

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИК ДЛЯ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA*

А.Н. Дубовицкая¹, Ю.А. Редько¹, В.Е. Шаповалова², А.О. Лантушенко²,
М.Г. Холявка^{1,2}, В.Г. Артюхов¹

¹Воронежский государственный университет

²Севастопольский государственный университет

Поступила в редакцию 03.06.2024 г.

Аннотация. Статья представляет собой углубленное исследование, посвященное разработке и оптимизации методик для комплексной оценки эффективности работы антиоксидантной системы клеток микроводоросли *Dunaliella salina*. В ходе работы был проведен всесторонний анализ различных методов измерения активности антиоксидантных ферментов, а также уровня продуктов перекисного окисления липидов. Результаты, полученные с помощью этих методов, могут быть использованы для комплексной и детализированной оценки состояния антиоксидантной системы *D. salina*, что имеет важное значение для понимания ее физиологии.

В рамках исследования был тщательно изучен набор ключевых ферментов, участвующих в антиоксидантной защите, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и аскорбатпероксидаза. Также были определены уровни продуктов окислительного стресса, включая малоновый диальдегид (МДА) и диеновые конъюгаты, которые служат маркерами клеточного повреждения.

Кроме того, был проведен анализ спектров поглощения пигментов *D. salina* в различных растворителях. Обнаружено, что количество хлорофилла и каротиноидов может служить надежным индикатором состояния антиоксидантной системы клетки, что открывает новые горизонты для дальнейших исследований.

Установлено, что для полного анализа эффективности работы антиоксидантной системы *D. salina* необходимо использовать как жидкую (супернатант), так и твердую (осадок) фазы, поскольку большинство растворителей не обеспечивают полную экстракцию белков. Однако анализ ферментативной активности накладывает определенные ограничения на диапазон возможных экстрагирующих сред, поскольку необходимо соблюдать условия микроокружения энзима. Показано, что оптимальной экстрагирующей средой является 0,05 М натрий-фосфатный буфер со значением pH 7,5.

Использованные методики позволяют проводить комплексный анализ состояния антиоксидантной системы *Dunaliella salina*, что, в свою очередь, расширяет возможности для изучения ее адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды и повышает потенциал названной микроводоросли для применения в биотехнологии.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, антиоксидантная система, продукты перекисного окисления липидов

Микроводоросли относятся к фотосинтезирующим микроорганизмам и являются источниками липидов, углеводов и каротиноидов [1]. Клетки зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* способны синтезировать чрезвычайно высокое количество β -каротина (до 10% от сухого веса) [2]. β -каротин относится к классу каротиноидов – светопоглоща-

ющих пигментов, проявляющих антиоксидантные свойства. Он вырабатывается многими морскими животными, высшими растениями и микроорганизмами, включая микроводоросли [3-5]. Благодаря своим физико-химическим свойствам, мощной антиоксидантной активности и многовекторному благоприятному воздействию на здоровье человека и животных β -каротин находит широкое применение в кормовой, пищевой, нутрицевтической и фармацевтической промышленности [6-7]. В

2015 году мировой рынок β -каротина оценивался примерно в 432 миллиона долларов США, при этом 36% выручки приходилось на природный β -каротин, полученный из микроводорослей [8].

Высокое содержание каротина в *D. salina* делает ее перспективной клеточной фабрикой для крупномасштабного производства природного β -каротина. Тем не менее, *D. salina* присущи такие ограничения, как медленный рост и низкий выход биомассы. Кроме того, механизм регуляции выработки β -каротина у *D. salina* неясен, что создает трудности для экономически целесообразного производства β -каротина на промышленном уровне. Однако известно, что увеличение внутриклеточного содержания β -каротина часто сопровождается повышением уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках микроводорослей в ответ на абиотические стрессовые факторы, такие как высокая освещенность, высокая соленость и недостаток питательных веществ [9-10].

Активные формы кислорода (АФК), к которым относятся свободные радикалы и нерадикальные молекулы, являются ключевыми компонентами сети сигнальных путей и действуют как основные регуляторы клеточных реакций и клеточной физиологии растений на факторы окружающей среды посредством запуска каскадов фосфорилирования и окисления ключевых сигнальных молекул [11-12].

К распространенным АФК относят синглетный кислород (1O_2), супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}). Как правило, в нормальных физиологических условиях АФК представляют собой побочные продукты многих метаболических путей растений и, следовательно, они непрерывно синтезируются в различных клеточных компартментах. С другой стороны, АФК также нейтрализуются антиоксидантной защитной системой.

Умеренный уровень АФК полезен для клеток, так как в этом случае они действуют как сигнальные молекулы, которые регулируют экспрессию генов и запускают механизмы защиты в ответ на изменения окружающей среды [13-14].

Однако накопление АФК вызывает окислительный стресс, который представляет собой окислительное повреждение белков, ДНК и липидов. В нестрессовых условиях АФК эффективно устраняются ферментативными и ферментативными антиоксидантами, тогда как в условиях засухи или засоления продукция АФК превышает способность антиоксидантных систем удалять их, вызывая окислительный стресс [15].

Хорошо известна корреляция между антиоксидантной активностью и толерантностью микроводорослей к высокой концентрации соли, в частности, растения с высоким содержанием основных или индуцированных антиоксидантов обладают большей устойчивостью к повреждению [16-17].

Для детоксикации АФК и предотвращения повреждений при солевом стрессе растения используют ряд низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбат, глутатион, фенольные соединения, токоферолы), а также различные антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза или каталаза [18-19].

