microdroplet culture) микрокапельная культура микроорганизмов
- MRSA - (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) метициллин-резистентный золотистый стафилококк
- CA-MRSA - (community associated MRSA) внегоспитальный метициллин-резистентный золотистый стафилококк
- NADP/NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат/его восстановленная форма
- NK - (natural killer) естественные киллеры
- NTG - (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин
- OD - (optical density) оптическая плотность
- PAL - (pathway activation level) уровень активации клеточных сигнальных путей
- PER - (protein efficiency ratio) прирост на грамм кормового белка
- Pgp - (p-glycoprotein) p-гликопротеин
- pH - водородный показатель
- PPV - (protein productive value) эффективность использования белка

PSB - (phosphate-buffered saline) фосфатно-солевой буферный раствор

RBS - (ribosome binding site) сайт связывания рибосом

RNAi - (RNA interference) РНК интерференция

SDS - (sodium dodecyl sulfate) додецилсульфат натрия

SE - (standard error) стандартная ошибка

SEM - (standard error of mean) стандартная ошибка среднего

SGR - (specific growth rate) удельная скорость роста

ssDNA - (single strand DNA) одноцепочечная ДНК

tALen - (transcription activator-like effector nucleases) эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции

TF - (transcription factor) факторы транскрипции

Ti - (tumor-inducing) опухоль-индуцирующий

TRL - (technology readiness levels) уровни технологической готовности

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вассер, С.П., Кондратьева, Н.В., Масюк, Н.П. и др. Водоросли. Справочник / С.П. Вассер, Н. В. Кондратьева, Н. П. Масюк Н. П. и др. – Киев : Наукова думка, 1989. – 608 с.
2. Горюнова, С. В., Ржанова, Г. Н., Орлеанский В. К. Синезеленые водоросли:(биохимия, физиология, роль в практике) / С. В. Горюнова, Г. Н. Ржанова, В. К. Орлеанский. – М.: Наука, 1969. – 230 с.
3. ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики. – М.: Издательство стандартов, 2014. – 22 с.
4. ГОСТ Р 56701-2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств»: [текст]. – М.: Стандартинформ, 2016. – 28 с.
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях: [текст] / Rus-LASA. – СПб.: Rus-LASA, 2012. – 48 с.
6. Ключ, В. П. Перспективы производства жидкого биотоплива второго поколения // IX міжнародна науково-практична конференція «Відновлювана енергетика XXI століття». – 2008. – С. 294-296.
7. Козлов, Е. Н., Муха, Д. В. Наночастицы: перспективы использования в медицине и ветеринарии // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132(5). – С. 435-447.
8. Коллекция живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ib.komisc.ru/sykoa>
9. Ленова, Л. И., Ступина, В. В. Водоросли в доочистке сточных вод / Л. И. Ленова, В. В. Ступина. – Киев : Наукова думка, 1990. – 184 с.
10. Минюк, Г. С. и др. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор // Морской экологический журнал. – 2008. – Т. 7. – №. 2. – С. 5- 23.
11. Наука. Продукты в разработке компании BIOCAD. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://biocad.ru/science> (дата обращения: 15.08.2024)
12. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 56701-2015 от 01.07.2016 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию

доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств»

13. Новиков, О. Н., Хакимова, Г. О. Биофлокуляция-биотехнологический элемент водных экосистем // Морская экология. – 2005: труды Международной научно-практической конференции, 2005. – С. 146-147.

14. ООО «Евразиябио». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.rusprofile.ru/id/2833214> (дата обращения: 15.08.2024)

15. Патент RU 2741703 С1. 2021. Платформа анализа генетической информации ONCOBOX /Буздин, А. А., Сорокин, М. И., Ткачев, В. С., Никитин, Д. М., Золотовская, М. А., Гаража А. В., Борисов, Н. М.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Онкобокс»; заявл. 01.03.2018; опубл. 28.01.2021.

16. Патент RU 2712265 С1. 2020 / Кузьмин, Д. В., Сорокин, Б.А., Филимонова, А. В., Емельянова, А. А., Ершова, О. А.; заявитель, патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «ВИРИДИАС».

17. Патент RU 2724334 С1. 3-триазеноиндолы, обладающие активностью против микобактерий / Апт, А.С., Вележева, В. С., Никоненко, Б. В., Корниенко, А. Г., Майоров, К. Б., Иванов, П.Ю., Кондратьева, Т. К., Коротецкая, М. В., Салина, Е. Г.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук; заявл. 10.11.2016; опубл. 23.06.2020.

18. Патент WO 2019/168426 Способ и система для оценки клинической эффективности таргетных лекарственных средств / Буздин, А. А., Сорокин, М. И., Ткачев, В. С., Никитин, Д. М., Золотовская, М. А., Гаража А. В., Борисов, Н. М.; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «Онкобокс» (“ONCOBOX” LTD); опубл. 06.09.2019.

19. Пульц, О. Ценные вещества из водорослей // Альгология. – 2000. – Т. 10. – №. 3. – С. 344-348.

20. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 N 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения или для получения разрешения на проведение клинических испытаний»: [текст]. – Минск, 2016. – 226 с.

21. Романенко, В. Д. Биотехнология культивирования гидробионтов / В.Д. Романенко, Ю.Г. Крот, Л.А. Сиренко, В.Д. Соломатина. – Киев : Институт гидробиологии НАН Украины, 1999. – 264 с.

22. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая: [текст] / Гриф и К. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
23. Сланикова, Т. А., Розенкранц, А. А., Лупанова, Т. Н., Гулак, П. В., Гнучев, Н. В., Соболев, А. С. Исследование эффективности модульного нанотранспортера для адресной доставки фото-сенсibilизаторов в ядра клеток меланомы *in vivo* // Доклады Академии наук. – 2012. – 46(3). – P. 342-344.
24. Таубаев, Т. Т. Система биологической очистки сточных вод при помощи протококковых водорослей, ряски, и других гидробионтов // Культивирование и применение микроводорослей в народном хозяйстве: материалы республиканской конференции. – 1980. – С. 113-115.
25. Технологическая платформа «Биоиндустрия и биоресурсы» (БиоТех2030). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://biotech2030.ru/platforma/o-nas/> (дата обращения: 15.08.2024)
26. Технологическая платформа «ЕвразияБИО». [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://biorosinfo.ru/tekhnologicheskaya-platforma-evraziyabio/> (дата обращения: 15.08.2024)
27. Янкевич, М. И. Формирование ремедиационных биоценозов для снижения антропогенной нагрузки на водные и почвенные экосистемы : дис. д-ра биол. наук : 03.00.23 / Янкевич Марина Ивановна. – Щелково, 2002. – 48 с.
28. Abd El Baky, H. H., El-Baroty, G. S., Bouaid, A. Lipid induction in *Dunaliella salina* culture aerated with various levels CO₂ and its biodiesel production // *Journal of Aquaculture Research & Development*. – 2014. – Vol. 5. – No. 3. – P. 1.
29. Abd El-Hack, M. E., Mohamed E. et al. Microalgae in modern cancer therapy: current knowledge // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 111. – P. 42-50.
30. 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.
31. Abedin, R. M. A., Taha, H. M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett- Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis* // *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. – 2008. – Vol. 3. – No. 1. – P. 22-31.
32. Adams, C. P., Brantner, V. V. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Affairs*. – 2006. – Vol. 25(2). – P. 420-428.
33. Adrio, J.-L., Demain, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products // *Bioengineered bugs*. – 2010. – Vol. 1. – No. 2. – P. 116-131.

34. Agu, C. V. et al. Development of a high-throughput assay for rapid screening of butanologenic strains // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – No. 1. – P. 3379.
35. 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.
36. Almåsbak, H., Aarvak, T., Vemuri, M. C. CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment // *Journal of Immunology Research*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 5474602.
37. 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.
38. Alonso, J. M. et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* // *Science*. – 2003. – Vol. 301. – No. 5633. – P. 653-657.
39. Altman, S. Antibiotics present and future // *FEBS Letters*. – 2014. – Vol. 588. – No 1. – P. 1-2.
40. Ambati, R. R. et al. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2019. – Vol. 59. – No. 12. – P. 1880-1902.
41. 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.
42. An, C.-Y. et al. 4-Phenyl-3, 4-dihydroquinolone derivatives from *Aspergillus nidulans* MA-143, an endophytic fungus isolated from the mangrove plant *Rhizophora stylosa* // *Journal of Natural Products*. – 2013. – Vol. 76. – No. 10. – P. 1896-1901. (a)
43. An, C.-Y. et al. Aniquinazolines A-D, four new quinazolinone alkaloids from marine-derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans* // *Marine Drugs*. – 2013. – Vol. 11. – No. 7. – P. 2682-2694. (b)
44. Anand, J. et al. Production and partial purification of α -amylase producing *Streptomyces* sp. SNAJSM6 isolated from seaweed *Sargassum myriocystum* J. Agardh // *Indian Journal of Geo Marine Sciences*. – 2019. – Vol. 48(8). – P. 1245-1251.
45. Andersen, R. A. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae // *American Journal of Botany*. – 2004. – Vol. 91. – P. 1508-1522.
46. Andrade, L. M. et al. *Chlorella* and *spirulina* microalgae as sources of functional foods // *Nutraceuticals and Food Supplements*. – 2018. – Vol. 6. – No. 1. – P. 45-58.

47. 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.
48. 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. – 2021. – Vol. 28. – P. 43234-43257.
49. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // Lancet. – 2022. – Vol. 399. – P. 629-655.
50. Aouir, A., Amiali, M., Bitam, A., Benchabane, A., Raghavan, V. G. Comparison of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA // Food Measure. – 2017. – Vol. 11. – P. 913-923.
51. Aymard, C., Bonaventura, C., Henkens, R., Mousty, C., Hecquet, L. et al. High-Throughput Electrochemical Screening Assay for Free and Immobilized Oxidases: Electrochemiluminescence and Intermittent Pulse Amperometry // ChemElectroChem. – 2017. – Vol. 4. – No. 4. – P. 957-966.
52. Baglieri, D., Baldi, F., Tucci, C. L. University technology transfer office business models: One size does not fit all // Technovation. – 2018. – Vol. 76. – P. 51-63.
53. Barka, A., Blecker, C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review // Base. – 2016. – Vol. 20(3). – P. 427-436.
54. Barsanti, L., Birindelli, L., Gualtieri, P. Water monitoring by means of digital microscopy identification and classification of microalgae // Environmental Science: Processes & Impacts. – 2021. – Vol. 23. – No. 10. – P. 1443-1457.
55. Bellou, S. et al. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives // Biotechnology Advances. – 2014. – Vol. 32. – No. 8. – P. 1476-1493.
56. Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Aggeli, D., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., Aggelis, G. Microbial oils as food additives: Recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content // Current Opinion in Biotechnology. – 2016. – Vol. 37. – P. 24-35.
57. Benavides, A. M. S., Torzillo, G., Kopecký, J., Masojídek, J. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds // Biomass and Bioenergy. – 2013. – Vol. 54. – P. 115-122.
58. Benner, S. A., Hutter, D., Sismour, A. M. Synthetic biology with artificially expanded genetic information systems. From personalized medicine to extraterrestrial life // Nucleic Acids Symposium Series. – 2003. – Vol. 3. – No. 1. – P. 125-126.

59. Berman, G. J, Choi, D. M., Bialek, W., Shaevitz, J. W. Mapping the stereotyped behaviour of freely moving fruit flies // *Journal of the Royal Society Interface*. – 2014. – Vol. 11(99). – P. 20140672.
60. Beta Carotene Market Size, Share & Growth Analysis Report, 2024-2032 // *Polaris Market Research*. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/beta-carotene-market>
61. Betancur, L. A. et al. NMR-based metabolic profiling to follow the production of anti-phytopathogenic compounds in the culture of the marine strain *Streptomyces* sp. PNM- 9 // *Microbiological research*. – 2020. – Vol. 239. – P. 126507.
62. Bhattacharjee, M. Pharmaceutically valuable bioactive compounds of algae // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2016. – Vol. 7. – P. 43-47.
63. Blaby, I. K., Lyons, B. J., Wroclawska-Hughes, E., Phillips, G. C., Pyle, T. P., Chamberlin, S. G., Benner, S. A., Lyons, T. J., de Crécy-Lagard, V., de Crécy, E. Experimental evolution of a facultative thermophile from a mesophilic ancestor // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – Vol. 78(1). – P. 144-55.
64. Blagojević, D. et al. Antioxidant activity and phenolic profile in filamentous cyanobacteria: The impact of nitrogen // *Journal of applied phycology*. – 2018. – Vol. 30. – P. 2337-2346.
65. Blair, M. F., Kokabian, B., Gude, V. G. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production // *Journal of environmental chemical engineering*. – 2014. – Vol. 2(1).. – P. 665-674.
66. Bligh, E. G., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. – 1959. – Vol. 37. – No. 8. – P. 911-917.
67. Bolatkhan, K., Akmukhanova, N. R., Zayadan, B. K., Sadvakasova, A. K., Sinetova, M. A., Los, D. A. Isolation and Characterization of Toxic Cyanobacteria from Different Natural Sources // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2017. – Vol. 53(7). – P. 754-760.
68. 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.
69. Borowitzka, M. A. High-value products from microalgae - their development and commercialisation // *Journal of applied phycology*. – 2013. – Vol. 25. – P. 743-756.
70. Bouyahya, A., Bakrim, S., Chamkhi, I., Taha, D., El Omari, N., El Mneyiy, N., El Hachlafi, N., El-Shazly, M., Khalid, A., Abdalla, A. N., Goh, K. W., Ming, L. C., Goh, B. H., Aanniz, T. Bioactive substances of cyanobacteria and microalgae: Sources, metabolism, and

anticancer mechanism insights // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2023. – Vol. 170. – P. 115989.

71. Boyle, N. R., Sengupta, N., Morgan, J. A. Metabolic flux analysis of heterotrophic growth in *Chlamydomonas reinhardtii* // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12(5). – P. e0177292.

72. Braña, A. F. et al. Desertomycin G, a new antibiotic with activity against *Mycobacterium tuberculosis* and human breast tumor cell lines produced by *Streptomyces althioticus* MSM3, isolated from the Cantabrian Sea Intertidal macroalgae *Ulva* sp // *Marine Drugs*. – 2019. – Vol. 17(2). – P. 114.

73. Braña, A. F. et al. Two *Streptomyces* species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central Cantabrian Sea // *Microbial ecology*. – 2015. – Vol. 69. – P. 512-524.

74. Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., Wijffels, R. H. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains // *Bioresource Technology*. – 2012. – Vol. 124. – P. 217-226.

75. Bryant, J. M. et al. CRISPR in Parasitology: Not Exactly Cut and Dried! // *Trends in Parasitology*. – 2019. – Vol. 35. – P. 409-422.

76. Bule, M. H., Ahmed, I., Maqbool, F., Bilal, M., Iqbal, H. M. N. Microalgae as a source of high-value bioactive compounds // *Frontiers in Bioscience-Scholar*. – 2018. – Vol. 10(2). – P. 197-216.

77. Buzdin, A., Sorokin, M., Garazha, A., Sekacheva, M., Kim, E., Zhukov, N., Wang, Y., Li, X., Kar, S., Hartmann, C., Samii, A., Giese, A., Borisov, N. Molecular pathway activation - New type of biomarkers for tumor morphology and personalized selection of target drugs // *Seminars in Cancer Biology*. – 2018. – Vol. 53. – P. 110-124.

78. Bwapwa, J. K., Anandraj, A., Trois, C. Possibilities for conversion of microalgae oil into aviation fuel: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2017. – Vol. 80. – P. 1345-1354.

79. Byun, Y., Han, K. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25. – No. 11. – P. 1435-1437.

80. Caisová, L., Marin, B., Melkonian, M. A consensus secondary structure of ITS2 in the chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction // *Protist*. – 2013. – Vol. 164. – No. 4. – P. 482-496.

