

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СПИРТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ  
*DUNALIELLA SALINA***

**АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ**

Студентки 2 курса 243 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

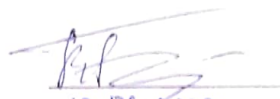
«Современные технологии визуализации и анализа живых систем»

Биологического факультета

Мальковой Анастасии Алексеевны

Научный руководитель:


профессор, доктор биол. наук

  
19.06.2023  
(число, подпись)

В. А. Богатырёв

Зав. кафедрой:

доцент, доктор биол. наук

  
19.06.2023  
(число, подпись)

О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2023

## Введение

**Актуальность темы.** В последние два десятилетия медицина и химическая промышленность уделяют большое внимание продуктам, полученным из лекарственных растений, которые содержат много биологически активных веществ, способных проявлять антиоксидантную активность. Отбор, методы изоляции и изучение перспективных природных источников веществ с антирадикальной и антиоксидантной активностью, а также разработка простых и быстрых методов определения антиоксидантной активности в настоящее время являются одной из важных задач современной медицины, фармации, косметологии и пищевой промышленности [1, 2, 3].

Организм имеет естественную антиоксидантную систему защиты от свободных радикалов, но она может снижаться с возрастом или при заболеваниях. Терапия с включением антиоксидантов из лекарственных растений может помочь улучшить состояние здоровья и предотвратить развитие многих болезней [1].

Лекарственные растения являются богатым источником биологически активных веществ, которые могут проявлять антиоксидантную активность. Однако в последнее время внимание учёных привлекли микроводоросли, такие как *Spirulina*, *Chlorella* и *Dunaliella*, из-за того, что они являются ценными источниками биологически активных веществ, таких как каротиноиды, белки, жиры, антиоксиданты. В наибольшей степени такое внимание к некоторым видам водорослей объясняется их способностью синтезировать большое количество  $\beta$ -каротина. В организме человека бета-каротин действует как фотопротектор и антиоксидант, на клеточном и молекулярном уровнях предотвращает трансформации, индуцированные окислителями, токсическими веществами, рентгеновским излучением и др. [4, 5].

Проанализировав большое количество исследований, мы пришли к выводу, что наиболее эффективно получать каротиноиды из микроводоросли *Dunaliella salina*. Эта микроводоросль способна накапливать до 14%

каротиноидов от сухого веса при стрессовых условиях, таких как высокая солёность, высокая интенсивность света или недостаток питательных веществ [6, 7].

Традиционные методы определения концентрации каротиноидов в клеточной культуре достаточно трудоемки, не позволяют обрабатывать большое количество образцов и предполагают гибель экспериментального материала. Методы прижизненной оценки содержания растительных пигментов малочисленны и на территории Российской Федерации не применяются.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы стало оценить антиоксидантную активность спиртовых экстрактов микроводоросли *Dunaliella salina* и реализовать метод прижизненной оценки содержания растительных пигментов и каротиногенеза.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Культивировать микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. IP-PASD-294 в нормальных условиях и в условиях повышенного каротиногенеза и провести спиртовую экстракцию растительных пигментов.

2. Определить антиоксидантную активность полученных экстрактов.

3. Реализовать и апробировать метод прижизненной оценки содержания растительных пигментов и каротиногенеза *Dunaliella salina* с использованием современных технологий.

4. Установить корреляционную зависимость полученных результатов со значениями спектрометрического метода определения концентрации каротиноидов.

**Методы исследования.** Культура микроводорослей *D. salina* Teod. IP-PASD-294 была получена из коллекции Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева, Москва (ИФР РАН).

Для наращивания биомассы использовали культуральную среду Ven-Amotz



Для наращивания биомассы микроводоросли *D. salina* Teod. IP-PASD-294 использовали культуральную среду, в которой создавали условия для нормального роста и условия для каротиногенеза.

Для определения содержания растительных пигментов аликвоты по 200 мкл суспензий водорослей переносили в 96-луночный планшет либо центрифужные пробирки и добавляли по 1.8 мл 96 % этанола. Пробы центрифугировали  $3000 \times g$  15 мин. По 300 мкл супернатанта переносили в лунки стандартного планшета и регистрировали поглощение на спектрофотометрическом ридере BioTek на длинах волн 470, 649 и 665 нм [8].

Для проведения экспериментов по определению про-/антиоксидантных свойств препаратов экстрактов *D. salina* применяли метод колориметрии свободных радикалов, основанный на реакции с DPPH, и метод гемолизирующих эритроцитов.

Для оперативного колориметрического определения содержания каротиноидов применялся метод цветометрии с использованием современных компьютерных технологий [8]

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета прикладных компьютерных программ Microsoft Excel 2016. Полученные данные представлены в виде средней арифметической и её стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). О достоверности межгрупповых различий судили по параметрическому критерию Стьюдента (t-тест) для количественных показателей с нормальным распределением. Проверка статистических гипотез осуществлялась при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 50 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 4 таблицами и 12 рисунками. Список использованных источников включает 55 наименований.

## Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлен анализ данных о микроводоросли *Dunaliella salina*, механизмах синтеза и накопления каротиноидов, определении каротиноидного состава и антиоксидантной активности, и роли антиоксидантов в биологических системах.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о содержании каротиноидов в экстрактах *D. salina*, показателе антиоксидантной активности этих экстрактов.