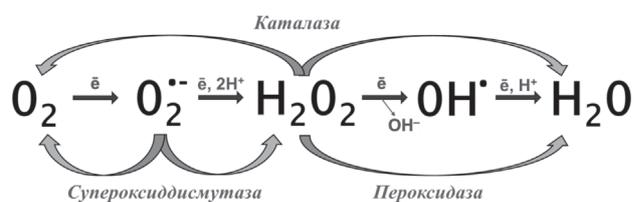


Рис. 1. Схема действия ферментов системы антиоксидантной защиты растений

В частности, супероксидный анион-радикал способен вырабатываться как в нестрессовых, так и в стрессовых условиях. Первой линией защиты клетки от АФК является супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1), катализирующая процесс дисмутации (диспропорционирования) супероксидного радикала в пероксид водорода и молекулярный кислород [20-21].

В то же время пероксид водорода (H_2O_2) является наиболее важной и относительно стабильной нерадикальной АФК. Увеличение количества H_2O_2 наблюдается во время биотического и/или абиотического стрессового режима, такого как атака патогена, УФ-облучение, воздействие интенсивного света, засуха, засоление и/или охлаждение. В частности, количество клеточного H_2O_2 вместе с другими АФК может являться хорошим маркером степени окислительного стресса. Как следствие, баланс активности пероксидаз (КФ 1.11.1.7) и, в частности, аскорбатпероксидазы, и каталазы (КФ 1.11.1.6), представляющих собой основную ферментативную линию защиты от H_2O_2 в растениях, имеет решающее значение для подавления токсичных уровней H_2O_2 в клетке.

К пероксидазам (КФ 1.11.1.7) относят группу ферментов, использующих в качестве окислителя пероксид водорода: НАДН-пероксидазу, НАДФН-пероксидазу, глутатион-пероксидазу, гваяколпероксидазу, аскорбатпероксидазу и др. Все они работают по схеме $AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$ [22].

Ферменты аскорбатпероксидаза, глутатионпероксидаза и каталаза способны нейтрализовать H_2O_2 с помощью различных механизмов. В частности, аскорбатпероксидаза способна нейтрализовать даже очень низкие уровни пероксида водорода, осуществляя реакцию $H_2O_2 + \text{аскорбат} \rightarrow H_2O + \text{монодегидроаскорбат}$, где аскорбат выступает в качестве восстанавливающего субстрата. Каталаза же напрямую преобразует H_2O_2 в H_2O и $1/2 O_2$ и в основном активна при относительно высоких концентрациях H_2O_2 . Количество данных ферментов находится в физиологическом балансе, и при его нарушении индуцируются компенсаторные механизмы (т.е. пероксидазы активируются, когда активность или количество каталазы снижается) [15, 23].

Основным показателем эффективности работы ферментов антиоксидантной защиты является количество продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ). При распаде жирных кислот, сопровождающем ПОЛ, сначала образуются диеновые конъюгаты, а затем такие метаболиты, как малоновый диальдегид. Продуктами ПОЛ могут быть и более простые соединения, например такие, как пентан и этан. ПОЛ прежде всего повреждает клеточные мембраны, что, в свою очередь, приводит к нарушениям функций мембранных белков и внутриклеточной компартментации веществ. Продукты окислительной модификации липидов вызывают мутации и блокируют клеточное деление [22]. Именно поэтому для оценки степени стресса растений необходим комплексный подход, включающий измерение как активностей ферментов системы антиоксидантной защиты, так и количества продуктов ПОЛ.

Целью данной работы был подбор и оптимизация протоколов для экстракции ферментов антиоксидантного комплекса (супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, каталаза), первичных и вторичных продуктов ПОЛ, а также пигментов из микроводоросли *Dunaliella salina*, что позволит в дальнейшем проводить комплексную оценку антиоксидантной системы клеток при индуцированном каротиногенезе под воздействием различных комбинаций абиотических факторов.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Экстракция ферментов из клеток водоросли

В работе использовали водоросль *Dunaliella salina* из коллекции Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН (ИнБИОМ), выращенной при солености 2М. Для экстракции

ферментов клетки водоросли подсчитывались в камере Горяева и концентрировались до 8×10^6 кл/мл. Полученную суспензию клеток центрифугировали на скорости 6000 об/мин, осадок заливали экстрагентом и гомогенизировали, полученный гомогенат центрифугировали при 13000 об/мин, отбирали супернатант в отдельную пробирку, к осадку добавляли фосфатный буфер. В качестве экстракционных растворов использовались полярные растворители, такие как: дистиллированная вода, фосфатный буфер (0,05М, рН 7,5), этанол и изопропанол. Разрушение клеточной мембраны проводилось последовательной заморозкой-разморозкой при -20°C и 37°C , соответственно.

Измерение содержания белка

Содержание белка определяли методом Лоури [24].

Измерение аскорбатпероксидазной активности

Измерение аскорбатпероксидазной активности проводилось с использованием аскорбиновой кислоты в качестве субстрата с некоторыми модификациями [25].

Метод основан на определении скорости разложения пероксида водорода аскорбатпероксидазой образца с образованием воды и дегидроаскорбата. Снижение концентрации аскорбиновой кислоты, вовлекающейся в реакцию, регистрировали с помощью спектрофотометра путем наблюдения за максимумом на длине волны 290 нм.

К 2 мл образца приливали 2 мл 0,5 мМ аскорбиновой кислоты, затем смесь инкубировали на протяжении 10 минут для удаления пероксида водорода, изначально присутствующего в образце. Затем в кювету переносили 2 мл опытной смеси, добавляли 1 мл 0,3% пероксида водорода и регистрировали значение оптической плотности на отметках в 30 и 60 сек для дальнейшего расчета ΔD . Регистрацию оптических плотностей проводили с помощью спектрофотометра UV-2401 PC (Shimadzu, Япония) на длине волны 290 нм. Для расчета активности аскорбатпероксидазы использовали значение коэффициента молярной экстинкции раствора аскорбиновой кислоты, равное $2,8 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Измерение каталазной активности

К 250 мкл образца добавляли реакционную смесь, содержащую 250 мкл 0,01М фосфатного буфера с рН 6,7, 250 мкл ЭДТА (0,1 мМ/л) и 750 мкл H_2O_2 (15 мМ/л). В качестве контрольной пробы для учета спонтанной реакции разложения пероксида водорода использовали реакционную смесь с дополнительными 0,25 мл фосфатного

буфера. Смесь инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Для остановки реакции добавляли 250 мкл 10% H_2SO_4 и затем измеряли оптическую плотность при длине волны 250 нм [26].