81. Callaway, E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide // *Nature*. – 2020. – Vol. 580. – P. 576-577.

82. Camacho-Rodríguez, J. et al. The influence of culture conditions on biomass and high value product generation by *Nannochloropsis gaditana* in aquaculture // *Algal Research*. – 2015. – Vol. 11. – P. 63-73.
83. Camacho-Rodríguez, J., González-Céspedes, A. M., 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.
84. Cancer today // International Agency for Research on Cancer. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gco.iarc.fr/today/en>
85. Carbonell, P. et al. An automated Design-Build-Test-Learn pipeline for enhanced microbial production of fine chemicals // *Communications biology*. – 2018. – Vol. 1(1). – P. 66.
86. Capasso, M., Franceschi, M., Rodriguez-Castro, K. I., Crafa, P., Cambiè, G., Miraglia, C., Barchi, A., Nouvenne, A., Leandro, G., Meschi, T., De' Angelis, G. L., Di Mario, F. Epidemiology and risk factors of pancreatic cancer // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2018. – Vol. 89(9-S). – P. 141-146.
87. Carroll, A. R. et al. Marine natural products // *Natural product reports*. – 2023. – Vol. 40(2). – P. 275-325.
88. Catanzaro, E., Bishayee, A., Fimognari, C. On a beam of light: Photoprotective activities of the marine carotenoids astaxanthin and fucoxanthin in suppression of inflammation and cancer // *Marine drugs*. – 2020. – Vol. 18(11). – P. 544.
89. Chang, L., Karlin, K. Deep-dive into platform biotech companies: phenotypes, business models, destinations. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://biodraft.substack.com/p/deep-dive-into-platform-biotech-companies>
90. Chaturvedi, R., Fujita Y. Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level // *Phycological Research*. – 2006. – Vol. 54(3). – P. 208-219.
91. Chavda, V. P. Nanobased nano drug delivery: a comprehensive review // *Applications of targeted nano drugs and delivery systems*. – 2019. – P. 69-92.
92. Chen, C. Y., Nagarajan, D., Cheah, W. Y. Eicosapentaenoic acid production from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using deep sea water in outdoor plastic- bag type photobioreactors // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 253. – P. 1-7.
93. Chen, C.-H., Wu, P.-H., Lu, M.-C., Ho, M.-W., Hsueh, P.-R. SMART Program Study Group National surveillance of antimicrobial susceptibilities to ceftaroline, dalbavancin,

telavancin, tedizolid, eravacycline, omadacycline, and other comparator antibiotics, and genetic characteristics of bacteremic *Staphylococcus aureus* isolates in adults: Results from the Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) program in 2020 // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2023. – Vol. 61. – P. 106745.

94. Chen, C.-Y., Chen, Y.-C., Huang, H.-C., Huang, C.-C., Lee, W.-L., Chang, J.-S. 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.

95. Chen, H., Wang Q. Microalgae-based nitrogen bioremediation // *Algal Research*. – 2020. – Vol. 46. – P. 101775.

96. Chen, H., Wang, Q. Regulatory mechanisms of lipid biosynthesis in microalgae // *Biological Reviews*. – 2021. – Vol. 96(5). – P. 2373-2391.

97. Chen, H., Wang, X., Wang, Q. Microalgal biofuels in China: The past, progress and prospects // *GCB Bioenergy*. – 2020. – Vol. 12(12). – P. 1044-1065.

98. Chen, H., Wang, Q. Microalgae-Based Green Bio-Manufacturing-How Far From Us // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 832097.

99. Chen, P. et al. Microfluidics towards single cell resolution protein analysis // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2019. – Vol. 117. – P. 2-12. (a).

100. Chen, W. et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae // *Journal of Microbiological Methods*. – 2009. – Vol. 77. – No. 1. – P. 41-47.

101. Chen, W., Zhang, C. H., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. A high throughput Nile Red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae // *Journal of Microbiological Methods*. – 2009. – Vol. 77. – P. 41-47.

102. Chen, X. et al. Partial characterization, the immune modulation and anticancer activities of sulfated polysaccharides from filamentous microalgae *Tribonema* sp // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24(2). – P. 322. (b).

103. Chen, Y. C., Huang, H. C., Ho, S. H., Chang, J. S. Enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using innovative photobioreactors with optimal light source arrangements // *Bioresource Technology*. – 2015. – Vol. 191. – P. 407-413.

104. Chen, Y. J., Abila, B., Mostafa Kamel, Y. CAR-T: what is next? // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15(3). – P. 663.

105. Chen, Z. et al. New α -glucosidase inhibitors from marine algae-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434 // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6(1). – P. 20004.

106. 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.
107. Chew, K. W. et al. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review // *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. – 2018. – Vol. 91. - P. 332-344.
108. Chinnasamy, S. et al. 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.
109. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae // *Biotechnology advances*. – 2007. – Vol. 25(3). – P. 294-306.
110. Cho, J. Y. Glycoglycerolipids isolated from marine derived *Streptomyces coelestis* PK206-15 // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2012. – Vol. 76(9). – P. 1746-1751.
111. Cho, J. Y. et al. Isolation and structural determination of the antifouling diketopiperazines from marine-derived *Streptomyces praecox* 291-11 // *Bioscience, biotechnology and biochemistry*. – 2012. – Vol. 76(6). – P. 1116-1121.
112. Cho, J. Y., Kim, M. S. Antibacterial benzaldehydes produced by seaweed- derived *Streptomyces atrovirens* PK288-21 // *Fisheries science*. – 2012. – Vol. 78. – P. 1065-1073.
113. Choi, H. J. et al. Production of agarase from a novel *Micrococcus* sp. GNUM-08124 strain isolated from the East Sea of Korea // *Biotechnology and bioprocess engineering*. – 2011. – Vol. 16. – P. 81-88.
114. Choi, Y. K. et al. Enhanced growth and total fatty acid production of microalgae under various lighting conditions induced by flashing light // *Engineering in Life Sciences*. – 2017. – Vol. 17(9). – P. 976-980.
115. Chou, N. T. et al. *Chlorella sorokiniana*-Induced Activation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells through NF- κ B and PI3K/MAPK Pathways // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2012. – Vol. 1. – P. 735396.
116. Coleman, A. B. Positive and negative regulation of cellular sensitivity to anti-cancer drugs by FGF-2 // *Drug Resistance Updates*. – 2003. – Vol. 6. – P. 85-94.
117. Connectivity Map (CMap) // Broad Institute. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clue.io/query>
118. Connectopedia: The CLUE Knowledge Base. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clue.io/connectopedia/>

119. Conteratto, C. et al. Biorefinery: A comprehensive concept for the sociotechnical transition toward bioeconomy // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2021. – Vol. 151. – P. 111527.
120. Cook, O., Hildebrand, M. Enhancing LC-PUFA production in *Thalassiosira pseudonana* by overexpressing the endogenous fatty acid elongase genes // *Journal of Applied Phycology*. – 2016. – Vol. 28. – P. 897-905.
121. Costa, J. A. C., Morais, M. G. Microalgae for food production // *Fermentation Process Engineering in the Food Industry*. Eds. Taylor & Francis. – 2013. – P. 486.
122. 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.
123. Cuellar-Bermudez, S. P. et al. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins // *Microbial biotechnology*. – 2015. – Vol. 8(2). – P. 190-209.
124. Cyranoski, D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time // *Nature*. – 2016. – Vol. 539(7630). – P. 479.
125. 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.
126. da Fontoura, J. T. et al. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp // *Process Safety and Environmental Protection*. – 2017. – Vol. 111. – P. 355-362.
127. Daboussi, F. et al. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology // *Nature communications*. – 2014. – Vol. 5(1). – P. 3831.
128. Dahmen, N., Henrich, E., Henrich, T. Synthesis gas biorefinery // *Biorefineries*. – 2019. – P. 217-245.
129. Dara, S. et al. Machine learning in drug discovery: a review // *Artificial intelligence review*. – 2022. – Vol. 55(3). – P. 1947-1999.
130. Daughbjerg, N., Andersen, R. A. Phylogenetic analyses of the *rbcL* sequences from haptophytes and heterokont algae suggest their chloroplasts are unrelated // *Molecular Biology and Evolution*. – 1997. – Vol. 14. – No. 12. – P. 1242-1251.
131. Davis, D. et al. Life cycle assessment of heterotrophic algae omega- 3 // *Algal Research*. – 2021. – Vol. 60. – P. 102494.

132. De Alva, M. S. et al. Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes // *Algal Research*. – 2018. – Vol. 34. – P. 97-103.
133. De Lorenzo, V., Krasnogor, N., Schmidt, M. For the sake of the Bioeconomy: define what a Synthetic Biology Chassis is! // *New Biotechnology*. – 2021. – Vol. 60. – P. 44-51.
134. De Morais, M. G. et al. Biologically active metabolites synthesized by microalgae // *BioMed research international*. – 2015. – Vol. 1. – P. 835761.
135. De Riso, V. et al. Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* // *Nucleic acids research*. – 2009. – Vol. 37(14). – P. e96-e96.
136. Debon, A. et al. Ultrahigh-throughput screening enables efficient single-round oxidase remodelling // *Nature Catalysis*. – 2019. – Vol. 2(9). – P. 740-747.
137. Dekker, L., Polizzi, K. M. Sense and sensitivity in bioprocessing - detecting cellular metabolites with biosensors // *Current opinion in chemical biology*. – 2017. – Vol. 40. – P. 31-36.
138. Del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Licea-Navarro, A., Bernáldez-Sarabia, J. Evaluation of the antibacterial activity of different species of phytoplankton // *Revista de biología marina y oceanografía*. – 2010. – Vol. 45(3). – P. 531-536.
139. Demirel, Z., Yilmaz, F. F., Ozdemir, G., Dalay, M. C. Influence of media and temperature on the growth and the biological activities of *Desmodesmus protuberans* (F.E. Fritsch & M.F. Rich) E. Hegewald // *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 2018. – Vol. 18. – P. 1195-1203.
140. Denizot, F., Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability // *Journal of Immunological Methods*. – 1986. – Vol. 89. – No. 2. – P. 271-277.
141. Deruyck, B. et al. Modeling the impact of rotifer contamination on microalgal production in open pond, photobioreactor and thin layer cultivation systems // *Algal Research*. – 2019. – Vol. 38. – P. 101398.
142. Desbois, A. P. et al. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum* // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2008. – Vol. 81(4). – P. 755-764.
143. Dineshkumar, R. et al. Microalgae as bio-fertilizers for rice growth and seed yield productivity // *Waste and biomass valorization*. – 2018. – Vol. 9. – P. 793-800.
144. Dixon, C., Wilken, L. R. Green microalgae biomolecule separations and recovery // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2018. – Vol. 5(1). – P. 1-24.

145. Djinni, I. et al. Antibacterial polyketides from the marine alga-derived endophytic *Streptomyces sundarbansensis*: a study on hydroxypyronone tautomerism // *Marine Drugs*. – 2013. – Vol. 11(1). – P. 124-135.
146. Dodds, E. D. et al. Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry // *Lipids*. – 2005. – Vol. 40. – No. 4. – P. 419-428.
147. Dogné, S., Flamion, B. Endothelial Glycocalyx Impairment in Disease: Focus on Hyaluronan Shedding // *The American Journal of Pathology*. – 2020. – Vol. 190. – P. 768-780.
148. Dolganyuk, V. et al. Microalgae: A promising source of valuable bioproducts // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10(8). – P. 1153.
149. Domagala, J. M., Hanna, L. D., Heifetz, C. L., Hutt, M. P., Mich, T. F., Sanchez, J. P., Solomon, M. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1986. – Vol. 29. – P. 394-404.
150. Dörr, J. M., Scheidelaar, S., Koorengel, M. C., Dominguez, J. J., Schäfer, M., van Walree, C. A., Killian, J. A. The styrene-maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research // *European Biophysics Journal*. – 2016. – Vol. 45(1). – P. 3-21.
151. Dos Santos, J. D. N., João, S. A., Martín, J., Vicente, F., Reyes, F., Lage, O. M. iChip-Inspired Isolation, Bioactivities and Dereplication of *Actinomycetota* from Portuguese Beach Sediments // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10(7). – P. 1471.
152. Dragone, G. et al. Third generation biofuels from microalgae // *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. – 2010. – Vol. 2. – P. 1355-1366.
153. Drews, P. et al. Microalgae classification using semi- supervised and active learning based on Gaussian mixture models // *Journal of the Brazilian Computer Society*. – 2013. – Vol. 19. – P. 411-422.
154. Du, B. et al. Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* under acid stress // *Microbiology*. – 2020. – Vol. 166(2). – P. 141-148.
155. Du, Y. et al. New α -pyridones with quorum-sensing inhibitory activity from diversity-enhanced extracts of a *Streptomyces* sp. derived from marine algae // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2018. – Vol. 66(8). – P. 1807-1812.
156. DuBois, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances // *American Chemical Society*. – 1956. – Vol. 28. – No. 3. – P. 350-356.
157. Duff, D. C., Bruce, D. L., Antia, N. J. The antibacterial activity of marine planktonic algae // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1966. – Vol. 12(5). – P. 877-884.

158. Duran, I., Rubiera, F., Pevida, C. Microalgae: Potential precursors of CO₂ adsorbents // *Journal of CO₂ Utilization*. – 2018. – Vol. 26. – P. 454-464.
159. Dürrschmidt, M. A taxonomic study of the *Mallomonas mangofera* group (*Mallomonadaceae*, *Chrysophyceae*), including the description of four new taxa. *Plant systematics and evolution*. – 1983. – Vol. 143. – P. 175-196.
160. Dürrschmidt, M., Croome, R. *Mallomonadaceae* (*Chrysophyceae*) from Malaysia and Australia. *Nordic Journal of Botany*. – 1985. – Vol. 5. – P. 285-298.
161. Dvorak, P. et al. Diversity of the cyanobacteria // *Modern topics in the phototrophic prokaryotes: Environmental and applied aspects*. – 2017. – P. 3-46.
162. Ejike, C. ECC. et al. 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.
163. El-Dahhar, A. A. Review article on protein and energy requirements of tilapia and mullet // *Journal of World Aquaculture Society*. – 2007. – Vol. 2. – P. 1-28.
164. Eliwa, E. M. et al. New naturally occurring phenolic derivatives from marine *Nocardiopsis* sp. AS23C: Structural elucidation and in silico computational studies // *Vietnam Journal of Chemistry*. – 2019. – Vol. 57(2). – P. 164-174.
165. El-Mekkawi, S. A. et al. Assessment of stress conditions for carotenoids accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* as added-value algal products // *Bulletin of the National Research Centre*. – 2019. – Vol. 43. – P. 1-9.
166. El-Naggar, N. EA. et al. Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10(1). – P. 3011.
167. Erdoğan, A., Karataş, A.B., Demirel, Z., Dalay, M. C. Purification of Fucoxanthin from the Diatom *Amphora capitellata* by Preparative Chromatography after Its Enhanced Productivity via Oxidative Stress // *Journal of Applied Phycology*. – 2022. – Vol. 34. – P. 301-309.
168. Fabris, M., George, J., Kuzhiumparambil, U., Lawson, C. A., Jaramillo-Madrid, A. C., Abbriano, R. M., Vickers, C. E., Ralph, P. Extrachromosomal genetic engineering of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* enables the heterologous production of monoterpenoids // *ACS Synthetic Biology Journal*. – 2020. – Vol. 9(3). – P. 598-612.
169. Falaise, C. et al. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture // *Marine drugs*. – 2016. – Vol. 14(9). – P. 159.
170. Faraloni, C., Torzillo, G. Synthesis of antioxidant carotenoids in microalgae in response to physiological stress // *United Kingdom: IntechOpen*. – 2017. – P. 143-157.

171. Ferreira, G. F., Ríos Pinto, L. F., Maciel Filho, R., Fregolente, L. V. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2019. – Vol. 109. – P. 448-466.
172. Figueirêdo, P. de M. S., Sampaio Filho, J. C., Sodrê, A. de J. S., de Castro Júnior, J. R., Gonçalves, I. S., Blasques, R. V., Correa, R. S., Lima, B. A. V., Dos Anjos Marques, L., Coutinho D. F. et al. Assessment of the biological potential of diaryltriazeno-derived triazeno compounds // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – P. 2541.
173. Fischer, N., Rochaix, J-D. The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2001. – Vol. 265. – P. 888-894.
174. Foo, S. C. et al. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents // *Journal of biotechnology*. – 2017. – Vol. 241. – P. 175-183.
175. Foo, S. C., Yusoff, F., Ismail, M., Basri, M., Chan, K.W., Khong, N., Yau, S. (2015). Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968 // *Algal Research*. – 2015. – Vol. 12. – P. 26-32.
176. Frangoul, H. et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia // *The New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384(3). – P. 252-260.
177. Fu, W. et al. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2013. – Vol. 97. – P. 2395-2403.
178. Fucikova, K., Flechtner, V. R., Lewis, L. A. Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach // *Nova Hedwigia*. – 2012. – Vol. 96(1-2). – P. 15-59.
179. Fujiwara, T. et al. Gene targeting in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*: single- and multi-copy insertion using authentic and chimeric selection markers // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(9). – P. e73608.
180. Breuer, G., Lamers, P., Martens, D., Draaisma, R., Wijffels Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus* // *Bioresource Technology*. – 2013. – Vol. 143. – P. 1-9.
181. Gagnard, C. et al. Screening of marine microalgae: Investigation of new exopolysaccharide producers // *Algal Research*. – 2019. – Vol. 44. – P. 101711.
182. Galasso, C. et al. Microalgal derivatives as potential nutraceutical and food supplements for human health: A focus on cancer prevention and interception // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11(6). – P. 1226.