В ходе проведенных исследований спектрофотометрический анализ показал, что 1 мл 96 % этанольного раствора экстракта содержали: хлорофилл А в концентрации 70 мкг/мл, хлорофилл В – 116 мкг/мл, каротиноиды – 32 мкг/мл.

При максимальной концентрации каротиноидов 33,5 мкг/мл наблюдалось восстановление DPPH в 111,7% от контроля.

Низкие концентрации экстрактов микроводоросли *D. salina* окисляли DPPH и повышали его оптическую плотность, проявляя тем самым прооксидантную активность.

Полученные нами этаноловые экстракты *D. salina*, в соответствии с литературными данными, имеют схожие показатели антиоксидантной активности.

При максимальной концентрации каротиноидов 32 мкг/мл наблюдался гемолиз лишь 25,8% эритроцитов, а при минимальной концентрации каротиноидов этот показатель колебался в районе 80%.

Показано, что спиртовой экстракт микроводорослей оказывает достоверное концентрационно зависимое мембраностабилизирующее действие на эритроциты в тесте осмотического гемолиза.

Результаты колориметрических и спектроскопических измерений на предмет содержания каротиноидов в культуре микроводоросли *D. salina* показали сходные результаты. Установлена корреляционная зависимость.

Коэффициент корреляции для массивов  $\tilde{A}680$  и  $\ln R$  (красного канала) составляет 0.92, а для  $\tilde{A}680$  и  $\ln B$  – 0.80

Описанный способ определения концентрации каротиноидов может быть использован для мониторинга динамики изменения концентрации каротиноидов в ходе культивирования микроводорослей, а также когда нет возможности использовать более точные методы, такие как спектрофотометрия или хроматография.

Таким образом, при изучении антиоксидантных свойств экстрактов микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. IP-PASD-294 было установлено, что даже небольшие концентрации (2 мкг/мл) каротиноидов, выделенных из данной микроводоросли, способны проявлять значительную антиоксидантную активность. Наряду с антиоксидантными свойствами экстракты *D. salina* обладают сильным мембранстабилизирующим действием, которое возрастает с увеличением концентрации каротиноидов в растворе.

В связи с этим возрастает необходимость быстрых и достоверных способов определения концентрации каротиноидов без разрушения клеток. Одним из простых и быстрых методов неструктурной оценки концентрации каротиноидов является колориметрический метод, основанный на измерении цветовых параметров культур с помощью современных компьютерных технологий. Этот метод позволяет получать количественную информацию о содержании каротиноидов в культурах без их разрушения и экстракции.

### **Выводы**

1. Концентрация каротиноидов, экстрагируемая этиловым спиртом из культуры микроводоросли *Dunaliella salina*, в среднем составляет 32 мкг/мл, что является хорошим показателем для этого метода.

2. При максимальной концентрации каротиноидов 33,5 мкг/мл наблюдалось восстановление DPPH в 111,7% от контроля. Экстракты *D. salina* обладают высокой антиоксидантной активностью, которая зависит от содержания каротиноидов в них.



3. Спиртовые экстракты каротиноидов *D. salina* обладают высоким мембранстабилизирующим показателем. При максимальной концентрации 32 мкг/мл предотвращают степень гемолиза эритроцитов до 74%

4. Коэффициент корреляции спектрофотометрического определения содержания каротиноидов и цветометрического определения содержания каротиноидов для красного канала составляет 0.92, а для синего канала – 0.80.

#### Список использованных источников

- 1 Тринеева, О. В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор) / О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №. 4. – С. 180 – 197.
- 2 Валиева, Н. Г. Лекарственные растения источники биологически активных веществ / Н. Г. Валиева // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. НЭ Баумана. – 2010. – Т. 203. – С. 44 – 48.
- 3 Наумова, Н. Л. Современный взгляд на проблему исследования антиоксидантной активности пищевых продуктов / Н. Л. Наумова // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: пищевые и биотехнологии. – 2014. – Т. 2. – №. 1. – С. 5 – 8.
- 4 Малявина, В. В. Перспективы расширения спектра медицинского применения бета-каротина / В. В. Малявина, Е. А. Швидко, А. М. Сампиев // Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – №. 3-4. – С. 122 – 125.
- 5 Theory IChO 2020 - Конья, морковь, бета-каротин, витамин А, иммунная система, зрение [Электронный ресурс]: <https://www.chem.msu.ru/rus/olimpiad/olimp52/exam-theory-icho-2020-Q5-russian.pdf> (дата обращения: 19.06.2023). – Загл. с экрана. – Яз. рус.
- 6 Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina* / D. M. M. Kleinegris [et al] // Enzyme and Microbial Technology. – 2011. – Т. 48, №. 3. – P. 253 – 259.

7 Biorefinery of *Dunaliella salina*: Sustainable recovery of carotenoids, polar lipids and glycerol / J. Monte [et al] // Bioresource technology. – 2020. – Т. 297. – Р. 122509.

8 Цветометрическая система мониторинга роста микроводоросли *dunaliella salina* в лабораторных условиях / А. А. Галицкая [и др] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2023. – Т. 23, №. 1. – С. 104 – 109.

А. Маур 19.06.2023