За единицу активности каталазы (А) принимали такое количество (в молях) пероксида водорода, которое разложилось при инкубации в единицу времени:

$$A = \frac{\Delta D \cdot V_1 \cdot c_1}{D_0 \cdot V_2 \cdot c_2 \cdot t}$$

где ΔD – разность оптических плотностей опытной и контрольной проб; D_0 – оптическая плотность холостой пробы; V_1 – общий объем инкубационной смеси; V_2 – объем исследуемого образца; c_1 – концентрация H_2O_2 ; c_2 – концентрация белка в пробе; t – время инкубации.

Измерение активности супероксиддисмутазы (СОД)

Метод определения активности СОД основан на ее способности конкурировать с красителем нитросиним тетразолиевым (НСТ) за супероксидные анион-радикалы, образующиеся при генерации их в системе тетраметилэтилендиамин-рибофлавин. В ходе реакции НСТ восстанавливается с образованием гидразинтетразолия, характеризующегося максимумом поглощения при 540 нм. В присутствии СОД степень восстановления НСТ уменьшается [26].

К 500 мкл образца добавляли реакцию смесь, содержащую 500 мкл фосфатного буфера, 500 мкл ТЭМЭД (0,05 моль/л) в ЭДТА (0,2 моль/л), 500 мкл НСТ (0,85 ммоль/л), 2,5 мл дистиллированной воды и 1 мл рибофлавина (0,034 ммоль/л). Смесь инкубировали на солнечном свете 5 минут. Для остановки реакции добавляли 0,5 мл раствора KI (1%), затем проводили регистрацию оптических плотностей при длине волны 540 нм (UV-2401 PC, Shimadzu, Япония). В качестве контрольной пробы использовалась реакция смесь в отсутствие образца.

За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое обеспечивает ингибирование восстановления нитросинего тетразолиевого красителя на 50%. Активность СОД (А) рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{(K-O)}{K \cdot 100\%}$$

где K – оптическая плотность контрольной пробы; O – оптическая плотность опытной пробы.

Измерение количества продуктов ПОЛ

Проводилось измерение уровня первичных (диеновые конъюгаты) и вторичных (малоновый диальдегид) продуктов пероксидного окисления липидов.

Количество диеновых конъюгатов определяли по методу, основанному на свойствах сопряженных двойных связей, входящих в состав гидроперекисей липидов, интенсивно поглощать в УФ-области с характерным максимумом (232 нм) [27].

Для этого к 2 мл суспензии микроводоросли добавляли 4 мл гептана и 4 мл изопропилового спирта, смесь активно встряхивали. Затем добавляли 1 мл воды для более четкого раздела фаз и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. После этого верхнюю (гептановую) фазу отбирали по 0,5 мл в кювету, добавляли 2,5 мл этанола и спектрофотометрировали против этилового спирта при 232 нм. Расчет количества диеновых конъюгатов производили с учетом коэффициента молярной экстинкции $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Для определения количества малонового диальдегида к 2 мл образца добавляли 1 мл ТХУ (17 %) и 1 мл ГБК (0,8%). Смесь помещали на 10 мин на водяную баню. После периода охлаждения регистрировали оптическую плотность при длине волны 532 нм. Расчет количества МДА производили с учетом коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [26].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами была проведена оценка содержания белка во фракциях, полученных путем экстрагирования из клеток *Dunaliella salina* (рис. 2). Количество белка незначительно варьировалось во фракциях супернатанта и осадка при использовании изопропанола, воды и натрий-фосфатного буфера в качестве экстрагирующих сред. В присутствии этанола белок преимущественно регистрировался в осадке.

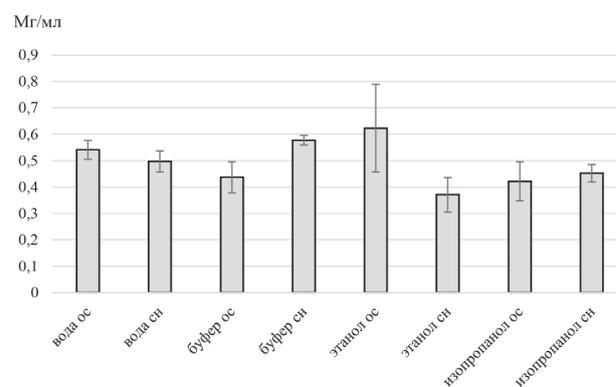


Рис. 2. Содержание белка во фракциях, полученных путем экстрагирования белка из клеток *Dunaliella salina* (здесь и далее: ос – осадок, сн – супернатант)

Измерение пероксидазной активности проводилось с использованием аскорбиновой кислоты в качестве субстрата. Представлены результаты экспериментов измерения активности фермента в твердой фазе (осадке), так как значения активности аскорбатпероксидазы во фракции супернатанта статистически значимо не отличались от контроля.

Наибольшая активность аскорбатпероксидазы и супероксиддисмутазы наблюдалась в образцах, полученных путем экстракции с помощью буферного раствора и дистиллированной воды (рис. 3). Низкая каталитическая активность ферментов антиоксидантного комплекса при экстракции с помощью этанола и изопропанола легко объясняется их денатурацией в результате взаимодействия с сильными органическими растворителями.