183. Galloway, A. W., Winder, M. Partitioning the relative importance of phylogeny and environmental conditions on phytoplankton fatty acids // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – No. 6. – P. e0130053.
184. 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.
185. Garcia-Pichel, F. *Cyanobacteria* // *Encyclopedia of Microbiology*, Third Edition. Elsevier. – 2009. – P. 107-124.
186. Gardeva, E. et al. Cancer protective action of polysaccharide, derived from red microalga *Porphyridium cruentum* – a biological background // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2009. – Vol. 23(1). – P. 783-787.
187. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109(39). – P. E2579-86.
188. Georgianna, D. R., Mayfield, S. P. Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels // *Nature*. – 2012. – Vol. 488(7411). – P. 329-335.
189. 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.
190. Ghasemi, Y. et al. Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran: characterization of antimicrobial activity of *Chroococcus disperses* // *Journal of Biological Sciences*. – 2007. – Vol. 7. – P. 904-910.
191. Ghazawi, K. F., Fatani, S. A., Mohamed, S. G., Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. *Aspergillus nidulans* - natural metabolites powerhouse: structures, biosynthesis, bioactivities, and biotechnological potential // *Fermentation*. – 2023. – Vol. 9(4). – P. 325.
192. Girão, M. et al. Actinobacteria isolated from *Laminaria ochroleuca*: a source of new bioactive compounds // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 428916.
193. Goiris, K. et al. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae // *Algal Research*. – 2015. – Vol. 7. – P. 51-57.
194. Gonzalez-Ballester, D. et al. Reverse genetics in *Chlamydomonas*: a platform for isolating insertional mutants // *Plant Methods*. – 2011. – Vol. 7. – P. 1-13.
195. Griesbeck, C., Kobl, I., Heitzer, M. *Chlamydomonas reinhardtii*: a protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins // *Molecular Biotechnology*. – 2006. – Vol. 34(2). – P. 213-223.

196. Griffiths, M. J., Harrison, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production // *Journal Applied Phycology*. – 2009. – Vol. 21. – P. 493-507.
197. Groendahl, S., Kahlert, M., Fink, M. The best of both worlds: A combined approach for analyzing microalgal diversity via metabarcoding and morphology-based methods // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12(2). – P. e0172808.
198. Grossi, A. P., Ruggieri, A., Vecchio, A. D., Comandini, A., Corio, L., Calisti, F., Loreto, G. D., Almirante, B. Skin infections in Europe: a retrospective study of incidence, patient characteristics and practice patterns // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2022. – Vol. 60. – P. 106637.
199. Grudzinski, W. et al. Strong-light-induced yellowing of green microalgae *Chlorella*: a study on molecular mechanisms of the acclimation response // *Algal Research*. – 2016. – Vol. 16. – P. 245-254.
200. Guidance for Industry M4S: The CTD - Safety. : ICH, 2001. – 26 p.
201. Guillard, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in «Culture of Marine Invertebrate Animals» // Plenum Press. – 1975. – P. 26-60.
202. Guillard, R. R. L., Lorenzen, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide $C^{1,2}$ // *Journal of Phycology*. – 1972. – Vol. 8. – No. 1. – P. 10-14.
203. Guillard, R. R. L., Ryther, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1962. – Vol. 8. – P. 229-239.
204. Guiry, M. D. How many species of algae are there? // *Journal of phycology*. – 2012. – Vol. 48(5). – P. 1057-1063.
205. Guler, B. A., Deniz, I., Demirel, Z., Oncel, S., Imamoglu, E. Transition from start-up to scale-up for fucoxanthin production in flat plate photobioreactor // *Journal of Applied Phycology*. – 2019. – Vol. 31. – P. 1525-1533.
206. Gürlek, C., Yarkent, C., Köse, A., Oral, I., Öncel, S.S., Elibol, M. Evaluation of several microalgal extracts as bioactive metabolites as potential pharmaceutical compounds. // *CMBEBIH 2019; Springer Nature*. – 2019. – P. 267-272.
207. Gusev, E. S. et al. 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. – No. 1. – P. 38-47.
208. Gusev, E. S., Martynenko, N. A., Podunay, Y. A., **Kuzmin, D. V.** Morphology, phylogenetic position and distribution of *Mallomonas mangofera* and *Mallomonas foveata* comb.

- et stat. nov. (Synurales, Chrysophyceae) // *Phytotaxa*. – 2024. – Vol. 662. – No. 3. – P. 224-238.
- (a)
209. Gusev, E. S., Podunay, Y. A., Martynenko, N. A., Tran, H., **Kuzmin, D. V.** *Mallomonas gemina* comb. et stat. nov. (Synurales, Chrysophyceae) – a new combination based on molecular studies // *Phytotaxa*. – 2024. – Vol. 665. – P. 221-232. (b)
210. Gupta, S., Radhakrishnan, A., Raharja-Liu, P., Lin, G., Steinmetz, L. M., Gagneur, J., Sinha, H. Temporal expression profiling identifies pathways mediating effect of causal variant on phenotype // *PLOS Genetics*. – 2015. – Vol. 11(6). – P. e1005195.
211. Hallagan, J. B., Hall, R. L., Drake, J. The GRAS provision - the FEMA GRAS program and the safety and regulation of flavors in the United States // *Food and Chemical Toxicology*. – 2020. – Vol. 138. – P. 111236.
212. Hamilton, M. L. et al. Towards the industrial production of omega- 3 long chain polyunsaturated fatty acids from a genetically modified diatom *Phaeodactylum tricornutum* // *PLoS one*. – 2015. – Vol. 10(12). – P. e0144054.
213. Han, D., Jia, J., Li, J., Sommerfeld, M., Xu, J., Hu, Q. Metabolic remodeling of membrane glycerolipids in the microalga *Nannochloropsis oceanica* under nitrogen deprivation // *Frontiers in Marine Science*. – 2017. – Vol. 4. – P. 242.
214. Hanson, K. M., Finkelstein, J. N. An accessible and high- throughput strategy of continuously monitoring apoptosis by fluorescent detection of caspase activation // *Analytical biochemistry*. – 2019. – Vol. 564. – P. 96-101.
215. Harris, K., Bradley, D. E. A taxonomic study of *Mallomonas* // *Journal of General Microbiology*. – 1960. – Vol. 22. – P. 750-777.
216. Harris, J. L., Bargh, J. A., Brownell, K. D. Priming effects of television food advertising on eating behavior // *Health Psychology*. – 2009. – Vol. 28(4). – P. 404-13.
217. Harloff-Helleberg, S., Nielsen, L. H., Nielsen, H. M. Animal models for evaluation of oral delivery of biopharmaceuticals // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – Vol. 268. – P. 57-71.
218. Hayashi, O., Katoh, T., Okuwaki, Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis* // *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*. – 1994 – Vol. 40. – P. 431-441.
219. He, Y. et al. Ramanome technology platform for label- free screening and sorting of microbial cell factories at single- cell resolution // *Biotechnology Advances*. – 2019. – Vol. 37(6). – P. 107388.

220. Hempel, F. et al. From hybridomas to a robust microalgal-based production platform: molecular design of a diatom secreting monoclonal antibodies directed against the Marburg virus nucleoprotein // *Microbial Cell Factories*. – 2017. – Vol. 16(1). – P. 131.
221. Hockin, N. L. et al. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants // *Plant physiology*. – 2012. – Vol. 158(1). – P. 299-312.
222. Hu, Q., Hu, Z., Cohen, Z., Richmond, A. Enhancement of eicosapentaenoic acid (EPA) and gamma- linolenic acid (GLA) production by manipulating algal density of outdoor cultures of *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta) and *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) // *European Journal of Phycology*. – 1997. – Vol. 32. – P. 81-86.
223. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances // *Plant Journal*. – 2008. – Vol. 54. – P. 621-639.
224. Hu, Y., Shi, H., Zhou, M., Ren, Q., Zhu, W., Zhang, W., Zhang, Z., Zhou, C., Liu, Y., Ding, X. et al. Discovery of Pyrido[2,3- b] indole Derivatives with Gram-negative Activity Targeting Both DNA Gyrase and Topoisomerase IV // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 63. – P. 9623-9649.
225. Iasimone, F. et al. Effect of light intensity and nutrients supply on microalgae cultivated in urban wastewater: Biomass production, lipids accumulation and settleability characteristics // *Journal of Environmental Management*. – 2018. – Vol. 223. – P. 1078-1085.
226. Iyer, K. R., Li, S. C., Revie, N. M., Lou, J. W., Duncan, D., Fallah, S., Sanchez, H., Skulska, I., Ušaj, M.M., Safizadeh, H., Larsen, B., Wong, C., Aman, A., Kiyota, T., Yoshimura, M., Kimura, H., Hirano, H., Yoshida, M., Osada, H., Gingras, A.-C., Andes, D. R., Shapiro, R. S., Robbins, N., Mazhab-Jafari, M. T., Whitesell, L., Yashiroda, Y., Boone, C., Cowen, L.E. Identification of triazenyl indoles as inhibitors of fungal fatty acid biosynthesis with broad-spectrum activity // *Cell Chemical Biology*. – 2023. – Vol. 30(6). – P. 795-810.
227. Izquierdo, M., Hernández-Palacios, H. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. In: Tacon A.G.J., Basurco B. // *Feeding tomorrow's fish*. Zaragoza: Ciheam. – 1997. – P. 243-264.
228. Jabeen, A., Reeder, B.J., Hisaindee, S., Ashraf, S., Al Darmaki, N., Battah, S., Al-Zuhair, S. Effect of Enzymatic pre-treatment of microalgae extracts on their anti-tumor activity // *Biomedical Journal*. – 2017. – Vol. 40. – P. 339-346.
229. 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.

230. Janik, E., Niemcewicz, M., Ceremuga, M., Krzowski, L., Saluk-Bijak, J., Bijak, M. Various Aspects of a Gene Editing System-CRISPR-Cas9 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21(24). – P. 9604.

231. Javee, A., Karuppan, R., Subramani, N. Bioactive glycolipid biosurfactant from seaweed *Sargassum myriocystum* associated bacteria *Streptomyces* sp. SNJASM6 // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – Vol. 23. – P. 101505.

232. Jiang, Z.-D., Jensen, P. R., Fenical, W. Lobophorins A and B, new antiinflammatory macrolides produced by a tropical marine bacterium // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 1999. – Vol. 9(14). – P. 2003-2006.

233. Jin, L., Quan, C., Hou, X., Fan, S. Potential pharmacological resources: Natural bioactive compounds from marine- derived fungi // *Marine Drugs*. – 2016. – Vol. 14. – P. 76.

234. Jo, B. Y. et al. Multigene phylogeny of *Synura* (Synurophyceae) and descriptions of four new species based on morphological and DNA evidence // *European Journal of Phycology*. – 2016. – Vol. 51. – No. 4. – P. 413-430.

235. Johnson, M. B., Wen, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2010. – Vol. 85. – P. 525-534.

236. Jones, C. S. et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2013. – Vol. 97. – P. 1987-1995.

237. Jones, M. R., Pinto, E., Torres, M. A., Dörr, F., Mazur-Marzec, H., Szubert, K., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Miles, C. O., Beach, D. G., McCarron, P., Sivonen, K., Fewer, D. P., Jokela, J., Janssen, E. M. CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria // *Water Research*. – 2021. – Vol. 196. – P. 117017.

238. Johnson, M. H. Biological motion: a perceptual life detector? // *Current Biology*. – 2006. – Vol. 16(10). – P. R376-7.

239. Josephine, A. et al. Analytical evaluation of different carbon sources and growth stimulators on the biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris*-Implications for biofuels // *Biomass and bioenergy*. – 2015. – Vol. 75. – P. 170-179.

240. 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.

241. 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.
242. 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.
243. Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet // *Aquaculture Nutrition*. – 2008. – Vol. 14. – P. 533-543.
244. Jungnick, N. et al. The carbon concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: finding the missing pieces // *Photosynthesis Research*. – 2014. – Vol. 121. – P. 159-173.
245. Kadkhodaei, S. et al. Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic conditions using response surface methodology // *RSC Advances*. – 2015. – Vol. 5(48). – P. 38141-38151.
246. Kampers, L. FC. et al. In silico-guided engineering of *Pseudomonas putida* towards growth under micro-oxic conditions // *Microbial Cell Factories*. – 2019. – Vol. 18. – P. 1-14.
247. Kampers, L. F., Asin-Garcia, E., Schaap, P. J., Wagemakers, A., Martins dos Santos, V. A. Navigating the Valley of Death: Perceptions of Industry and Academia on Production Platforms and Opportunities in Biotechnology // *EFB Bioeconomy Journal*. – 2022. – Vol. 2. – P. 100033.
248. Kang, W. H., Sim, Y. M, Koo, N., Nam, J. Y., Lee, J., Kim, N., Jang, H., Kim, Y. M., Yeom, S. I. Transcriptome profiling of abiotic responses to heat, cold, salt, and osmotic stress of *Capsicum annuum* L // *Scientific Data*. – 2020. – Vol. 7(1). – P. 17.
249. Katana, A. et al. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // *Journal of Phycology*. – 2001. – Vol. 37. – No. 3. – P. 443-451.
250. Katif, C. et al. Isolation and structure elucidation of desferrioxamine B and the new desferrioxamine B2 antibiotics from a brown marine macroalga *Carpodesmia tamariscifolia* associated *Streptomyces* isolate // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. – 2022. – Vol. 12. – P. 5647-5662.
251. Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // *Briefings in Bioinformatics*. – 2019. – Vol. 20. – No. 4. – P. 1160-1166.

252. Katoh, K., Toh, H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program // *Bioinformatics*. – 2010. – Vol. 26. – No. 15. – P. 1899-1900.
253. Keith Hamby, R. et al. Direct ribosomal RNA sequencing: Optimization of extraction and sequencing methods for work with higher plants // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 1988. – Vol. 6. – No. 3. – P. 175-192.
254. Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J., Stelzer, E. H. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy // *Science*. – 2008. – Vol. 322(5904). – P. 1065-1069.
255. Khanra, S. et al. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review // *Food and bioproducts processing*. – 2018. – Vol. 110. – P. 60-84.
256. 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.
257. Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus* // *Phytochemistry*. – 2006. – Vol. 67. – P. 696-701.
258. Kilic, S., Felekyan, S., Doroshenko, O., Boichenko, I., Dimura, M., Vardanyan, H., Bryan, L. C., Arya, G., Seidel, C. A. M., Fierz, B. Single-molecule FRET reveals multiscale chromatin dynamics modulated by HP1 α // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9(1). – P. 235.
259. Kim, M. C. et al. Integration of genomic data with NMR analysis enables assignment of the full stereostructure of neaumycin B, a potent inhibitor of glioblastoma from a marine- derived *Micromonospora* // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140(34). – P. 10775-10784.
260. Kim, S. M. et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2012. – Vol. 166. – P. 1843-1855.
261. 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 Applied Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 55. – P. 477-483.
262. Kobayashi, M. et al. Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga *Haematococcus pluvialis* // *Biotechnology Techniques*. – 1997. – 11(9). – P. 657-660.
263. Koetschan, C. et al. The ITS2 Database III--sequences and structures for phylogeny // *Nucleic Acids Research*. – 2010. – Vol. 38. – P. D275-279.

264. Koller, M., Muhr, A., BrauneGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products // *Algal research*. – 2014. – Vol. 6. – P. 52-63.
265. König, I. R. et al. What is precision medicine? // *European respiratory journal*. – 2017. – Vol. 50(4). – P. 1700391
266. Kosa, G. et al. FTIR spectroscopy as a unified method for simultaneous analysis of intra- and extracellular metabolites in high- throughput screening of microbial bioprocesses // *Microbial cell factories*. – 2017. – Vol. 16. – P. 1-11.
267. Kosorok, M. R., Laber, E. B. Precision medicine // *Annual review of statistics and its application*. – 2019. – Vol. 6(1). – P. 263-286.
268. Kowalski, P. S., Rudra, A., Miao, L., Anderson, D. G. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery // *Molecular Therapy journals*. – 2019. – Vol. 27(4). – P. 710-728.
269. Kuhne, S. et al. A new photobioreactor concept enabling the production of desiccation induced biotechnological products using terrestrial cyanobacteria // *Journal of Biotechnology*. – 2014. – Vol. 192. – P. 28-33.
270. Kumar, G. et al. Bioengineering of microalgae: recent advances, perspectives, and regulatory challenges for industrial application // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 914.
271. Kumar, M. S., Ramesh, A., Nagalingam, B. An experimental comparison of methods to use methanol and Jatropha oil in a compression ignition engine // *Biomass and Bioenergy*. – 2003. – Vol. 25. – P. 309-318.
272. Kumar, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // *Molecular Biology and Evolution*. – 2018. – Vol. 35. – No. 6. – P. 1547-1549.
273. Kumudha, A. et al. Methylcobalamin - A form of vitamin B12 identified and characterised in *Chlorella vulgaris* // *Food chemistry*. – 2015. – Vol. 170. – P. 316-320.
274. Kussmann, M., Karer, M., Obermueller, M., Schmidt, K., Barousch, W., Moser, D., Nehr, M., Ramharter, M., Poeppl, W., Makristathis, A., Winkler, S., Thalhammer, F., Burgmann, H., Lagler, H. Emergence of a dalbavancin induced glycopeptide/lipoglycopeptide non- susceptible *Staphylococcus aureus* during treatment of a cardiac device- related endocarditis // *Emerging Microbes & Infections*. – 2018. – Vol. 7. – P. 202.
275. Lafarga, T., Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products // *Algal Research*. – 2019. – Vol. 41. – P. 101566.
276. Lakatos, M., Strieth, D. Terrestrial microalgae: novel concepts for biotechnology and applications // *Progress in Botany*. – 2018. – Vol. 79. – P. 269-312.

