

**Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького**

Факультет харчових технологій та біотехнології

Кафедра біотехнології та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

**на тему: «Оцінка впливу умов культивування на ріст,
морфологічний стан та накопичення фікоціаніну у
культури *Arthrospira platensis*»**

Виконала: студентка 4 курсу,
групи 1, спеціальності
G21 Біотехнології та біоінженерія
Груба В. В.

Керівник: Малишева Х. В.

Рецензент: Руденко О. П.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту, протокол № ___ від _____ 2026 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології
В. І.

Буцяк

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	3
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Біологічна характеристика та фізіологія ціанобактерій роду <i>Arthrospira</i>	7
1.2. Біотехнологічне значення <i>Arthrospira</i>	11
1.3. Фікоціанін: структура, функції та практичне застосування.....	13
1.4. Основні фактори, що впливають на ріст <i>Arthrospira</i> та біосинтез фікоціаніну.....	14
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	19
2.1. Об'єкт дослідження та умови культивування.....	19
2.2. Поживне середовище та його приготування.....	19
2.3. Параметри культивування.....	21
2.4. Методи контролю росту культури, морфологічного стану, накопичення біомаси, виділення, очищення та аналізу фікоціаніну.....	21
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ АНАЛІЗ.....	27
3.1. Вплив умов культивування на ріст <i>A. platensis</i> штам 700.....	27
3.2. Накопичення сухої біомаси <i>A. platensis</i> штам 700 за різних умов культивування.....	29
3.3. Динаміка рН культурального середовища.....	30
3.4. Мікроскопічна оцінка морфологічного стану культури <i>A. platensis</i> штам 700.....	31
3.5. Морфометричний аналіз трихомів <i>A. platensis</i> штам 700.....	33
3.6. Вплив факторів середовища на накопичення фікоціаніну.....	34
3.7. Відносний вихід фікоціаніну на одиницю сухої біомаси.....	35
3.8. Визначення оптимальних параметрів культивування <i>A. platensis</i> штам 700.....	37
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	41

АНОТАЦІЯ

Актуальність теми. Удосконалення технологій культивування ціанобактерій роду *Arthrospira* є актуальним напрямом сучасної біотехнології, зумовленим зростанням попиту на природні біоактивні сполуки. *Arthrospira platensis*, відома під комерційною назвою *Spirulina*, є перспективним продуцентом високобілкової біомаси та фікоціаніну С — цінного фікобіліпротеїну з антиоксидантними властивостями, який використовується як природний барвник, функціональний інгредієнт і нутрицевтик. Ефективність культивування *A. platensis* значною мірою залежить від фізико-хімічних параметрів середовища, зокрема температурного режиму та фотоперіоду, що впливають на ріст культури, фотосинтетичну активність і біосинтез пігментів. Визначення оптимального поєднання цих чинників для підвищення виходу біомаси та накопичення фікоціаніну потребує експериментального обґрунтування, що визначає наукову й практичну актуальність обраної теми.

Метою роботи є дослідження впливу температури культивування та фотоперіоду на ріст біомаси й накопичення фікоціаніну С у культурі *A. platensis* штам 700.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- проаналізувати наукові джерела щодо біологічних особливостей *A. platensis* та факторів, які впливають на її ріст і синтез пігментів;
- здійснити культивування *A. platensis* штам 700 за різних температурних режимів — 30 °С і 35 °С — та фотоперіодів 24:0 і 12:12;
- оцінити динаміку росту біомаси *A. platensis* штам 700 методом спектрофотометричного визначення оптичної густини;
- провести мікроскопічну оцінку морфологічного стану культури за різних умов культивування;
- здійснити екстракцію та очищення фікоціаніну С;

– визначити вплив температурного режиму та фотоперіоду на концентрацію і відносну чистоту фікоціаніну;

– сформулювати практичні рекомендації щодо культивування *A. platensis* штам 700 у лабораторних умовах.

Об'єкт дослідження: культура *A. platensis* штам 700 як продуцент біомаси та фікоціаніну С.

Предмет дослідження: вплив температурного режиму та фотоперіоду на накопичення біомаси й синтез фікоціаніну С у культурі *A. platensis* штам 700.