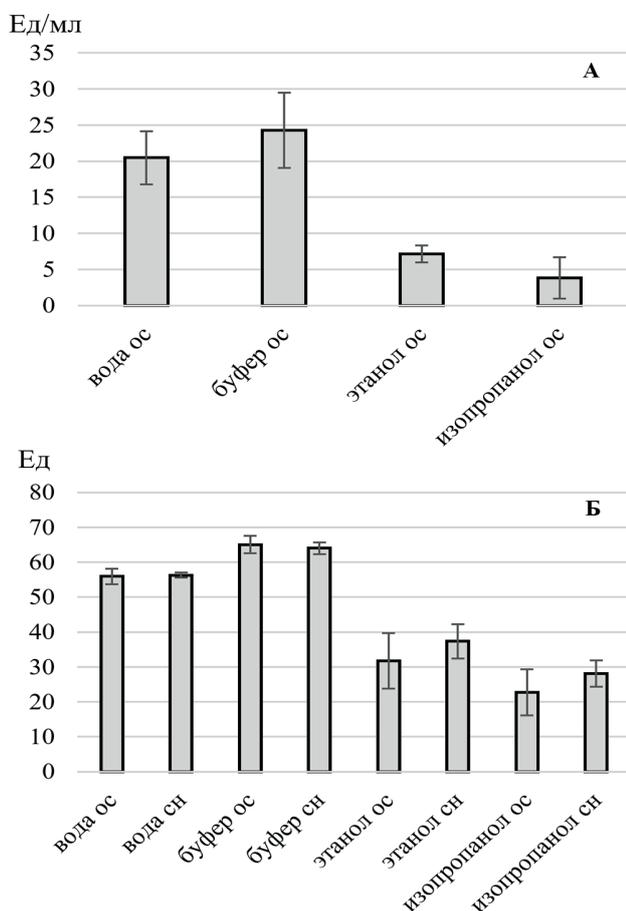


Рис. 3. Ферментативная активность аскорбатпероксидазы (А) и супероксиддисмутазы (Б) во фракциях, полученных путем экстрагирования из клеток *Dunaliella salina*

В ходе исследования каталазной активности (рис. 4) была зарегистрирована способность этанола и изопропанола вызывать активный окислительный стресс, наиболее ярко проявляющийся во фракции супернатанта при использовании изо-

пропанола в качестве экстракционного раствора, что подтверждается высокими значениями активности каталазы.

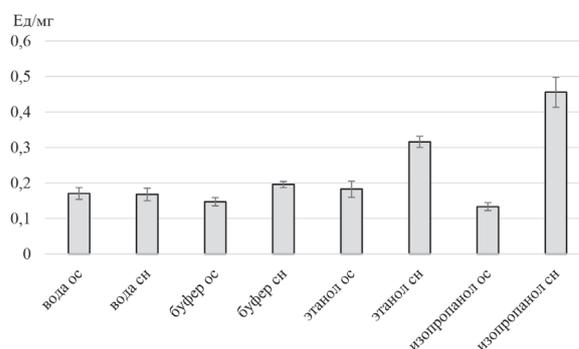


Рис. 4. Ферментативная активность каталазы во фракциях, полученных путем экстрагирования из клеток *Dunaliella salina*

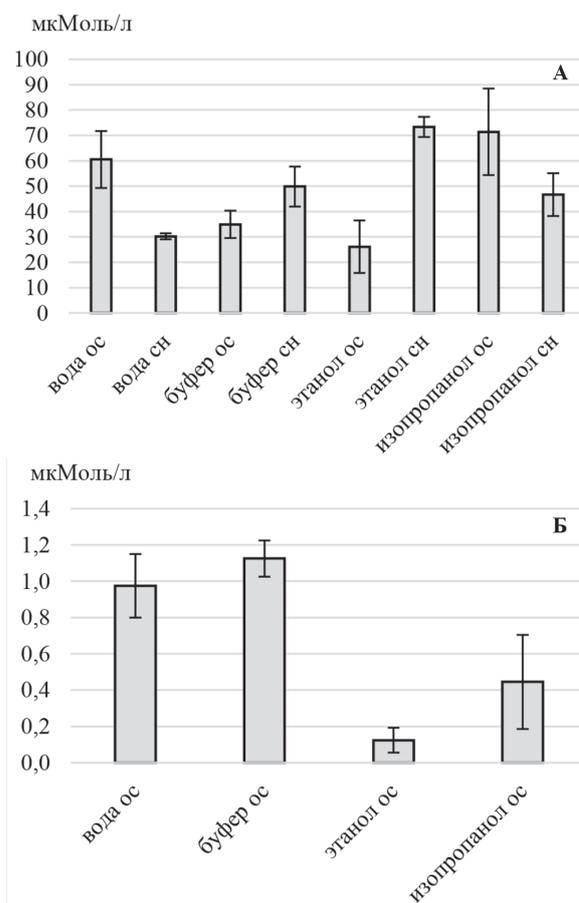


Рис. 5. Количество первичных (диеновых конъюгатов) и вторичных (малонового диальдегида) продуктов пероксидного окисления липидов (А – количество диеновых конъюгатов, Б – количество малонового диальдегида) во фракциях, полученных путем экстрагирования из клеток *Dunaliella salina*

В рамках исследования интенсивности ПОЛ также было проведено измерение количества продуктов пероксидного окисления липидов: первичных – диеновых конъюгатов, наблюдающихся как в твердой, так и в жидкой фазах, и вторичных – малонового диальдегида, находящегося во фракциях осадка, тогда как значения, полученные для супернатанта, статистически значимо не отличались от контроля.

Согласно полученным данным, количество диеновых конъюгатов сильно варьирует в зависимости от экстракционного раствора, и наибольшее их количество наблюдается при использовании в качестве растворителей изопропанола и этанола. Наименьшее значение количества диеновых конъюгатов было выявлено в экстрактах, полученных при использовании натрий-фосфатного буфера как экстрагента. Тем не менее, в отношении малонового диальдегида наблюдается обратный эффект, и наименьшее количество МДА регистрируется при использовании в качестве растворителя этанола, тогда как наибольшие значения выявлено в образцах, полученных экстракцией из клеток в присутствии буфера (рис. 5).