277. Larson, R. C., Maus, M. V. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells // *Nature Reviews Cancer*. – 2021. – Vol. 21(3). – P. 145-161.
278. Leclerc, O. et al. What are the biotech investment themes that will shape the industry? // *McKinsey&Company*. – 2022. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/what-are-the-biotech-investment-themes-that-will-shape-the-industry>
279. Lee, S. D. *Agrococcus jejuensis* sp. nov., isolated from dried seaweed // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2008. – Vol. 58(10). – P. 2297-2300.
280. Lee, S. Y. et al. A comprehensive metabolic map for production of bio- based chemicals // *Nature catalysis*. – 2019. – Vol. 2(1). – P. 18-33.
281. Leiva, S. et al. Diversity of pigmented Gram- positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica // *FEMS Microbiology Letters*. – 2015. – Vol. 362(24). – P. fnv206.
282. Levasseur, W., Perré, P., Pozzobon, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification // *Biotechnology Advances*. – 2020. – Vol. 41. – P. 107545.
283. Li, Q. et al. 30-norlanostane triterpenoids and steroid derivatives from the endophytic fungus *Aspergillus nidulans* // *Phytochemistry*. – 2022. – Vol. 201. – P. 113257.
284. Li, Q. et al. Niduterpenoids A and B: two sesterterpenoids with a highly congested hexacyclic 5/5/5/5/3/5 ring system from the fungus *Aspergillus nidulans* // *Organic letters*. – 2019. – Vol. 21(7). – P. 2290-2293.
285. Li, Q. et al. Prenylated quinolinone alkaloids and prenylated isoindolinone alkaloids from the fungus *Aspergillus nidulans* // *Phytochemistry*. – 2020. – Vol. 169. – P. 112177.
286. Lim, A. S. et al. Amino acids profiles of six dinoflagellate species belonging to diverse families: possible use as animal feeds in aquaculture // *Algae*. – 2018. – Vol. 33(3). – P. 279-290. (a)
287. Lim, H. G. et al. Design and optimization of genetically encoded biosensors for high- throughput screening of chemicals // *Current opinion in biotechnology*. – 2018. – Vol. 54. – P. 18-25. (b)
288. Lino, C. A. et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches // *Drug delivery*. – 2018. – Vol. 25(1). – P. 1234-1257.
289. Listing the World's Algae // *Algaebase*. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.algaebase.org/> (дата обращения 11.08.24)

290. Liu, H., Chu, Z.-W., Xia, D.-G., Cao, H.-Q., Lv, X.-H. Discovery of novel multi-substituted benzo- indole pyrazole Schiff base derivatives with antibacterial activity targeting DNA gyrase // *Bioorganic Chemistry*. – 2020. – Vol. 99. – P. 103807.
291. Liu, H. et al. Phenolic polyketides from the marine alga- derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ- 3434 // *Tetrahedron*. – 2017. – Vol. 73(36). – P. 5451-5455.
292. Liu, J. et al. Effect of limitation of iron and manganese on microalgae growth in fresh water // *Microbiology*. – 2018. – Vol. 164(12). – P. 1514-1521.
293. Liu, Z., Frank, M., Yu, X., Yu, H., Tran-Cong, N. M., Gao, Y., Proksch, P. Secondary metabolites from marine-derived fungi from China // *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. – 2020. – Vol. 111. – P. 81-150.
294. Lodato, E. M., Kaplan, W. Background Paper 6.1 Antimicrobial resistance // *Background Papers*. – 2004. – P. 122.
295. 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.
296. Lowry, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol. 193. – No. 1. – P. 265-275.
297. Lu, F. et al. A new acyclic peroxide from *Aspergillus nidulans* SD- 531, a fungus obtained from deep- sea sediment of cold spring in the South China Sea // *Journal of Oceanology and Limnology*. – 2020. – Vol. 38(4). – P. 1225-1232.
298. 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.
299. 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.
300. Lu, K., Dempsey, J., Schultz, R. M., Shih, C., Teicher, B. A. Cryptophycin-induced hyperphosphorylation of Bcl-2, cell cycle arrest and growth inhibition in human H460 NSCLC cells // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2001. – Vol. 47. – P. 170-178.
301. Lu, K., Dempsey, J., Schultz, R. M., Shih, C., Teicher, B. A. Cryptophycin-induced hyperphosphorylation of Bcl-2, cell cycle arrest and growth inhibition in human H460 NSCLC cells // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2001. – Vol. 47(2). – P. 170-178.
302. Lu, L., Wang, J., Yang, G., Zhu, B., Pan, K. Heterotrophic growth and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* using glucose as a carbon source under different C/N ratios // *Journal of Applied Phycology*. – 2017. – Vol. 29. – P. 15-21.

303. Luo, Z. et al. A high-throughput screening procedure for enhancing pyruvate production in *Candida glabrata* by random mutagenesis // *Bioprocess and biosystems engineering*. – 2017. – Vol. 40. – P. 693-701.
304. Lutsenko, S. V., Feldman, N. B., Finakova, G. V., Gukasova, N. V., Petukhov, S. P., Posypanova, G. A., Skryabin, K. G., Severin, S. E. Antitumor activity of alpha fetoprotein and epidermal growth factor conjugates in vitro and in vivo // *Tumor Biology*. – 2000. – 21(6). – 367-374.
305. Machado, I. MP., Atsumi, S. Cyanobacterial biofuel production // *Journal of biotechnology*. – 2012. – Vol. 162(1). – P. 50-56.
306. Majorov, K. B., Nikonenko, B. V., Ivanov, P. Y., Telegina, L.N., Apt, A. S., Velezheva, V. S. Structural modifications of 3-triazeneindoles and their increased activity against *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antibiotics (Basel)*. – 2020. – Vol. 9. – P. 356.
307. Mallipeddi, R., Rohan, L. C. Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology // *International Journal of Nanomedicine*. – 2010. – Vol. 5. – P. 533-547.
308. 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 condition // *Algal Research*. – 2018. – Vol. 33. – P. 358368.
309. 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.
310. Mandal, S., Mallick, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 84. – P. 281-291.
311. Manfellotto, F., Stella, G. R., Ferrante, M. I., Falciatore, A., Brunet, C. MarggrafEngineering the unicellular alga *Phaeodactylum tricornutum* for enhancing carotenoid production // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9(8). – P. 757.
312. Maraki, S., Mavromanolaki, V. E., Stafylaki, D., Iliaki-Giannakoudaki, E., Hamilos, G. In vitro activities of ceftobiprole, dalbavancin, tedizolid and comparators against clinical isolates of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infections // *Antibiotics (Basel)*. – 2023. – Vol. 12. – P. 900.
313. Marggraf, M. B., Panteleev, P. V., Emelianova, A. A., Sorokin, M. I., Bolosov, I. A., Buzdin, A. A., Kuzmin, D. V., Ovchinnikova, T. V. Cytotoxic Potential of the Novel Horseshoe Crab Peptide Polyphemusin III // *Marine Drugs*. – 2018. – Vol. 16. – P. 466.

314. Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients // *Water research*. – 2014. – Vol. 65. – P. 186-202.
315. Marcela, V., Maus, S. A., Grupp, D. L. Porter, C. H. June. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies // *Blood*. – 2014. – Vol. 123. – P. 2625-2635.
316. Mascarelli, A. L. Gold rush for algae // *Nature*. – 2009. – Vol. 461(7263). – P. 460-1.
317. Martin, L. J. Fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol in cancer prevention and treatment // *Marine Drugs*. – 2015. – Vol. 13. – P. 4784-4798.
318. 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.
319. Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2010. – Vol. 14(1). – P. 217-232.
320. Matsuno, T. Aquatic animal carotenoids // *Fisheries Science*. – 2001. – Vol. 67. – P. 771-783.
321. Matsuo, Y. et al. Streptobactin, a tricatchol- type siderophore from marine-derived *Streptomyces* sp. YM5-799 // *Journal of natural products*. – 2011. – Vol. 74(11). – P. 2371-2376.
322. McMillan, J. R. et al. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment // *Applied energy*. – 2013. – Vol. 103. – P. 128-134.
323. McWilliams, A. The global market for carotenoids // *BCC Research*. – 2018.
324. Megía-Hervás, I., Sánchez-Bayo, A., Bautista, L. F., Morales, V., Witt-Sousa, F. G., Segura-Fornieles, M., Vicente, G. Scale-Up Cultivation of *Phaeodactylum tricornutum* to Produce Biocrude by Hydrothermal Liquefaction // *Journal of Processes*. – 2020. – Vol. 9. – P. 1072.
325. Metting, F. B. Biodiversity and application of microalgae // *Journal of industrial microbiology*. – 1996. – Vol. 17. – P. 477-489.
326. Minyuk, G. S., Chelebieva, E. S., Chubchikova, I. N. Secondary carotenogenesis of the green microalga *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) in a two-stage culture // *International Journal of Algae*. – 2015. – Vol. 25. – P. 21-34.

327. Mobin, S. MA., Alam, F. A review of microalgal biofuels, challenges and future directions // Application of thermo- fluid processes in energy systems: key issues and recent developments for a sustainable future. – 2018. – P. 83-108.
328. Mohan, S. V., Devi, M. P. Salinity stress induced lipid synthesis to harness biodiesel during dual mode cultivation of mixotrophic microalgae // Bioresource technology. – 2014. – Vol. 165. – P. 288-294.
329. Moisseev, A., Albert, E., Lubarsky, D., Schroeder, D., Clark, J. Transcriptomic and Genomic Testing to Guide Individualized Treatment in Chemoresistant Gastric Cancer Case // Biomedicines. – 2020. – Vol. 8(3). – P. 67.
330. Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://tree.bio.ed.ac.uk/> (дата обращения: 16.08.2024).
331. Morales, M., Aflalo, C., Bernard, O. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species // Biomass and Bioenergy. – 2021. – Vol. 150. – P. 106108.
332. Morales-Sanchez, D., Martinez-Rodriguez, O. A., Martinez, A. Heterotrophic cultivation of microalgae: production of metabolites of commercial interest // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2017. – Vol. 92(5). – P. 925-936.
333. Morita, H. et al. A new screening method for recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains based on their xylose fermentation ability measured by near infrared spectroscopy // Analytical Methods. – 2014. – Vol. 6(17). – P. 6628-6634.
334. Mudimu, O. et al. Biotechnological screening of microalgal and cyanobacterial strains for biogas production and antibacterial and antifungal effects // Metabolites. – 2014. – Vol. 4(2). – P. 373-393.
335. Mulders, K. J., Lamers, P. P., Martens, D. E., Wijffels, R. H. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities // Journal of phycology. - 2014. – Vol. 50(2). – P. 229-242.
336. Mulders, K. JM. et al. Growth and pigment accumulation in nutrient- depleted *Isochrysis aff. galbana T-ISO* // Journal of applied phycology. – 2013. – Vol. 25. – P. 1421-1430.
337. Münkkel, R. et al. Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella vulgaris* // Biotechnology and Bioengineering. – 2013. – Vol. 110(11). – P. 2882-2893.
338. Murphy, K., Weaver, C., Berg, L. Janeway's immunology (Tenth Edition) // W. W. Norton & Company. – 2022. – P. 672-728.
339. Muys, M., Sui, Y., Schwaiger, B., Lesueur, C., Vandenheuvel, D., Vermeir, P., Vlaeminck, S. High variability in nutritional value and safety of commercially available *Chlorella*

and Spirulina biomass indicates the need for smart production strategies // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 275. – P. 247-257.

340. 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.

341. Nagarajan, M., Maruthanayagam, V., Sundararaman. M. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites // *Journal of Applied Toxicology*. – 2012. – Vol. 32(3). – P. 153-185.

342. Najafi, N., Hosseini, R., Ahmadi, A. Impact of gamma rays on the *Phaffia rhodozyma* genome revealed by RAPD-PCR // *Iranian Journal of Microbiology*. – 2011. – Vol. 3(4). – P. 216.

343. Najdenski, H. M. et al. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria // *International journal of food science & technology*. – 2013. – Vol. 48(7). – P. 1533-1540.

344. Namsaraev, Z., Kozlova, A., Tuzov, F., Krylova, A., Izotova, A., Makarov, I., Bezgreshnov, A., Melnikova, A., Trofimova, A., **Kuzmin, D.**, Patrushev, M., Toshchakov, S. Biogeographic Analysis Suggests Two Types of Planktonic Prokaryote Communities in the Barents Sea // *Biology*. – 2023. – Vol. 12. – P. 1310.

345. Nancucheo, I., Johnson, D. B. Acidophilic algae isolated from mine- impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles // *Frontiers in Microbiology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 325.

346. Narala, R. R. et al. Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two- stage hybrid system // *Frontiers in Energy Research*. – 2016. – Vol. 4. – P. 29.

347. National Library of Medicine. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/>

348. Ndwandwe, D., Wiysonge, C. S. COVID-19 vaccines // *Current opinion in immunology*. – 2021. – Vol. 71. – P. 111-116.

349. Neofotis, P., Huang, A., Sury, K., Chang, W., Joseph, F., Gabr, A., Twary, S., Qiu, W., Holguin, O., Polle, J. E. W. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation // *Algal Research*. – 2016. – Vol. 15. – P. 164-178.

350. Nguyen, T. H. T., Park, S., Jeong, J., Shin, Y. S., Sim, S. J., Jin, E. Enhancing lipid productivity by modulating lipid catabolism using the CRISPR-Cas9 system in *Chlamydomonas* // *Journal of Applied Phycology*. – 2020. – Vol. 32(5). – P. 2829-2840.

351. Nicholls, K. H. Four new *Mallomonas* species of the *Torquatae* series (*Chrysophyceae*) // *Canadian Journal of Botany*. – 1984. – Vol. 62. – P. 1583-1591.
352. Nigam, P. S., Singh, A. Production of liquid biofuels from renewable resources // *Progress in energy and combustion science*. – 2011. – Vol. 37(1). – P. 52-68.
353. Nikolaou, A. et al. Dynamic coupling of photoacclimation and photoinhibition in a model of microalgae growth // *Journal of theoretical biology*. – 2016. – Vol. 390. – P. 61-72.
354. Nikonenko, B. V., Kornienko, A., Majorov, K., Ivanov, P., Kondratieva T., Korotetskaya, M., Apt, A. S., Salina, E., Velezheva V. In vitro activity of 3-triazeneindoles against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2016. – Vol. 60(12). – P. 6422-6424.
355. Ninomiya, A., Urayama, S., Hagiwara, D. Antibacterial diphenyl ether production induced by co- culture of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 106(11). – P. 4169-4185.
356. 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.
357. 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.
358. Nurachman, Z. et al. Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye- sensitized solar cells // *Algal Research*. – 2015. – Vol. 10. – P. 25-32.
359. Nursid, M., Chasanah, E., Wahyuono, S. Isolation and identification of emestrin from *Emericella nidulans* and investigation of its anticancer properties // *Microbiology Indonesia*. – 2012. – Vol. 5(4). – P. 3.
360. Nursid, M. et al. Emestrin B: Epipolythiodioxypiperazine from marine derived fungus *Emericella nidulans* // *Journal of Medical and Bioengineering*. – 2015. – Vol. 4. – P. 441-445.
361. Olaizola, M. The Production and Health Benefits of Astaxanthin // *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*. – 2008. – Vol. 13. – P. 322-336.
362. Olasehinde, T. A., Olaniran, A. O., Okoh, A. I. Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22. – P. 480.
363. Oliver, L. et al. 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.