Методи дослідження. У роботі застосовано теоретичні, мікробіологічні, морфологічні, спектрофотометричні та аналітичні методи. Проведено аналіз наукових джерел, культивування *A. platensis* штам 700 у середовищі Заррука за різних температурних режимів і фотоперіодів, оцінку росту культури за OD₆₈₀ та мікроскопічний аналіз морфологічного стану трихомів. Фікоціанін С екстрагували методом заморожування–розморожування з подальшим очищенням діалізом. Концентрацію та відносну чистоту пігменту визначали спектрофотометрично за OD₆₁₅ і співвідношенням OD₆₁₅/OD₂₈₀. Статистичну обробку здійснювали шляхом розрахунку середніх значень і стандартного відхилення.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дослідження можуть бути використані для оптимізації лабораторного культивування *A. platensis* штам 700 з метою підвищення виходу біомаси та накопичення фікоціаніну С. Отримані дані мають практичне значення для навчального процесу з біотехнології, мікробіології та біоінженерії, а також можуть слугувати основою для подальших досліджень ціанобактерій як продуцентів біологічно активних сполук.

Ключові слова: *Spirulina*, *Arthrospira platensis*, ціанобактерії, культивування, біомаса, фікоціанін С, температура, фотоперіод, мікроскопія, трихоми, спектрофотометрія, діаліз, біотехнологія.

ВСТУП

На сучасному етапі розвитку біотехнології особливого значення набуває пошук, удосконалення та впровадження технологій отримання природних біологічно активних сполук, що мають високу харчову, споживчу та лікувально-профілактичну цінність. Одним із перспективних напрямів у цій галузі є оптимізація умов культивування фотоавтотрофних мікроорганізмів як відновлюваних джерел цінної біомаси та біоактивних метаболітів. Серед таких об'єктів особливу увагу привертає ціанобактерія *Arthrospira*, відома під комерційною назвою *Spirulina*, — нитчастий фотосинтезуючий мікроорганізм, який характеризується високою швидкістю росту, значним вмістом повноцінного білка та здатністю до біосинтезу унікальних пігмент-білкових комплексів [3, 4, 18, 22].

Spirulina вже тривалий час використовується у промисловості для виробництва дієтичних добавок, функціональних харчових продуктів і спеціалізованих кормових компонентів. Особливий науковий і практичний інтерес становить накопичення у її біомасі фікоціаніну С — водорозчинного синього фікобіліпротеїну, який є складовою фікобілісом і бере участь у поглинанні та передачі світлової енергії до фотосинтетичних реакційних центрів. Завдяки вираженим антиоксидантним, протизапальним та імуномодулюючими властивостям фікоціанін С розглядається як перспективна природна сполука для використання у харчовій, фармацевтичній і біотехнологічній галузях, зокрема як безпечний природний барвник і цінний нутрицевтичний інгредієнт [3, 4, 5, 8, 18].

Попри значний обсяг наукових досліджень, актуальним залишається питання підбору таких параметрів культивування, які б забезпечували поєднання інтенсивного росту культури з ефективним накопиченням цільового пігменту. Складність цього завдання зумовлена тим, що фізико-хімічні чинники середовища можуть по-різному впливати на приріст біомаси, фотосинтетичну активність, стабільність культури та біосинтез фікоціаніну. Зокрема, недостатньо з'ясованими

залишаються особливості сумісної дії температурного режиму та фотоперіоду на динаміку росту *Arthrospira*, зміну рН культурального середовища, морфологічну цілісність трихомів, концентрацію фікоціаніну та відносну чистоту отриманого пігментного препарату.

У цьому контексті окремий інтерес становить культура *A. platensis* штам 700, яка може розглядатися як перспективний модельний і продуктивний об'єкт для дослідження закономірностей росту, фотосинтетичної активності та накопичення біологічно активних сполук в умовах лабораторного культивування.

Таким чином, кваліфікаційна робота присвячена комплексному вивченню впливу температурного режиму та фотоперіоду на ростові, фізико-хімічні й морфофункціональні характеристики *A. platensis* штам 700. Отримані експериментальні результати можуть бути використані для оптимізації параметрів лабораторного культивування ціанобактерій, а також слугувати науковим підґрунтям для подальшого вдосконалення технологій одержання фікоціаніну для потреб харчової, фармацевтичної та біотехнологічної галузей.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біологічна характеристика та фізіологія ціанобактерій роду *Arthrospira*

Сучасні комерційні продукти під назвою «спіруліна» (*Spirulina*) здебільшого являють собою біомасу нитчастої ціанобактерії *A. platensis*, назва якої історично походить від латинського слова, що означає «спіраль» або «хелікс» [16]. *Spirulina* (*Arthrospira*) є багатоклітинною нитчастою спіралеподібною ціанобактерією з прокаріотною організацією клітин. Її клітини формують трихоми, які зазвичай мають гвинтоподібну форму, рідше — лінійну [7, 18] (рис. 1.1).