Был также проведен спектрофотометрический анализ растворов пигментов, выделенных из экстракта *Dunaliella salina* (рис. 6).

С использованием следующих формул был произведен расчет количества пигментов (табл. 1), выделенных с помощью ацетона и этилового спирта в качестве экстрагентов.

Ацетон [28]:

$$C_{(a)} \text{ (мкг/мл)} = 11,75 A_{662} - 2,350 A_{645} \quad (1),$$

$$C_{(b)} \text{ (мкг/мл)} = 18,61 A_{645} - 3,960 A_{662} \quad (2),$$

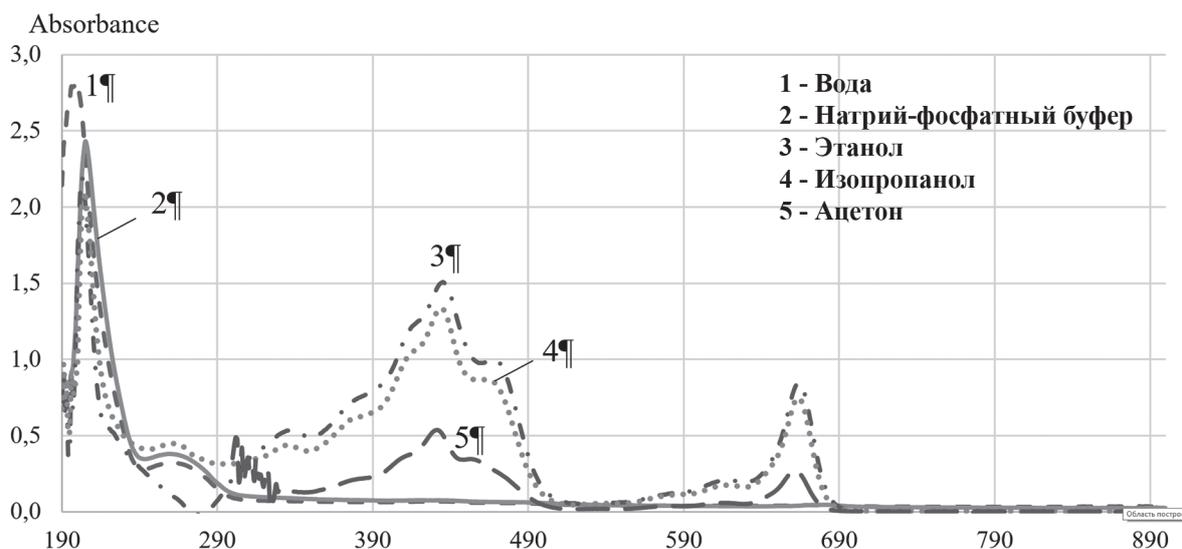


Рис. 6. Спектры поглощения веществ, экстрагированных из клеток *Dunaliella salina* с помощью различных растворителей

$$C_{(x+c)} \text{ (мкг/мл)} = (1000 A_{470} - 2,270 C_a - 81,4 C_b) / 227 \quad (3),$$

Этанол [29]:

$$C_{(a)} \text{ (мкг/мл)} = 13,36 A_{664.1} - 5,19 A_{648.6} \quad (4),$$

$$C_{(b)} \text{ (мкг/мл)} = 27,43 A_{648.6} - 8,12 A_{664.1} \quad (5),$$

$$C_{(x+c)} \text{ (мкг/мл)} = (1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97,64 C_b) / 209 \quad (6).$$

Таблица 1

Количество пигментов (мкг/мл) в суспензии микроводоросли, полученных путём экстрагирования из клеток *Dunaliella salina* с помощью ацетона и этанола

Пигмент	Растворитель	
	Ацетон	Этанол
Хлорофилл А	2,94	9,29
Хлорофилл В	0,95	3,75
Каротиноиды	0,78	2,91

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования были подобраны протоколы для экстракции ферментов антиоксидантного комплекса, первичных и вторичных продуктов ПОЛ, а также каротиноидов из микроводоросли *Dunaliella salina*, разработана и оптимизирована методика для комплексной оценки состояния антиоксидантной системы клеток названной микроводоросли.

На основе проведенных экспериментов был установлен факт неполной экстракции белков из суспензии *Dunaliella salina* в жидкую фазу при использовании большинства растворителей, что приводит к необходимости использования как жидкой (супернатант), так и твердой (осадок) фаз при проведении исследований окислительно-восстановительного статуса клеток микроводоросли. Тем не менее, анализ ферментативной активности накладывает определенные ограничения на диапазон возмож-

ных экстрагирующих сред вследствие необходимости соблюдения условий микроокружения энзима, в связи с чем оптимальным экстрагирующей средой является 0,05М натрий-фосфатный буфер со значением pH 7,5.