364. Onen Cinar, S. et al. Bioplastic production from microalgae: a review // International journal of environmental research and public health. – 2020. – Vol. 17(11). – P. 3842.
365. Ortega-Berlanga, B., Bañuelos-Hernández, B., Rosales-Mendoza, S. Efficient expression of an Alzheimer's disease vaccine candidate in the microalga *Schizochytrium* sp. using the Algevir system // Molecular Biotechnology. – 2018. – Vol. 60. – P. 362-368.
366. Palinska, K. A., Surosz, W. Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach // Hydrobiologia. – 2014. – Vol. 740. – P. 1-11.
367. Paniagua, M., de Jesús, J., Morales-Guerrero, E., Soto, J. O. Microalgal biotechnology: biofuels and bioproducts // Springer handbook of marine biotechnology. – 2015. – P. 1355-1370.
368. Papadaki, S., Kyriakopoulou, K., Krokida, M. Recovery and encapsulation of bioactive extracts from *Haematococcus pluvialis* and *Phaedodactylum tricornutum* for food applications // IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. – 2017. – Vol. 10. – P. 53-58.
369. Paredes-Gamero, E. J. et al. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – Vol. 1820. – No. 7. – P. 1062–1072.
370. 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.
371. Pataro, G., Carullo, D., Ferrari, G. PEF-assisted supercritical CO₂ extraction of pigments from microalgae *nannochloropsis oceanica* in a continuous flow system // Chemical Engineering Transactions. – 2019. – Vol. 74. – P. 97-102.
372. Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., Ghosh, P. K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat // Protein Expression and Purification. – 2005. – Vol. 40(2). – P. 248-255.
373. Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // Aquaculture International. – 2007. – Vol. 15. – P. 1-9.
374. 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.

375. 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.
376. Pereira, H., Sá, M., Maia, I., Rodrigues, A., Teles, I., Wijffels, R. H., Navalho, J., Barbosa, M. Fucoxanthin production from *Tisochrysis lutea* and *Phaeodactylum tricornutum* at industrial scale // *Algal Research*. – 2021. – Vol. 56. – P. 102322.
377. Petrášek, J., Schwarzerová, K. Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Curr Current Opinion in Plant Biology*. – 2009. – Vol. 12(6). – P. 728-734.
378. 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. (a)
379. Piddock, L. J. Teixobactin, the first of a new class of antibiotics discovered by iChip technology? // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 70(10). – P. 2679-2680.
380. Pierre, G. et al. What is in store for EPS microalgae in the next decade? // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24(23). – P. 4296.
381. Poddubskaya, E., Bondarenko, A., Boroda, A., Zotova, E., Glusker, A., Sletina, S., Makovskaia, L., Kopylov, P., Sekacheva, M., Moisseev, A., Baranova, M. Transcriptomics-Guided Personalized Prescription of Targeted Therapeutics for Metastatic ALK-Positive Lung Cancer Case Following Recurrence on ALK Inhibitors // *Frontiers in Oncology*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1026.
382. 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.
383. Posada, D. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34. – P. W700-703.
384. Potashman, M. H., Stokes, M., Liu, J., Lawrence, R., Harris, L. Examination of hospital length of stay in Canada among patients with acute bacterial skin and skin structure infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Infection and Drug Resistance*. – 2016. – Vol. 9. – P. 19-33.

385. Poveda-Giraldo, J. A., Solarte-Toro, J. C., Cardona Alzate, C.A. The potential use of lignin as a platform product in biorefineries: A review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2021. – Vol. 138. – P. 110688.
386. Prosperi, M. et al. Big data hurdles in precision medicine and precision public health // *BMC medical informatics and decision making*. – 2018. – Vol. 18. – P. 1-15.
387. Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F. O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – No. 14. – P. 1823-1829.
388. Qin, S., Lin, H., Jiang, P. Advances in genetic engineering of marine algae // *Biotechnology advances*. – 2012. – Vol. 30(6). – P. 1602-1613.
389. Qin, Y. et al. A fluorescence-activated single-droplet dispenser for high accuracy single-droplet and single-cell sorting and dispensing // *Analytical chemistry*. – 2019. – Vol. 91(10). – P. 6815-6819.
390. Qiu, R. et al. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana* // *Algal research*. – 2017. – Vol. 28. – P. 192-199.
391. Rab, E. et al. α -pyrone polyketides from *Streptomyces ambofaciens* BI0048, an endophytic actinobacterial strain isolated from the red alga *Laurencia glandulifera* // *Marine Drugs*. – 2017. – Vol. 15(12). – P. 389.
392. Raji, A. A., Jimoh, W. A., Bakar N. A., Taufek, N. M., Muin, H., Alias, Z., Razak, S.A. 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.
393. Rajivgandhi, G. N. et al. Anti-biofilm compound of 1, 4-diaza-2, 5-dioxo-3-isobutyl bicyclo [4.3.0] nonane from marine *Nocardiopsis* sp. DMS 2 (MH900226) against biofilm forming *K. pneumoniae* // *Journal of King Saud University – Science*. – 2020. – Vol. 32(8). – P. 3495-3502.
394. Rajivgandhi, G. et al. Antibacterial effect of endophytic actinomycetes from marine algae against multi drug-resistant gram negative bacteria // *Examines in Marine Biology & Oceanography*. – 2018. – Vol. 1(4). – P. 1-8.
395. Rajivgandhi, G. et al. Enlightening the characteristics of bioflocculant of endophytic actinomycetes from marine algae and its biosorption of heavy metal removal // *Environmental Research*. – 2021. – Vol. 200. – P. 111708.
396. Rajivgandhi, G. et al. Molecular characterization and antibacterial effect of endophytic actinomycetes *Nocardiopsis* sp. GRG1 (KT235640) from brown algae against MDR strains of uropathogens // *Bioactive materials*. – 2016. – Vol. 1(2). – P. 140-150.

397. Rajput, A., Singh, D. P., Khattar, 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.
398. Ramírez-López, C., Chairez, I., Fernández-Linares, L. A novel culture medium designed for the simultaneous enhancement of biomass and lipid production by *Chlorella vulgaris* UTEX 26 // *Bioresource technology*. – 2016. – Vol. 212. – P. 207-216.
399. Ranjbar, R., Alam, M. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet*. – 2022. – Vol. 399. – P. 629-655.
400. Rasala, B. A., Chao, S. S., Pier, M., Barrera, D. J., Mayfield, S. P. Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9(4). – P. e94028.
401. Rastogi, R. P., Madamwar, D., Pandey, A., eds. *Algal green chemistry: recent progress in biotechnology* // Elsevier. – 2017. – P. 336.
402. Ratha, S. K., Babu, S., Renuka, N., Prasanna, R., Prasad, R. B. N., Saxena, A. K. Exploring nutritional modes of cultivation for enhancing lipid accumulation in microalgae // *Journal of Basic Microbiology*. – 2012. – Vol. 53. – P. 440-450.
403. Razzak, S. A. Comprehensive overview of microalgae-derived carotenoids and their applications in diverse industries // *Algal Research*. – 2024. – Vol. 78. – P. 103422.
404. Reboloso-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.
405. Reddyrajula, R., Etikyala, U., Manga, V., Dalimba, U. K. Discovery of 1,2,3-triazole incorporated indole- piperazines as potent antitubercular agents: Design, synthesis, in vitro biological evaluation, molecular docking and ADME studies // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2024. – Vol. 98. – P. 117562.
406. Rincon, S. M. et al. Photosynthetic activity assessment in mixotrophically cultured *Chlorella vulgaris* biofilms at various developmental stages // *Algal Research*. – 2019. – Vol. 38. – P. 101408.
407. Ritchie, M. E. et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43. – No. 7. – P. e47.
408. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., Smyth, G. K. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43. – P. e47.

409. Ronga, D. et al. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions // *Agronomy*. – 2019. – Vol. 9(4). – P. 192.
410. Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics*. – 2003. – Vol. 19. – No. 12. – P. 1572-1574.
411. Rosa, L., Vincent, C. R. Gurbatri, F. L., Ana Vardoshvili, C. C., et. al. Probiotic-guided CAR-T cells for solid tumor targeting // *Science*. – 2023. – Vol. 382. – P. 211-218.
412. Rozenberg, J. M., Sorokin, B. A., Mukhambetova, A. N., Emelianova, A. A., Belogurova-Ovchinnikova, O. Y., **Kuzmin, D. V.** Recent advances and fundamentals of microalgae cultivation technology // *Biotechnology Journal*. – 2024. – Vol. 19. – P. e2300725.
413. Ruggiero, M. A. et al. A higher level classification of all living organisms // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10(4). – P. e0119248.
414. Ryckebosch, E. et al. Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil // *Food chemistry*. – 2014. – Vol. 160. – P. 393-400.
415. Sadvakasova, A., Akmukhanova, N., Bolatkhan, K., Zayadan, B., Usserbayeva, A., Bauenova, M., Akhmetkaliyeva, A., Allakhverdiev, S. Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2019. – Vol. 44(12) – P. 5844-5853.
416. Sadvakasova, A., Akmukhanova, N., Bolatkhan, K., Zayadan, B., Usserbayeva, A., Bauenova, M., Akhmetkaliyeva, A., Allakhverdiev, S. Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production // *International journal of hydrogen energy*. – 2019. – Vol. 14(12). – P. 5844-5853.
417. Safi, C. et al. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods // *Algal Research*. – 2014. – Vol. 3. – P. 61-65.
418. SAG catalogue of strains. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://sagdb.uni-goettingen.de/index.php>
419. San Pedro, A., Gonzalez-Lopez, C. V., Acien, 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.
420. Sanchez, Á. et al. Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production // *Applied Energy*. – 2013. – Vol. 101. – P. 192-197.
421. Sanchez, J. F. et al. Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans* // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133(11). – P. 4010-4017.

422. Sandberg, T. E. et al. Evolution of *Escherichia coli* to 42 C and subsequent genetic engineering reveals adaptive mechanisms and novel mutations // *Molecular biology and evolution*. – 2014. – Vol. 31(10). – P. 2647-2662.
423. Sandberg, T. E. et al. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology // *Metabolic Engineering*. – 2019. – Vol. 56. – P. 1-16.
424. Sandbrink, J. B., Shattock. R.J. RNA Vaccines: A Suitable Platform for Tackling Emerging Pandemics? // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 608460.
425. Santiago-Morales, I. S. et al. Tocopherols, phycocyanin and superoxide dismutase from microalgae: As potential food antioxidants // *Applied Food Biotechnology*. – 2018. – Vol. 5(1). – P. 19-27.
426. Sarat Chandra, T. et al. Growth and biochemical characteristics of an indigenous freshwater microalga, *Scenedesmus obtusus*, cultivated in an airlift photobioreactor: effect of reactor hydrodynamics, light intensity, and photoperiod // *Bioprocess and biosystems engineering*. – 2017. – Vol. 40. – P. 1057-1068.
427. 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.
428. Sarker, P. K. et al. 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. – No. 6. – P. e0156684.
429. Sarker, P. K. et al. 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. – No. 7. – P. e0201315.
430. 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.
431. 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. – P. e0201315.

432. Sarma, A., Calfee, C. S., Ware, L. B. Biomarkers and precision medicine: state of the art // *Critical care clinics*. – 2020. – Vol. 36(1). – P. 155-165.
433. Sathasivam, R. et al. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine // *Saudi journal of biological sciences*. – 2019. – Vol. 26(4). – P. 709-722.
434. Sathasivam, R. et al. Optimizing NaCl and KNO₃ Concentrations for High b-carotene Production in Photobioreactor by *Dunaliella salina* KU11 Isolated from Saline Soil Sample // *Chiang Mai Journal of Science*. – 2018. – Vol. 45(1). – P. 106-115.
435. Sathasivam, R., Ki, J.-S. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries // *Marine drugs*. – 2018. – Vol. 16(1). – P. 26.
436. Sauser, B. et al. From TRL to SRL: The concept of systems readiness levels // *Conference on Systems Engineering Research*. – 2006. – Vol. 5. – No. 0002. – P. 10.
437. Savio, S., Congestri, R., Rodolfo, C. Are we out of the infancy of microalgae-based drug discovery // *Algal Research*. – 2021. – P. 102173.
438. Scharff, H. et al. Methods to Ascertain Methane Emission of Landfills // *Journal of Geoscience and Environment Protection*. – 2017. – Vol. 8. – No. 12. – P. 24.
439. Scherlach, K., Hertweck, C. Discovery of aspoquinolones A-D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2006. – Vol. 4(18). – P. 3517-3520.
440. Schie, I. W. et al. High-throughput screening Raman spectroscopy platform for label-free cellomics // *Analytical chemistry*. – 2018. – Vol. 90(3). – P. 2023-2030.
441. Schmidt, K. T. et al. Precision oncology medicine: the clinical relevance of patient-specific biomarkers used to optimize cancer treatment // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2016. – Vol. 56(12). – P. 1484-1499.
442. Señoráns, M., Castejón, N., Señoráns, F. J. Advanced extraction of lipids with DHA from *Isochrysis galbana* with enzymatic pre-treatment combined with pressurized liquids and ultrasound assisted extractions // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25(14). – P. 3310.
443. Sesen, M., Alan, T., Neild, A. Droplet control technologies for microfluidic high throughput screening (μ HTS) // *Lab on a Chip* – 2017. – Vol. 17(14). – P. 2372-2394.
444. Shah, P., Westwell, A. D. The role of fluorine in medicinal chemistry // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2007. – Vol. 22. – P. 527-540.
445. Shaikh, K. M., Nesamma, A. A., Abdin, M. Z., Jutur, P. P. Molecular profiling of an oleaginous trebouxiophycean alga *Parachlorella kessleri* subjected to nutrient deprivation for enhanced biofuel production // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. – 2019. – Vol. 12. – P. 182.

446. Sharma, S. et al. Bioprospecting and biotechnological applications of microbial endophytes // *Microbial Technology for Health and Environment*. – 2020. – P. 191-228.
447. Shivram, H. et al. Controlling and enhancing CRISPR systems // *Nature chemical biology*. – 2021. – Vol. 17(1). – P. 10-19.
448. Sharkey, R. M., Goldenberg, D. M. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates // *A Cancer Journal for Clinicians*. – 2006. – Vol. 56(4). – P. 226-243.
449. Shwartz, R. E., Hirsh, C. F., Sesin, D. F. Pharmaceuticals from cultured algae // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 1990. – Vol. 5. – No. 2-3. – P. 113-124.
450. Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves // *BMC Biotechnology*. – 2011. – Vol. 11(1). – P. 7.
451. Silverman, A. D. et al. Deconstructing cell-free extract preparation for in vitro activation of transcriptional genetic circuitry // *ACS synthetic biology*. – 2018. – Vol. 8(2). – P. 403-414.
452. Sinetova, M. A., Shchukina, T. V., Terekhova, E. V., Kasyanov, A. N. Assessment of the biotechnological potential of cyanobacterial and microalgal strains from IPPAS culture collection // *Biotekhnologiya*. – 2020. – Vol. 56. – No. 7. – P. 12-29.
453. Singh, P., Baranwal, M., Reddy, S. M. Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress // *Pharmaceutical biology*. – 2016. – Vol. 54(10). – P. 2269-2275.
454. Singh, S. P., Singh, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review // *Renewable and sustainable energy reviews*. – 2015. – Vol. 50. – P. 431-444.
455. Sirisuk, P., Ra C.-H., Jeong, G.-T., Kim, S.-K. Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 253. – P. 175-181.
456. Sizova, I. et al. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases // *The Plant Journal*. – 2013. – Vol. 73(5). – P. 873-882.
457. Škaloud, P. et al. Toward a revision of the genus *Synura*, section *Petersenianae* (Synurophyceae, Heterokontophyta): morphological characterization of six pseudo-cryptic species // *Phycologia*. – 2012. – Vol. 51. – No. 3. – P. 303-329.
458. Smerilli, A. et al. Photoprotective and antioxidant responses to light spectrum and intensity variations in the coastal diatom *Skeletonema marinoi* // *Environmental microbiology*. – 2017. – Vol. 19(2). – P. 611-627.

459. 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.
460. Soares, A. T. et al. Improvement of the extraction process for high commercial value pigments from *Desmodesmus* sp. *Microalgae // Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2016. – Vol. 27(6). – P. 1083-1093.
461. Somasekharan, S. P. et al. An aqueous extract of marine microalgae exhibits antimetastatic activity through preferential killing of suspended cancer cells and anticlonal forming activity // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2016. – Vol. 2016(1). – P. 9730654.
462. 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.
463. Somoza, L. Submarine Active Faults and Morpho-Tectonics Around the Iberian Margins: Seismic and Tsunamis Hazards // *Frontiers in Earth Science*. – 2021. – Vol. 9. – P. 519.
464. Song, H. et al. Extraction optimization, purification, antioxidant activity, and preliminary structural characterization of crude polysaccharide from an arctic *Chlorella* sp // *Polymers*. – 2018. – Vol. 10(3). – P. 292.
465. Sorokin, B., Gusev, E., Namsaraev, Z., Emelianova, A., Patova, E., Novakovskaya, I., Vinokurov, V., Kuzmin, D. Effect of microalgae feed supplementation on growth performance and feeding efficiency of tilapia fry // *Journal of Applied Phycology*. – 2024. – Vol. 36. – P. 1767-1780.
466. Sorokin, M., Borisov, N., Kuzmin, D., Gudkov, A., Zolotovskaia, M., Garazha, A., Buzdin, A. Algorithmic Annotation of Functional Roles for Components of 3,044 Human Molecular Pathways // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – Vol. 12. – P. 8.
467. Sorokin, M., Kholodenko, R., Suntsova, M., Malakhova, G., Garazha, A., Kholodenko, I., Poddubskaya, E., Lantsov, D., Stilidi, I., Arhiri, P., Osipov, A., Buzdin, A. Oncobox Bioinformatical Platform for Selecting Potentially Effective Combinations of Target Cancer Drugs Using High-Throughput Gene Expression Data // *Cancers (Basel)*. – 2018. – Vol. 10(10). – P. 365.
468. Sprague, M., Betancor, M. B., Tocher, D. R. Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds // *Biotechnology letters*. – 2017. – Vol. 39. – P. 1599-1609.

469. 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.
470. Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers // *Systematic Biology*. – 2008. – Vol. 57. – No. 5. – P. 758-771.
471. Stark, M., O'Gara, I. An introduction to photosynthetic microalgae // *Disruptive Science and Technology*. – 2012. – Vol. 1(2). – P. 65-67.
472. Stavrakis, S. et al. High-throughput microfluidic imaging flow cytometry // *Current opinion in biotechnology*. – 2019. – Vol. 55. – P. 36-43.
473. Steinbrenner, J., Sandmann, G. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – Vol. 72(12). – P. 7477-7484.
474. Stephenson, P., Moore, C., Terry, M., Zubkov, M., Bibby, T. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution // *Trends in Biotechnology*. – 2011. Vol. 29(12). – P. 615-623.
475. Sterner, R. C., Sterner, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies // *Blood cancer journal*. – 2021. – Vol. 11(4). – P. 69.
476. Stevens, D. L., Bisno, A. L., Chambers, H. F., Dellinger, E. P., Goldstein, E. J. C., Gorbach, S. L., Hirschmann, J. V., Kaplan, S. L., Montoya, J. G., Wade, J. C. Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America // *Clinical Infectious Diseases*. – 2014. – 59. – P. e10-52.
477. Stevens, D. L., Bisno, A. L., Chambers, H. F., Dellinger, E. P., Goldstein, E. J. C., Gorbach, S. L., Hirschmann, J. V., Kaplan, S. L., Montoya, J. G., Wade, J. C. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft tissue infections: 2014 update by the Infectious Diseases Society of America // *Clinical Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 59. – P. 147-159.
478. 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.
479. Subramanian, A. et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles // *Cell*. – 2017. – Vol. 171. – No. 6. – P. 1437-1452.e17.
480. Subramanian, A., Narayan, R., Corsello, S. M. et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles // *Cell Press*. – 2017. – Vol. 171. – P. 1437-1452.e17.

481. Swasey, S. M. et al. Adaptation of a visible wavelength fluorescence microplate reader for discovery of near- infrared fluorescent probes // *Review of Scientific Instruments*. – 2018. – Vol. 89(9). – P. 095111.
482. Tacon, A. G. J., Metian, M. Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture // *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. – 2015. – Vol. 23. – P. 1-10.
483. 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.
484. Takache, H., Pruvost, J., Marec, H. Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation // *Algal Research*. – 2015. – Vol. 8. – P. 192-204.
485. Takahashi, E. Studies on genera *Mallomonas* and *Synura*, and other plankton in freshwater with the electron microscope VIII. On three new species of chrysophyceae // *Curtis's Botanical Magazine*. – 1972. – Vol. 85. – No. 4. – P. 293-302.
486. 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.
487. Takkellapati, S., Li, T., Gonzalez, M. A. An overview of biorefinery- derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery // *Clean technologies and environmental policy*. – 2018. – Vol. 20. – P. 1615-1630.
488. Talebi, A. F., Mohtashami, S. K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H. H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S. M., Bakhtiari, S. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production // *Algal Research*. – 2013. – Vol. 2. – P. 258-267.
489. Tamura, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. – 2013. – Vol. 30. – No. 12. – P. 2725-2729.
490. Tan, B. Y. Q. et al. Psychological Impact of the COVID-19 Pandemic on Health Care Workers in Singapore // *Annals of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 173(4). – P. 317-320.
491. Templeton, D. W. Laurens, L. M. L. Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for application of microalga biomass conversion to food, feed and fuel // *Algal Research*. – 2015. – Vol. 11. – P. 359-367.
492. Terashima, I., Yanagisawa, S., Sakakibara, H. Plant responses to CO₂: background and perspectives // *Plant and cell physiology*. – 2014. – Vol. 55(2). – P. 237-240.
493. Thajuddin, N., Subramanian, G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology // *Current science*. – 2005. – P. 47-57.

494. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.eucast.org/> (дата обращения: 26.07.2024).
495. Tkachev, V., Sorokin, M., Garazha, A., Borisov, N., Buzdin, A. Oncobox Method for Scoring Efficiencies of Anticancer Drugs Based on Gene Expression Data // *Methods in Molecular Biology*. – 2020. – P. 235-255.
496. Trentacoste, E. M., Martinez, A. M., Zenk, T. The place of algae in agriculture: policies for algal biomass production // *Photosynthesis research*. – 2015. – Vol. 123. – P. 305-315.
497. Turland, N. J., Wiersema, J. H., Barrie, F. R., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., Marhold, K., May, T. W., McNeill, J., Monro, A. M., Prado, J., Price, M. J., Smith, G. F. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shen-zhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017 // *Regnum Vegetabile*. – 2018. – P. 159.
498. Uzair, B., Kausar, R., Bano, S. A., Fatima, S., Badshah, M., Habiba, U., Fasim, F. Isolation and Molecular Characterization of a Model Antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* Divulging In Vitro Plant Growth Promoting Characteristics // *BioMed Research International*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 6147380.
499. Vajs, J., Proud, C., Brozovic, A., Gazvoda, M., Lloyd, A., Roper, D. I., Osmak, M., Košmrlj, J., Dowson, C. G. Diaryltriazene as antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Mycobacterium smegmatis* // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 127. – P. 223-234.
500. Valdes, F. J. et al. Estimation of CO₂ stripping/CO₂ microalgae consumption ratios in a bubble column photobioreactor using the analysis of the pH profiles. Application to *Nannochloropsis oculata* microalgae culture // *Bioresource technology*. – 2012. – Vol. 119. – P. 1-6.
501. Valledor, L. et al. Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2013. – Vol. 12(8). – P. 2032-2047.
502. Vamathevan, J. et al. Applications of machine learning in drug discovery and development // *Nature reviews Drug discovery*. – 2019. – Vol. 18(6). – P. 463-477.
503. van Breemen, R. B., Li, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2005. – Vol. 1(2). – P. 175-185.
504. Varshney, P. et al. Isolation and biochemical characterisation of two thermophilic green algal species- *Asterarcys quadricellulare* and *Chlorella sorokiniana*, which are tolerant to high levels of carbon dioxide and nitric oxide // *Algal research*. – 2018. – Vol. 30. – P. 28-37.

505. Venkatesan, J., Manivasagan, P., Kim, S.- K. Marine microalgae biotechnology: present trends and future advances // Handbook of marine microalgae. Academic Press. – 2015. – P. 1- 9.
506. Villarruel-Lopez, A., Ascencio, F., Nuno, K. Microalgae, a potential natural functional food source-a review // Polish journal of food and nutrition sciences. – 2017. – Vol. 67(4). – P. 251-263.
507. Vincent, W. F. Cyanobacteria // Published in Encyclopedia of Inland Waters. – 2009. – Vol. 3. – P. 226-232.
508. Virtanen, P. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python // Nature Methods. – 2020. – Vol. 17. – No. 3. – P. 261-272.
509. Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python // Nature Methods. – 2020. – Vol. 17. – P. 261-272.
510. Wagner, J. M. et al. A comparative analysis of single cell and droplet- based FACS for improving production phenotypes: Riboflavin overproduction in *Yarrowia lipolytica* // Metabolic engineering. – 2018. – Vol. 47. – P. 346-356.
511. Wan, C., Bai, F. W., Zhao, X. Q. Effects of nitrogen concentration and media replacement on cell growth and lipid production of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* DUT01 // Biochemical Engineering Journal. – 2013. – Vol. 78. – P. 32-38.
512. Wan, L., Essuman, K., Anderson, R. G., Sasaki, Y., Monteiro, F., Chung, E. H, Osborne, Nishimura, E., DiAntonio, A., Milbrandt, J., Dangl, J. L., Nishimura, M. T. TIR domains of plant immune receptors are NAD⁺-cleaving enzymes that promote cell death // Science. – 2019. – Vol. 365(6455). – P. 799-803.
513. Wanat, K. Biological barriers, and the influence of protein binding on the passage of drugs across them // Molecular Biology Reports. – 2020. – Vol. 47. – P. 3221-3231.
514. Wang, B. L. et al. Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption // Nature biotechnology. – 2014. – Vol. 32(5). – P. 473-478.
515. Wang, C., Lan, C. Q. Effects of shear stress on microalgae – A review // Biotechnology Advances. – 2018. – Vol. 36(4). – P. 986-1002.
516. Wang, C., Wang, Z., Luo, F., Li, Y. The augmented lipid productivity in an emerging oleaginous model alga *Coccomyxa subellipsoidea* by nitrogen manipulation strategy // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2017. – Vol. 33. – P. 160.
517. 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.

518. 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.

519. Waterbury, J. B., Stanier, R. Y. Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments // *The Prokaryotes*. – 1981. – Vol. 7. – P. 221-223.

520. Watters, C., Iwamura, S., Ako, H., Deng, D.-F. Nutrition considerations in aquaculture: The importance of omega-3 fatty acids in fish development and human health // Honolulu: University of Hawaii. – 2012. – P. 7.

521. WDCM602: GENUS. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ibiw.ru/index.php?p=project/algo/WDCM602/mgmt_genus&id=1

522. Wee, J. L. et al. ITS/5.8S DNA sequence variation in 15 isolates of *Synura petersenii* Korshikov (Synurophyceae) // *Nova Hedwigia Beiheft*. – 2001. – No. 122. – P. 245-258.

523. Wen, Z. Y., Chen, F. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* // *Biotechnology Letters*. – 2000. – Vol. 22. – P. 727-733.

524. Werth, B. J., Jain, R., Hahn, A., Cummings, L., Weaver, T., Waalkes, A., Sengupta, D., Salipante, S. J., Rakita, R. M., Butler-Wu, S. M. Emergence of dalbavancin non-susceptible, vancomycin- intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) after treatment of MRSA central line-associated bloodstream infection with a dalbavancin- and vancomycin- containing regimen // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2018. – Vol. 24. – P. 1-429.

525. Westley, C. et al. Label-free surface enhanced Raman scattering approach for high-throughput screening of biocatalysts // *Analytical chemistry*. – 2016. – Vol. 88(11). – P. 5898-5903.

526. White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. – 1990. – P. 315-322.

527. Wiese, J. et al. Diversity of antibiotic- active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea // *Marine Biotechnology*. – 2009. – Vol. 11. – P. 287-300.

528. Willems, T., De Mol, M. L., De Bruycker, A., De Maeseneire, S. L., Soetaert, W. K. Alkaloids from marine fungi: Promising antimicrobials // *Antibiotics*. – 2020. – Vol. 9(6). – P. 340.

529. 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.

530. Worm, B., Barbier, E. B., Beaumont, N., Duffy, J. E., Folke, C., Halpern, B. S., Sala, E. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services // *Science*. – 2006. – Vol. 314(5800). – P. 787-790.
531. Wright, D. H., Brown, G. H., Peterson, M. L., Rotschafer, J. C. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2000. – Vol. 46. – P. 669-683.
532. 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). – P. 2667-2681.
533. Xiong, Z., Wang, R., Xia, T., Zhang, S., Ma, S., Guo, Z. Natural Products and Biological Activity from Actinomycetes Associated with Marine Algae // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28(13). – P. 5138.
534. Xu, K., Yuan, X. L., Li, C., Li, X. D. Recent discovery of heterocyclic alkaloids from marine-derived *Aspergillus* species // *Marine Drugs*. – 2020. – Vol. 18. – P. 54.
535. 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). – P. 976-89.
536. Yang, R., Wei, D. Improving Fucoxanthin Production in Mixotrophic Culture of Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* by LED Light Shift and Nitrogen Supplementation // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 820.
537. Yang, R., Wei, D., Xie, J. Diatoms as cell factories for high-value products: Chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2020. – Vol. 40. – P. 993-1009.
538. Yang, S.-Q. et al. Antibacterial anthraquinone derivatives isolated from a mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans* by ethanol stress strategy // *The Journal of Antibiotics*. – 2018. – Vol. 71(9). – P. 778-784.
539. Yang, Y., Yang, H. Recent Progress and Future Prospective in HBV Cure by CRISPR/Cas // *Viruses*. – 2021. – Vol.14(1). – P. 4.
540. Yao, S. et al. Neutral lipid accumulation at elevated temperature in conditional mutants of two microalgae species // *Plant physiology and biochemistry*. – 2012. – Vol. 61. – P. 71-79.
541. Yoon, B. K. et al. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – Vol. 19(4). – P. 1114.

542. Yousefi, M. et al. Aptasensors as a new sensing technology developed for the detection of MUC1 mucin: A review // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2019. – Vol. 130. – P. 1-19.
543. Yu, W. et al. Isolation and antimicrobial bioactivity of algae-associated actinomycetes from Xisha Islands // *Acta Microbiologica Sinica*. – 2023. – Vol. 63(4). – P. 1472-1489.
544. Yu, X.-J. et al. High-throughput Biochemical fingerprinting of oleaginous *Aurantiochytrium* sp. strains by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for lipid and carbohydrate productions // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24(8). – P. 1593.
545. Yin, C. et al. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models // *Molecular Therapy*. – 2017. – Vol. 25(5). – P. 1168-1186.
546. Yun, J. H., Cho, D. H., Lee, S., Heo, J., Tran, Q. G., Chang, Y. K., Kim, H. S. Hybrid operation of photobioreactor and wastewater-fed open raceway ponds enhances the dominance of target algal species and algal biomass production // *Algal Research*. – 2018. – Vol. 29. – P. 319-329.
547. Zabawinski, C. et al. Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – Vol. 183(3). – P. 1069-1077.
548. Zanella, L., Alam, M. A. Extracts and bioactives from microalgae (*sensu stricto*): Opportunities and challenges for a new generation of cosmetics // *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*. – 2020. – P. 295-349.
549. Zedler, J. AZ. et al. Pilot-scale cultivation of wall-deficient transgenic *Chlamydomonas reinhardtii* strains expressing recombinant proteins in the chloroplast // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2016. – Vol. 100(16). – P. 7061-7070.
550. Zeng, W. et al. A high-throughput screening procedure for enhancing α -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* by random mutagenesis // *Process Biochemistry*. – 2015. – Vol. 50(10). – P. 1516-1522.
551. Zhan, J., Rong, J., Wang, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect // *International journal of hydrogen energy*. – 2017. – Vol. 42(12). – P. 8505-8517.
552. Zhang, P. et al. New indole-diterpenoids from the algal-associated fungus *Aspergillus nidulans* // *Phytochemistry Letters*. – 2015. – Vol. 12. – P. 182-185. (b)
553. Zhang, R. et al. High-throughput genotyping of green algal mutants reveals random distribution of mutagenic insertion sites and endonucleolytic cleavage of transforming DNA // *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26(4). – P. 1398-1409.