Работа выполнена в рамках госзадания «Фотобиофизический мониторинг окружающей среды на основе спектрально-флуоресцентных свойств структурно-организованных молекулярных (включая наночастицы) и супрамолекулярных биологически важных систем (FEFM-2023-0005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chew K. W. Microalgae biorefinery: High value products perspectives / K. W. Chew, J. Y. Yap, P. L. Show, N. H. Suan, J. Ch. Juan, T. Ch. Ling, D.-J. Lee, J.-Sh. Chang // *Bioresource Technology*. – 2017. – Vol. 229. – Microalgae biorefinery. – P. 53-62.
2. Xu Y. Carotenoid Production by *Dunaliella salina* under Red Light / Y. Xu, P. J. Harvey // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – No 5. – P. 123.
3. Takaichi S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions / S. Takaichi // *Marine drugs*. – 2011. – Vol. 9. – №. 6. – С. 1101-1118.
4. Zhang J. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health / J. Zhang, Z. Sun, P. Sun, T. Chen, F. Chen // *Food & Function*. – 2014. – Vol. 5. – Microalgal carotenoids. – No 3. – P. 413.
5. Ben-Amotz A. Mode of Action of the Massively Accumulated β -Carotene of *Dunaliella bardawil* in Protecting the Alga against Damage by Excess Irradiation / A. Ben-Amotz, A. Shaish, M. Avron // *Plant Physiology*. – 1989. – Vol. 91. – No 3. – P. 1040-1043.
6. Jin E. S. Microalgal biotechnology: Carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina* / E. S. Jin, A. Melis // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2003. – Vol. 8. – Microalgal biotechnology. – No 6. – P. 331-337.
7. Liang M.H. High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress / M.H. Liang, L. Wang, Q. Wang, J. Zhu, J. G. Jiang // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2019. – Vol. 59. – High-value bioproducts from microalgae. – No 15. – P. 2423-2441.
8. Nethravathy M. U. Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products: Commercial Potential, Market Space, and Sustainability / M. U. Nethravathy, J. G. Mehar, S. N. Mudliar, A. Y. Shekh // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2019. – Vol. 18. – Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products. – No 6. – P. 1882-1897.
9. Cowan A. K. *Dunaliella salina* : A model System for Studying the Response of Plant Cells to Stress / A. K. Cowan, P. D. Rose, L. G. Horne // *Journal of Experimental Botany*. – 1992. – Vol. 43. – *Dunaliella salina*. – No 12. – P. 1535-1547.
10. Lamers P. P. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications / P. P. Lamers, M. Janssen, R. C. H. De Vos, R. J. Bino, R. H. Wijffels // *Trends in Biotechnology*. – 2008. – Vol. 26. – No 11. – P. 631-638.
11. Shi K. Reactive Oxygen Species-Mediated Cellular Stress Response and Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms: The State of the Art and Future Perspectives / K. Shi, Z. Gao, T.-Q. Shi, P. Song, L. J. Ren, H. Huang, X. J. Ji // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – Reactive Oxygen Species-Mediated Cellular Stress Response and Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. – P. 793.
12. Zhang L. Response of lipid biosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa* to intracellular reactive oxygen species level under stress conditions / L. Zhang, C. Liao, Y. Yang, Y.-Zh. Wang, K. Ding, D. Huo, Ch. Hou // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 287. – P. 121414.
13. Cowan A. K. Abscisic Acid Metabolism in Salt-Stressed Cells of *Dunaliella salina*: Possible Interrelationship with β -Carotene Accumulation / A. K. Cowan, P. D. Rose // *Plant Physiology*. – 1991. – Vol. 97. – Abscisic Acid Metabolism in Salt-Stressed Cells of *Dunaliella salina*. – No 2. – P. 798-803.
14. Liu W. Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation / W. Liu, Y. Ming, P. Li, Z. Huang // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2012. – Vol. 54. – P. 43-48.
15. Sofo A. Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses / A. Sofo, A. Scopa, M. Nuzzaci, A. Vitti // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – No 6. – P. 13561-13578.
16. Parida A. K. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review / A. K. Parida, A. B. Das // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2005. – Vol. 60. – Salt tolerance and salinity effects on plants. – No 3. – P. 324-349.
17. Tammam A. A. Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella*

tertiolecta / A. A. Tammam, E. M. Fakhry, M. El-Sheekh // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10. – No 19. – P. 3795-3808.

18. Cavalcanti F. R. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea / F. R. Cavalcanti, J. P. M. Santos Lima, S. L. Ferreira-Silva, R. A. Viégas, J. A. G. Silveira // Journal of Plant Physiology. – 2007. – Vol. 164. – No 5. – P. 591-600.

19. Hediye Sekmen A. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media* / A. Hediye Sekmen, İ. Türkan, S. Takio // Physiologia Plantarum. – 2007. – Vol. 131. – No 3. – P. 399-411.

20. Alscher R. G. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants / R. G. Alscher, N. Erturk, L. S. Heath // Journal of Experimental Botany. – 2002. – Vol. 53. – No 372. – P. 1331-1341.

21. Tyagi S. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Stress Tolerance in Plants / S. Tyagi, Shumayla, S. P. Singh, S. K. Upadhyay // Molecular approaches in plant biology and environmental challenges. – 2019. – P. 51-77.

22. Чукина Н. В. Методы оценки антиоксидантного статуса растений : учебно-методическое пособие для студентов, обучающихся по программе бакалавриата по направлению подготовки 020400 «Биология». Методы оценки антиоксидантного статуса растений / Н. В. Чукина Г. Г. Борисова, М. Г. Малева, Н. Ф. Некрасова – Екатеринбург : Издательство Уральского университета, 2012. – 67 с.

23. Anjum N. A. Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants / N. A. Anjum, P. Sharma, S. S. Gill, M. Hasanuzzaman, E. A. Khan, K. Kachhap, A. A.

Mohamed, P. Thangavel, G. D. Devi, P. Vasudhevan, A. Sofo, N. A. Khan, A. N. Misra, A. S. Lukatkin, H. P. Singh, E. Pereira, N. Tuteja // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – Vol. 23. – No 19. – P. 19002-19029.

24. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193. – No 1. – P. 265-275.

25. Nakano Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // Plant and cell physiology. – 1981. – Vol. 22. – No. 5. – P. 867-880.

26. Артюхов В. Г. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: Учеб. пособие / В. Г. Артюхов, М. А. Наквасина // Воронеж: Издательство Воронежского государственного университета, 2000. – 296 с.

27. Кублицкая А. Д. Содержание диеновых конъюгатов в тканях раннецветущих растений в зависимости от вида, типа органа и местопрорастания / А. Д. Кублицкая, А. В. Юрченко // Витебский государственный университет им. П.М. Машерова, 2016. – P. 61-63.