554. Zhang, S., Liu, P. H., Yang, X., Hao, Z. D., Zhang, L., Luo, N., Shi J. Isolation and identification by 18S rDNA sequence of high lipid potential microalgal species for fuel production in Hainan Dao // *Biomass Bioenergy*. – 2014. – Vol. 66. – P. 197-203.
555. Zhang, X. et al. A unique indolizinium alkaloid streptopertusacin A and bioactive bafilomycins from marine- derived *Streptomyces* sp. HZP-2216E // *Phytochemistry*. – 2017. – Vol. 144. – P. 119-126.
556. Zhang, X. et al. Effect of enhanced UV- B radiation on photosynthetic characteristics of marine microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae) // *Journal of experimental marine biology and ecology*. – 2015. – Vol. 469. – P. 27-35. (a)
557. Zhang, X. et al. Novel cyclohexene and benzamide derivatives from marine-associated *Streptomyces* sp. ZZ502 // *Natural product research*. – 2019. – Vol. 33(15). – P. 2151-2159.
558. Zhou, M., Guo, J., Cha, J., Chae, M., Chen, S., Barral, J. M., Sachs, M. S., Liu, Y. Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ // *Nature*. – 2013. – Vol. 495(7439). – P. 111-5.
559. Zhou, H. et al. Isoindolone-containing meroperpenoids from the endophytic fungus *Emericella nidulans* HDN12-249 // *Organic letters*. – 2016. – Vol. 18.(18). – P. 4670-4673.
560. Zhou, W. et al. Vaccines' new era-RNA vaccine // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15(8). – P. 1760.
561. Zhu, L. Microalgal culture strategies for biofuel production: a review // *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. – 2015. – Vol. 9(6). – P. 801-814.
562. Zilliges, Y. Glycogen, a dynamic cellular sink and reservoir for carbon // *The cell biology of cyanobacteria*. – 2014. – P. 189-210.
563. Zolotovskaia, M. A., Tkachev, V. S., Guryanova, A. A., Simonov, A. M., Raevskiy, M. M., Efimov, V. V., Wang, Y., Sekacheva, M. I., Garazha, A. V., Borisov, N. M., **Kuzmin, D. V.**, Sorokin, M. I., Buzdin, A. A. OncoboxPD: human 51 672 molecular pathways database with tools for activity calculating and visualization // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2022. – Vol. 20. – P. 2280-2291.
564. Zolotovskaia, M., Sorokin, M., Garazha, A., Borisov, N., Buzdin, A. Molecular Pathway Analysis of Mutation Data for Biomarkers Discovery and Scoring of Target Cancer Drugs // *Methods in Molecular Biology*. – 2020. – Vol. 2063. – P. 207-234.
565. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31. – No. 13. – P. 3406-3415.
566. Zuñiga, C. et al. Predicting dynamic metabolic demands in the photosynthetic eukaryote *Chlorella vulgaris* // *Plant physiology*. – 2018. – Vol. 176(1). – P. 450-462.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Фотографии фотобиореактора Lumian AGS 260



Рассчитанные *in silico* физико-химические свойства BX-SI001 и его производных

Соединение	Структура SMILES	Молярная масса	LogP	TPSA	nON	ОНН Н	nRotB
BX-SI001	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCN(C)C C3</chem>	315,38	3,19	73,3	7	1	5
BX-SI002	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN(CC)CC</chem>	288,35	4,05	70,6	6	1	7
BX-SI003	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN(C)Cc3cccc c3</chem>	336,39	4,7	70,06	6	1	7
BX-SI004	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN4CCN(Cc3c cccc3)CC4</chem>	391,48	4,59	73,7	7	1	7
BX-SI005	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCCN(C) CC3</chem>	329,4	3,46	73,3	7	1	5
BX-SI006	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCOCC3</chem>	302,33	3,14	79,3	7	1	5
BX-SI007	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCC(C(=O)OCC)CC3</chem>	372,43	4,31	96,37	8	1	8
BX-SI008	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCC(O)C C3</chem>	316,36	2,32	90,29	7	2	5
BX-SI009	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCCC3</chem>	286,33	3,7	70,06	6	1	5
BX-SI010	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN(C)CCN(C) C</chem>	317,39	3,33	73,3	7	1	8
BX-SI011	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCC(C)C C3</chem>	314,39	4,45	70,06	6	1	5

BX-SI012	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN(C)CC3CC OCC3</chem>	344,42	4,05	79,3	7	1	7
BX-SI013	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCC(CCO)CC3</chem>	344,42	3,89	90,29	7	2	7
BX-SI014	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN(C)CCc3ccc cn3</chem>	351,41	3,93	82,95	7	1	8
BX-SI015	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN4CCc3cccc 3C4</chem>	348,41	4,69	70,06	6	1	5
BX-SI016	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN3CCC(CCO C)CC3</chem>	358,44	4,51	79,3	7	1	8
BX-SI017	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc cc1c2N=NN4CCC(c3ccc (F)cc3)CC</chem>	394,45	5,93	70,06	6	1	6
BX-SI018	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1 CCN(C)CC1)c2cccnc2n 3C</chem>	330,39	2,36	75,33	8	0	5
BX-SI019	<chem>CCOC(=O)c2c(N=NN(C C)CC)c1cccnc1n2C</chem>	303,37	3,22	72,1	7	0	7
BX-SI020	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN(C)Cc1cccc1)c2cccnc2n3 C</chem>	351,41	3,87	72,1	7	0	7
BX-SI021	<chem>CCOC(=O)c4c(N=NN2 CCN(Cc1cccc1)CC2)c3 cccnc3n4C</chem>	406,49	3,76	75,33	8	0	7
BX-SI022	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1 CCCN(C)CC1)c2cccnc2 n3C</chem>	344,42	2,63	75,33	8	0	5
BX-SI023	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1 CCOCC1)c2cccnc2n3C</chem>	317,35	2,31	81,33	8	0	5
BX-SI024	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1 CCC(C(=O)OCC)CC1)c 2cccnc2n3C</chem>	387,44	3,48	98,4	9	0	8

BX-SI025	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1CCC(O)CC1)c2cccnc2n3C</chem>	331,38	1,49	92,33	8	1	5
BX-SI026	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1CCCC1)c2cccnc2n3C</chem>	301,35	2,87	72,1	7	0	5
BX-SI027	<chem>CCOC(=O)c2c(N=NN(C)CCN(C)C)c1cccnc1n2C</chem>	332,41	2,5	75,33	8	0	8
BX-SI028	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1CCC(C)CC1)c2cccnc2n3C</chem>	329,4	3,62	72,1	7	0	5
BX-SI029	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN(C)CC1CCOCC1)c2cccnc2n3C</chem>	359,43	3,22	81,33	8	0	7
BX-SI030	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1CCC(CCO)CC1)c2cccnc2n3C</chem>	359,43	3,06	92,33	8	1	7
BX-SI031	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN(C)CCc1cccn1)c2cccnc2n3C</chem>	366,43	3,1	84,99	8	0	8
BX-SI032	<chem>CCOC(=O)c4c(N=NN2CCc1ccccc1C2)c3cccnc3n4C</chem>	363,42	3,86	72,1	7	0	5
BX-SI033	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1CCC(CCO)CC1)c2cccnc2n3C</chem>	373,46	3,68	81,33	8	0	8
BX-SI034	<chem>CCOC(=O)c4c(N=NN2CCN(c1ccc(F)cc1)CC2)c3cccnc3n4C</chem>	410,45	4,22	75,33	8	0	6
BX-SI035	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCN(C)CC3</chem>	333,37	3,33	73,3	7	1	5
BX-SI036	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN(CC)CC</chem>	306,34	4,19	70,06	6	1	7
BX-SI037	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN(C)Cc3ccccc3</chem>	354,38	4,84	70,06	6	1	7

BX-SI038	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN4CCN(Cc3ccccc3)CC4	409,46	4,73	73,3	7	1	7
BX-SI039	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCCN(C)CC3	347,39	3,6	73,3	7	1	5
BX-SI040	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCOC C3	320,32	3,28	79,3	7	1	5
BX-SI041	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCC(C(=O)OCC)CC3	390,42	4,45	96,37	8	1	8
BX-SI042	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCC(O)CC3	334,35	2,46	90,29	7	2	5
BX-SI043	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCCC3	304,32	3,84	70,06	6	1	5
BX-SI044	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN(C)CCN(C)C	335,38	3,47	73,3	7	1	8
BX-SI045	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCC(C)CC3	332,38	4,59	70,06	6	1	5
BX-SI046	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN(C)CC3CCOCC3	362,4	4,2	79,3	7	1	7
BX-SI047	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCN(CCO)CC3	363,39	2,7	93,53	8	2	7
BX-SI048	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN(C)CCc3cccn3	369,4	4,07	82,95	7	1	8
BX-SI049	CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN4CCc3ccccc3C4	366,4	4,83	70,06	6	1	5

BX-SI050	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCC(COC)CC3</chem>	376,43	4,65	79,3	7	1	8
BX-SI051	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN4CCN(c3ccc(F)cc3)CC4</chem>	413,43	5,19	73,3	7	1	6
BX-SI052	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1cccc1c2N=NN3CCCC3</chem>	300,36	4,21	70,06	6	1	5
BX-SI053	<chem>CCOC(=O)c3c(N=NN1CCCC1)c2ccnc2n3C</chem>	315,38	3,37	72,1	7	0	5
BX-SI054	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1cc(F)ccc1c2N=NN3CCCC3</chem>	318,35	4,34	70,06	6	1	5
BX-SI055	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc1c2N=NN3CCC(C)C3</chem>	314,39	4,45	70,06	6	1	5
BX-SI057	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc1c2N=NN3CCN(C)C3</chem>	316,37	2,29	86,19	8	1	5
BX-SI058	<chem>CCOC(=O)c2[nH]c1ccc1c2N=NN3CCC(C)C3</chem>	315,38	3,55	82,92	7	1	5

LogP - коэффициент распределения вода-октанол, TPSA (Topological Polar Surface Area) - топологическая площадь полярной поверхности молекулы, nON - количество доноров водородной связи, nOHNN - количество акцепторов водородной связи, nRotB (Rotatable Bonds) - количество вращаемых связей.

Растворимость в воде ВХ-SI001 и его производных

Соединение	Молярная концентрация моль/л	Массовая концентрация г/л	А (площадь пика образа)	О (площадь пика стандарта)
ВХ-SI001	0,00028	0,090501	389241	4300962
ВХ-SI003	0,00009	0,029646	109795	3703532
ВХ-SI005	0,00021	0,070208	313745	4468779
ВХ-SI010	0,00149	0,475472	1517469	3191497
ВХ-SI016	0,01317	0,00001	18918	4004710
ВХ-SI019	0,00029	0,088226	67738	767780
ВХ-SI020	0,00002	0,007528	14418	1915143
ВХ-SI021	0,00001	0,012458	28552	2291776
ВХ-SI027	0,00278	0,927386	1582264	1706154
ВХ-SI035	0,00035	0,011717	65906	624633
ВХ-SI036	0,00003	0,010043	41175	4099932
ВХ-SI037	0,00005	0,018354	65844	3587466
ВХ-SI038	0,000001	0,000383	1416	3698917
ВХ-SI039	0,00009	0,033074	104540	3160783
ВХ-SI040	0,000014	0,00448	27015	6029484
ВХ-SI043	0,000003	0,00088	4677	5314041
ВХ-SI044	0,000005	0,01755	61670	3513898
ВХ-SI045	0,00001	0,002772	8885	3205025
ВХ-SI048	0,00009	0,034892	136328	3907157
ВХ-SI055	0,000004	0,001216	5371	4416755
ВХ-SI057	0,000053	0,016715	23959	1433390
ВХ-SI058	0,000001	0,000399	541	1354526

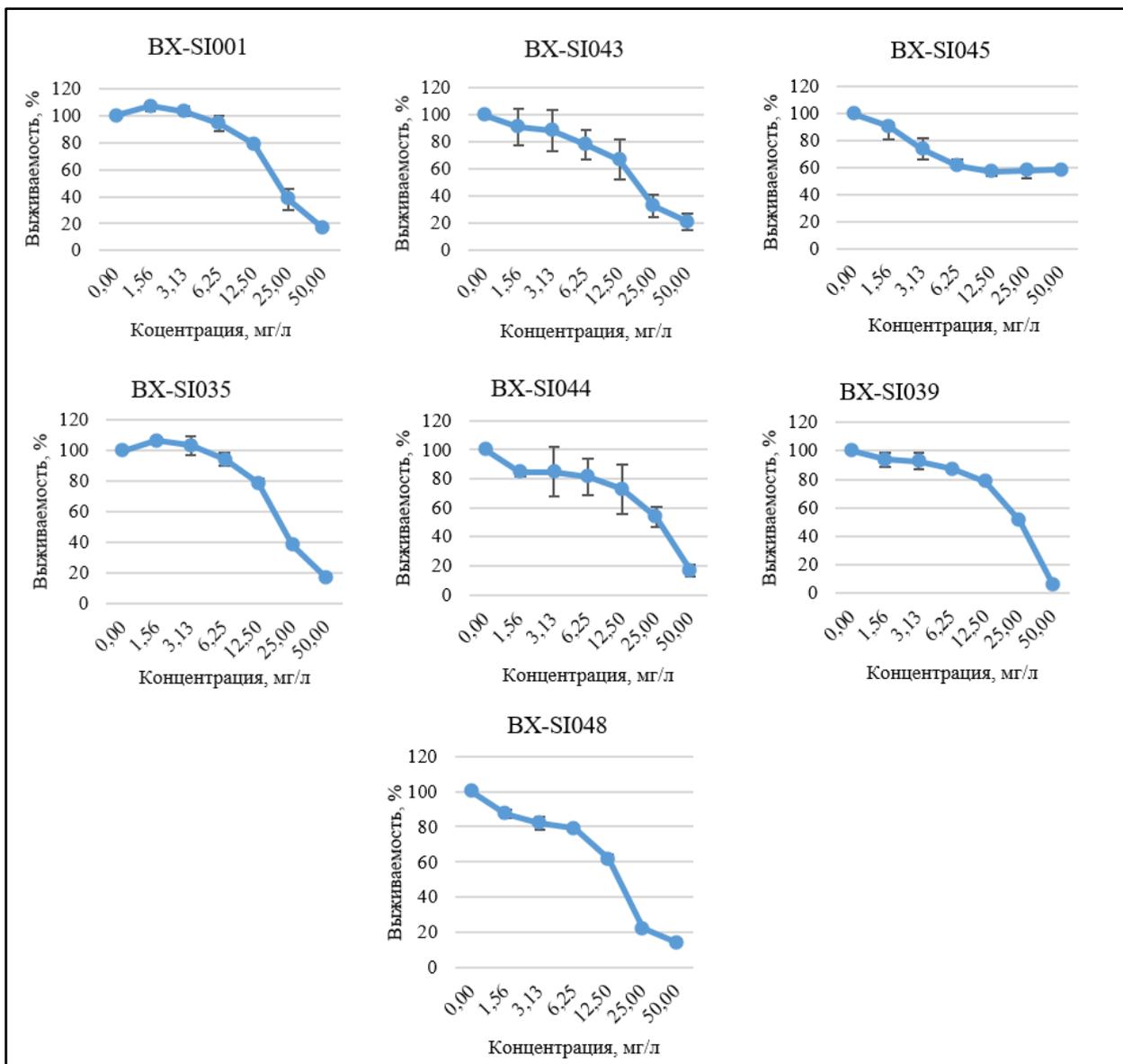
Профиль лекарственной чувствительности клинических изолятов MRSA

MRSA штам м	CEF-CIP- CLIND-ERI- GEN-SUL-TET	Дапто мицин	Фузид невая кислот а	Лине золид	Мупи роцин	Тедиз олид	Телав анцин	Тигец иклин	Ванко мицин
1	S S S S S R R	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
2	S R R R R S R	S	S	S	S	N/D	N/D	R	S
3	S R S S R S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
4	S R S S R S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
5	S R R R R S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
6	R R R R S S S	S	S	S	S	S	N/D	S	S
7	S R R R R S R	S	S	S	S	S	N/D	S	S
8	R R S R R S R	S	S	S	S	S	N/D	R	S
9	S R S R R S R	S	S	S	S	S	N/D	R	S
10	S R S S S S S	S	S	S	S	S	N/D	S	S
11	S R R R S S R	S	S	S	S	S	N/D	R	S
12	R R S S R S R	S	S	S	S	S	N/D	R	S
13	S R R R R S S	S	S	S	S	S	N/D	S	S
14	S S S S S S R	S	S	S	S	S	N/D	S	S
15	S R R R R S S	S	S	S	S	S	N/D	S	S
16	S R S S R I S	S	R	S	S	S	N/D	R	S
17	S R S S R S S	S	S	S	S	S	N/D	S	S
18	R R R R S S R	S	S	S	S	S	N/D	S	S

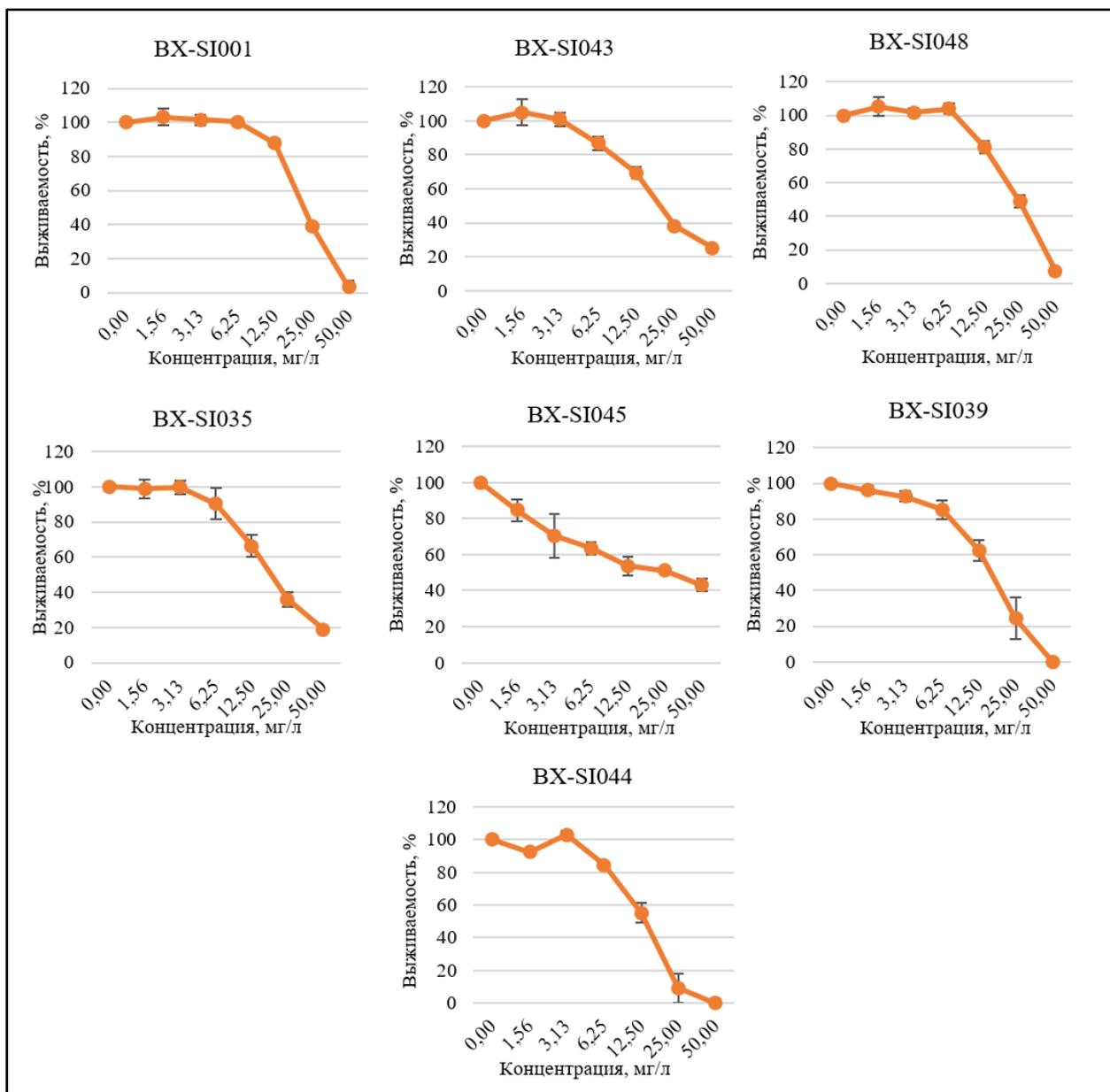
19	S S R R R S S	S	S	S	S	S	N/D	S	S
20	S R S S R S S	S	S	S	S	S	N/D	S	S
21	S S S S R S S	N/D	S	S	S	S	S	S	S
22	S S S S S S S	N/D	S	S	S	S	S	S	S
23	R R S S R S R	N/D	S	S	S	S	S	S	S
24	S R S R R S R	N/D	S	S	S	S	S	S	S
25	S R S S S S S	N/D	S	S	S	S	S	S	S
26	S R S I S S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
27	R R R R R S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
28	R R S I R S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
29	R R S I R S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
30	S S S S S S S	N/D	S	S	S	S	S	S	S
31	S R R R R S R	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
32	R R S S R S R	N/D	S	S	S	S	S	S	S
33	S R S S R S S	N/D	S	S	S	S	S	S	S
34	S R S I R S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
35	R R S I R S S	N/D	S	S	S	S	S	S	S
36	S R R R R S I	N/D	S	S	S	S	S	S	S
37	S R S S S S S	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
38	R R R R R S R	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
39	S S S I S S R	S	S	S	S	N/D	N/D	S	S
40	R S R R R S R	S	S	S	I	/D	/D	S	S
41	S R S S R S S	N/D	S	S	S	S	S	S	S

CEF - цефотаксим, CIP - ципрофлоксацин, CLIND - клиндамицин, ERI - эритромицин, GEN - гентамицин, SUL - сульфаметоксазол, TET - тетрациклин; S - чувствительный, R - устойчивый, I - промежуточный в соответствии с рекомендациями EUCAST, N/D - нет данных.

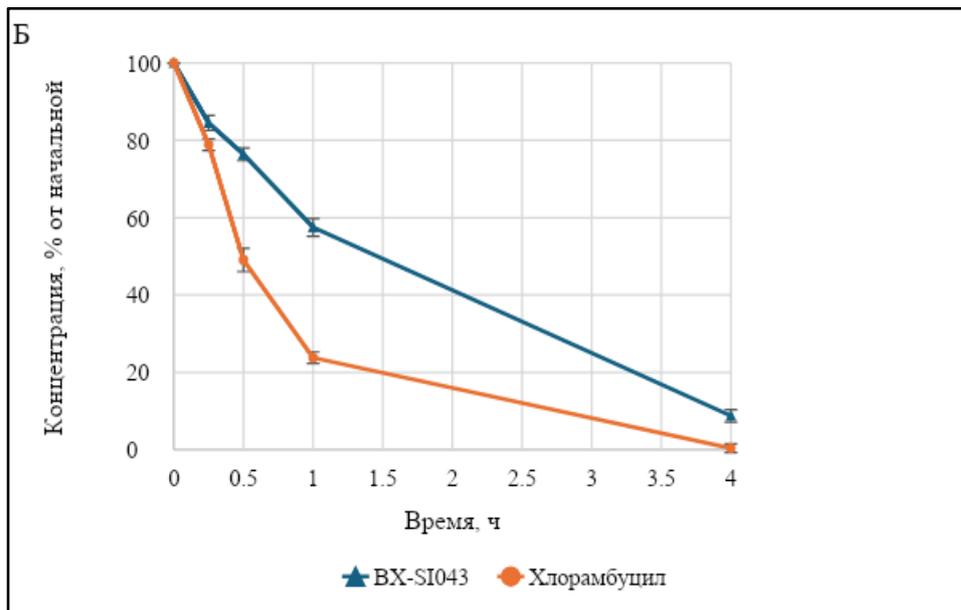
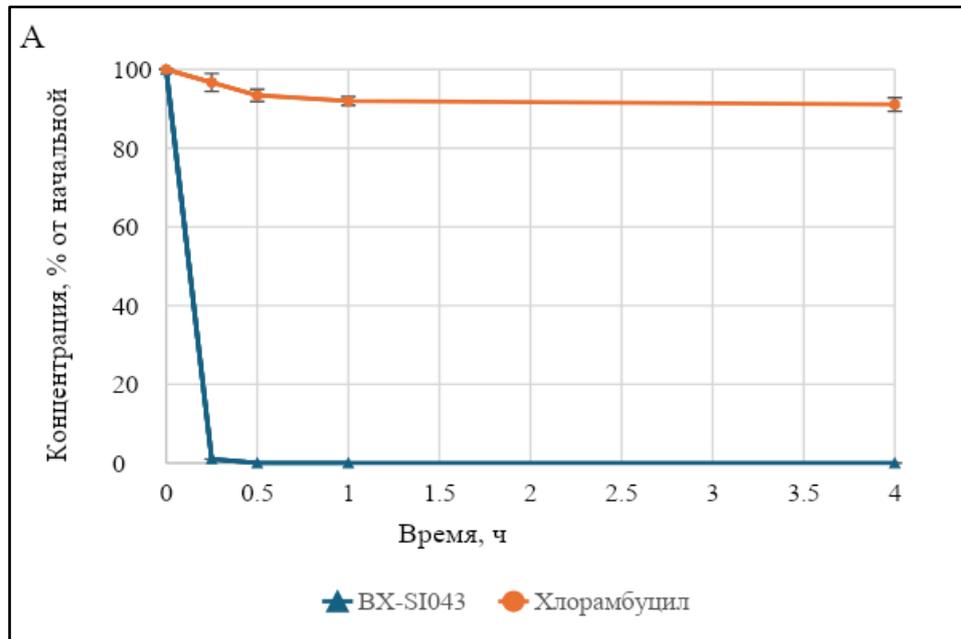
Кривые цитотоксичности вещества ВХ-SI001 и его модификаций на модели эмбриональных фибробластов человека



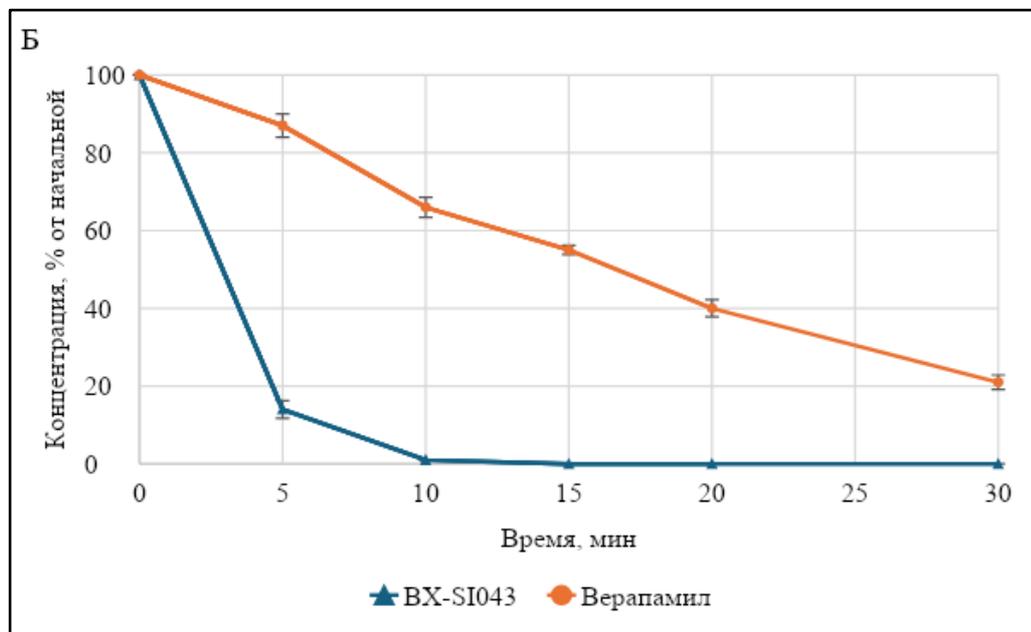
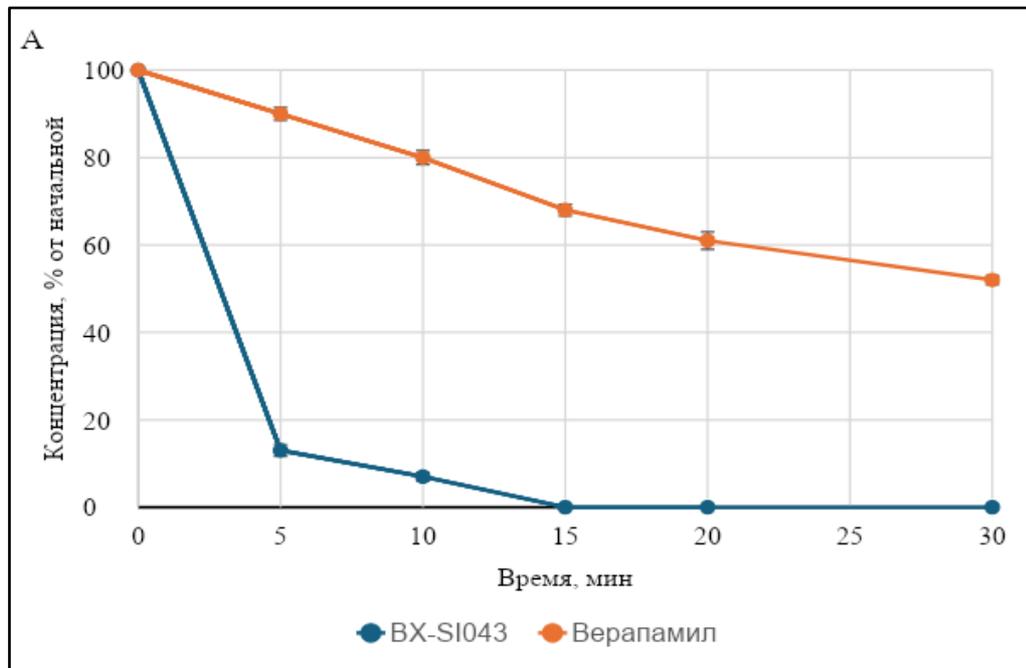
Кривые цитотоксичности вещества VX-SI001 и его модификаций на модели гепатоцитов человека



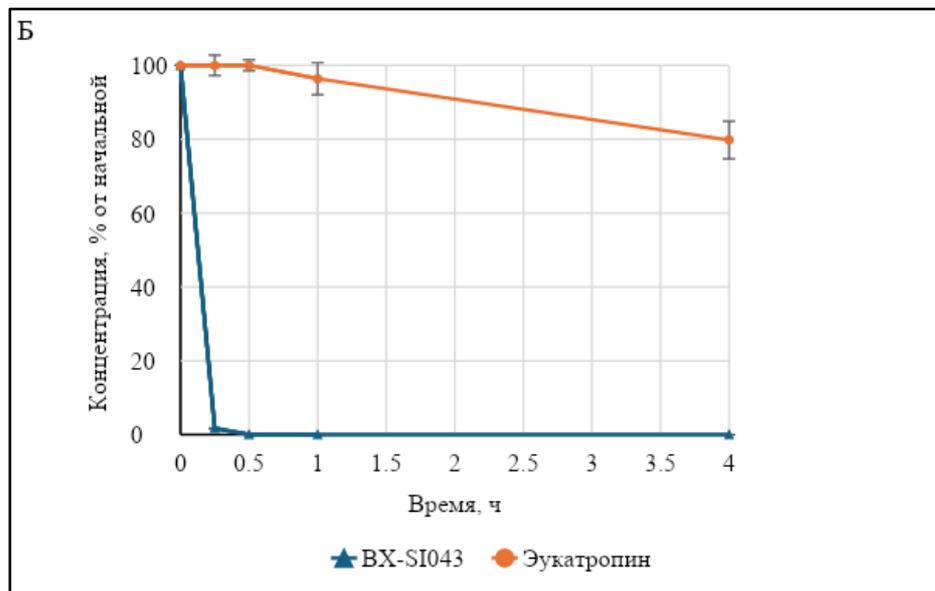
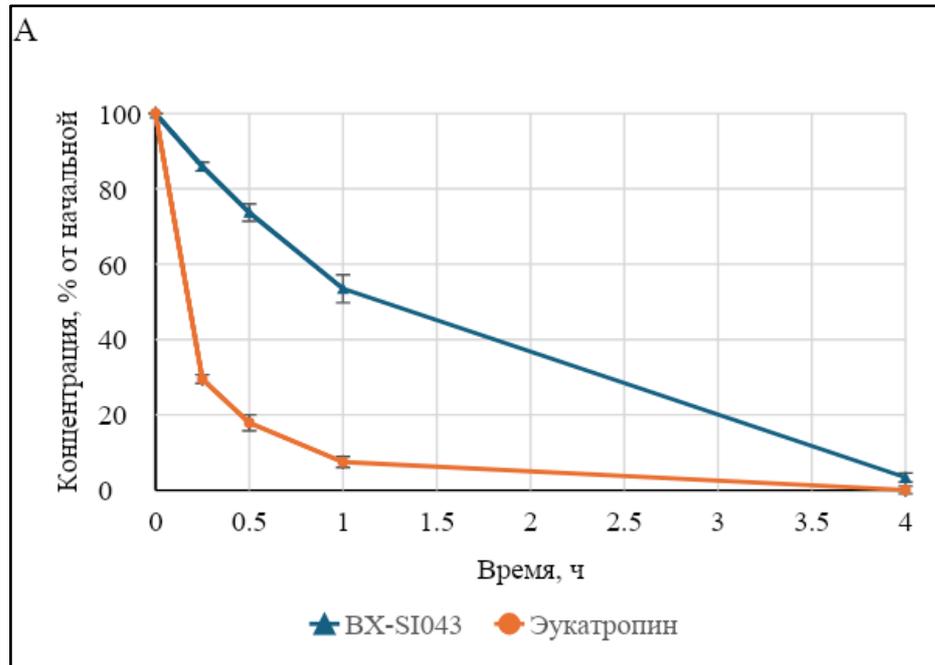
Кинетика разрушения субстанции ВХ-SI043 в искусственном желудочном соке (А) и кишечном соке (Б). В качестве контроля использован хлорамбуцил.



Кинетика разрушения субстанции ВХ-SI043 в микросомальной фракции печени человека (А) и крысы (Б). В качестве контроля использован верапамил.



Кинетика разрушения субстанции ВХ-SI043 в плазме крови человека (А) и крысы (Б). В качестве контроля использован эукатропин.



Концентрационная зависимость связывания контрольного соединения E-4031 (А) и тестируемого вещества ВХ-SI043 (Б) с hERG