28. DERE Ş. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents / Ş. DERE, T. GÜNEŞ, R. SIVACI // Turkish Journal of Botany. – 1998. – Vol. 22. – No 1. – P. 13-18.

29. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV - VIS Spectroscopy / H. K. Lichtenthaler, C. Buschmann // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2001. – Vol. 1. – Chlorophylls and Carotenoids. – No 1. – P. F4. 3.1-F4. 3.8.

*Воронежский государственный университет
Дубовицкая Анастасия Николаевна, аспирант
кафедры биофизики и биотехнологии, младший
научный сотрудник*

E-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru

*Редько Юлия Александровна, аспирант кафе-
дры биофизики и биотехнологии*

E-mail: redkoju@yandex.ru

*Voronezh State University
Dubovitskaya Anastasia N., postgraduate student
of the Department of Biophysics and Biotechnology,
junior researcher*

E-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru

*Redko Yulia A., postgraduate student of the
Department of Biophysics and Biotechnology*

E-mail: redkoju@yandex.ru

Холявка Марина Геннадьевна, д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии; профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета

E-mail: holyavka@rambler.ru

Holyavka Marina G., DSci., Professor of the Department of Biophysics and Biotechnology; Professor of Physics Department, Sevastopol State University

E-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов Валерий Григорьевич, д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov Valeriy G., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Севастопольский государственный университет
Шаповалова Вероника Евгеньевна, младший научный сотрудник НИЛ «Биоресурсный потенциал приморской территории» Института перспективных исследований

E-mail: veshapovalova@mail.sevsu.ru

Sevastopol State University
Sevastopol State University
Shapovalova Veronika E., Junior Researcher, Research Laboratory "Seashore Bioresources" Institute for Advanced Studies

E-mail: veshapovalova@mail.sevsu.ru

Лантушенко Анастасия Олеговна, к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник НИЛ "Биоресурсный потенциал приморской территории" Института перспективных исследований

E-mail: lantushenko@mail.ru

Lantushenko Anastasia O., PhD., Leading Researcher, Research Laboratory "Seashore Bioresources", Institute for Advanced Studies

E-mail: lantushenko@mail.ru

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF METHODS FOR A COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM'S ACTIVITY OF *DUNALIELLA SALINA* MICROALGA CELLS

A.N. Dubovitskaya¹, Yu.A. Redko¹, V.E. Shapovalova², A.O. Lantushenko², M.G. Holyavka^{1,2}, V.G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University

²Sevastopol State University

Abstract. The article is an in-depth study devoted to the development and optimization of methods for a comprehensive assessment of the efficiency of the antioxidant system of *Dunaliella salina* microalga cells. During the work, a comprehensive analysis of various methods for measuring the activity of antioxidant enzymes, as well as the level of lipid peroxidation products, was carried out. The results obtained using these methods can be used for a comprehensive and detailed assessment of the antioxidant system's state for *D. salina*, which is important for understanding its physiology.

The study included a detailed study of a set of key enzymes involved in antioxidant protection, such as superoxide dismutase (SOD), catalase, and ascorbate peroxidase. The levels of oxidative stress products, including malondialdehyde (MDA) and diene conjugates, which serve as markers of cellular damage, were also determined.

In addition, the absorption spectra of *D. salina* pigments were analyzed in various solvents. It was found that the amount of chlorophyll and carotenoids can serve as a reliable indicator of the cellular antioxidant system's state, which opens up new horizons for further research.

It was found that for a complete analysis of the *D. salina* antioxidant system's efficiency, it is necessary to use both liquid (supernatant) and solid (sediment) phases, since most solvents do not provide complete extraction of proteins. However, the analysis of enzymatic activity imposes certain restrictions on the range of possible extraction media, since it is necessary to observe the conditions of the enzyme microenvironment. It has been shown that the optimal extraction medium is 0.05 M sodium phosphate buffer with a pH of 7.5.

The methods used allow for a comprehensive analysis of the state of the antioxidant system of *Dunaliella salina*, which in turn expands the possibilities for studying its adaptation to adverse environmental conditions and increases the potential of this microalgae for use in biotechnology.

Keywords: *Dunaliella salina*, antioxidant system, lipid peroxidation products

REFERENCES

1. Chew K. W. Microalgae biorefinery: High value products perspectives / K. W. Chew, J. Y. Yap, P. L. Show, N. H. Suan, J. Ch. Juan, T. Ch. Ling, D.-J. Lee, J.-Sh. Chang // *Bioresource Technology*. – 2017. – Vol. 229. – Microalgae biorefinery. – P. 53-62.
2. Xu Y. Carotenoid Production by *Dunaliella salina* under Red Light / Y. Xu, P. J. Harvey // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – No 5. – P. 123.
3. Takaichi S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions / S. Takaichi // *Marine drugs*. – 2011. – Vol. 9. – No. 6. – C. 1101-1118.
4. Zhang J. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health / J. Zhang, Z. Sun, P. Sun, T. Chen, F. Chen // *Food & Function*. – 2014. – Vol. 5. – Microalgal carotenoids. – No 3. – P. 413.
5. Ben-Amotz A. Mode of Action of the Massively Accumulated β -Carotene of *Dunaliella bardawil* in Protecting the Alga against Damage by Excess Irradiation / A. Ben-Amotz, A. Shaish, M. Avron // *Plant Physiology*. – 1989. – Vol. 91. – No 3. – P. 1040-1043.
6. Jin E. S. Microalgal biotechnology: Carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina* / E. S. Jin, A. Melis // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2003. – Vol. 8. – Microalgal biotechnology. – No 6. – P. 331-337.
7. Liang M.H. High-value bioproducts from microalgae: Strategies and progress / M.H. Liang, L. Wang, Q. Wang, J. Zhu, J. G. Jiang // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2019. – Vol. 59. – High-value bioproducts from microalgae. – No 15. – P. 2423-2441.
8. Nethravathy M. U. Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products: Commercial Potential, Market Space, and Sustainability / M. U. Nethravathy, J. G. Mehar, S. N. Mudliar, A. Y. Shekh // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2019. – Vol. 18. – Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products. – No 6. – P. 1882-1897.
9. Cowan A. K. *Dunaliella salina*: A model System for Studying the Response of Plant Cells to Stress / A. K. Cowan, P. D. Rose, L. G. Horne // *Journal of Experimental Botany*. – 1992. – Vol. 43. – *Dunaliella salina*. – No 12. – P. 1535-1547.
10. Lamers P. P. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications / P. P. Lamers, M. Janssen, R. C. H. De Vos, R. J. Bino, R. H. Wijffels // *Trends in Biotechnology*. – 2008. – Vol. 26. – No 11. – P. 631-638.
11. Shi K. Reactive Oxygen Species-Mediated Cellular Stress Response and Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms: The State of the Art and Future Perspectives / K. Shi, Z. Gao, T.-Q. Shi, P. Song, L. J. Ren, H. Huang, X. J. Ji // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – Reactive Oxygen Species-Mediated Cellular Stress Response and Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. – P. 793.
12. Zhang L. Response of lipid biosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa* to intracellular reactive oxygen species level under stress conditions / L. Zhang, C. Liao, Y. Yang, Y.-Zh. Wang, K. Ding, D. Huo, Ch. Hou // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 287. – P. 121414.
13. Cowan A. K. Abscisic Acid Metabolism in Salt-Stressed Cells of *Dunaliella salina*: Possible Interrelationship with β -Carotene Accumulation / A. K. Cowan, P. D. Rose // *Plant Physiology*. – 1991. – Vol. 97. – Abscisic Acid Metabolism in Salt-Stressed Cells of *Dunaliella salina*. – No 2. – P. 798-803.
14. Liu W. Inhibitory effects of hypo-osmotic stress on extracellular carbonic anhydrase and photosynthetic efficiency of green alga *Dunaliella salina* possibly through reactive oxygen species formation / W. Liu, Y. Ming, P. Li, Z. Huang // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2012. – Vol. 54. – P. 43-48.
15. Sofo A. Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses / A. Sofo, A. Scopa, M. Nuzzaci, A. Vitti // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – No 6. – P. 13561-13578.
16. Parida A. K. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review / A. K. Parida, A. B. Das // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2005. – Vol. 60. – Salt tolerance and salinity effects on plants. – No 3. – P. 324-349.
17. Tammam A. A. Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* / A. A. Tammam, E. M. Fakhry, M. El-

- Sheekh // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10. – No 19. – P. 3795-3808.
18. Cavalcanti F. R. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea / F. R. Cavalcanti, J. P. M. Santos Lima, S. L. Ferreira-Silva, R. A. Viégas, J. A. G. Silveira // Journal of Plant Physiology. – 2007. – Vol. 164. – No 5. – P. 591-600.
19. Hediye Sekmen A. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media* / A. Hediye Sekmen, İ. Türkan, S. Takio // Physiologia Plantarum. – 2007. – Vol. 131. – No 3. – P. 399-411.
20. Alscher R. G. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants / R. G. Alscher, N. Erturk, L. S. Heath // Journal of Experimental Botany. – 2002. – Vol. 53. – No 372. – P. 1331-1341.
21. Tyagi S. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Stress Tolerance in Plants / S. Tyagi, Shumayla, S. P. Singh, S. K. Upadhyay // Molecular approaches in plant biology and environmental challenges. – 2019. – P. 51-77.
22. Chukina N. V. Metody ocenki antioksidantnogo statusa rastenij: uchebno-metodicheskoe posobie dlja studentov, obuchajushhihsja po programme bakalavriata po napravleniju podgotovki 020400 «Biologija». Metody ocenki antioksidantnogo statusa rastenij / N. V. Chukina G. G. Borisova, M. G. Maleva, N. F. Nekrasova – Ekaterinburg: Izdatel'stvo Ural'skogo universiteta, 2012. – 67 p.
23. Anjum N. A. Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants / N. A. Anjum, P. Sharma, S. S. Gill, M. Hasanuzzaman, E. A. Khan, K. Kachhap, A. A. Mohamed, P. Thangavel, G. D. Devi, P. Vasudhevan, A. Sofo, N. A. Khan, A. N. Misra, A. S. Lukatkin, H. P. Singh, E. Pereira, N. Tuteja // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – Vol. 23. – No 19. – P. 19002-19029.
24. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193. – No 1. – P. 265-275.
25. Nakano Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts / Y. Nakano, K. Asada // Plant and cell physiology. – 1981. – Vol. 22. – No. 5. – P. 867-880.
26. Artyukhov V. G. Biologicheskie membrany: strukturnaja organizacija, funkcii, modifikacija fiziko-himicheskimi agentami: Ucheb. posobie / V. G. Artjuhov, M. A. Nakvasina // Voronezh: Izdatel'stvo Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta, 2000. – 296 p.
27. Kublickaja A. D. Soderzhanie dienovyh kon'jugatov v tkanjah rannecvetushhih rastenij v zavisimosti ot vida, tipa organa i mestoproizrastanija / A. D. Kublickaja, A. V. Jurchenko // Vitebskij gosudarstvennyj universitet im. P.M. Masherova, 2016. – P. 61-63.
28. DERE Ş. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents / Ş. DERE, T. GÜNEŞ, R. SIVACI // Turkish Journal of Botany. – 1998. – Vol. 22. – No 1. – P. 13-18.
29. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV - VIS Spectroscopy / H. K. Lichtenthaler, C. Buschmann // Current Protocols in Food Analytical Chemistry. – 2001. – Vol. 1. – Chlorophylls and Carotenoids. – No 1. – P. F4. 3.1-F4. 3.8.