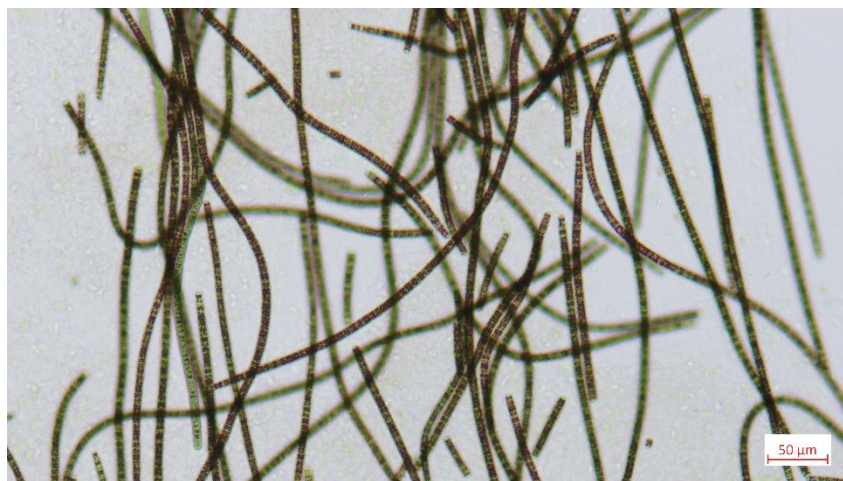


Рис. 1.1 Мікроскопічне зображення прямої (лінійної) морфологічної форми *A. platensis*, штам 700, при збільшенні $\times 10$. Масштабна лінійка — 50 мкм.

Протягом тривалого часу більшість авторів дотримувалася класифікації Гейтлера, проте сучасні дослідження чітко розмежували роди *Spirulina* та *Arthrospira*. Основна відмінність полягає в тому, що у представників роду *Spirulina* спіраль трихоми зазвичай майже закрыта (пружиноподібна), поперечні стінки дуже

тонкі й зазвичай невидимі під світловим мікроскопом, а ширина клітин становить лише 2–4 мкм. Натомість у роду *Arthrospira* спіраль трихоми відкрита (у вигляді розтягнутої пружини), поперечні стінки (септи) чітко візуалізуються за допомогою світлової мікроскопії, ширина клітин становить 6–12 мкм і зазвичай присутні газові везикули. Оскільки торгова назва *Spirulina* є всесвітньо відомим брендом, у промисловості та загальній літературі цей термін зберігається як загальне найменування біомаси. Попри бактеріальну природу, завдяки здатності до кисневого фотосинтезу та водному способу існування *Spirulina* (*Arthrospira*) традиційно відносять до групи мікроводоростей у біотехнологічних дослідженнях [16].

З точки зору клітинної організації, *A. platensis* є прокаріотичним організмом, клітини якого позбавлені диференційованого ядра, хлоропластів та інших мембранних органел. Вони мають грамнегативну клітинну стінку та несуть одну копію кільцевої хромосоми, організованої в нуклеоїд прокаріотичного типу [4]. Внутрішній простір клітин щільно упакований фотосинтетичними тилакоїдними мембранами, що містять хлорофіл *a* і світлозбиральні комплекси — фікобілісоми, багаті на фікоціанін С, які забезпечують ефективне поглинання світлової енергії під час фотосинтезу [8, 7].

Аналіз морфологічної структури свідчить, що *A. platensis* формує багатоклітинні нитчасті трихоми, клітини яких зазвичай коротші за свою ширину, а апікальні клітини мають округлу форму. У природних екосистемах та штучних культурах філаменти можуть існувати у двох морфотипах: спіральному або лінійному [16]. Лінеаризація трихомів найчастіше відбувається в штучних лабораторних та промислових умовах. Тривалий час лінійна морфологія вважалася постійною незворотною дегенерацією, проте сучасні дані підтверджують, що за певних умов лінійні філаменти здатні повертатися до вихідної спіральної форми. Окрім генетичного дрейфу, довжина трихомів та параметри їхньої спіральності демонструють високу пластичність і динамічно змінюються у відповідь на такі

зовнішні чинники, як зміни спектра світла, солоності та рівня глюкози [16]. Розмноження мікроорганізму відбувається виключно вегетативним шляхом за допомогою поперечного бінарного поділу клітин та фрагментації ниток. Повний життєвий цикл *Arthrospira*, пов'язаний із процесами фрагментації трихомів [14] (рис. 1.2).

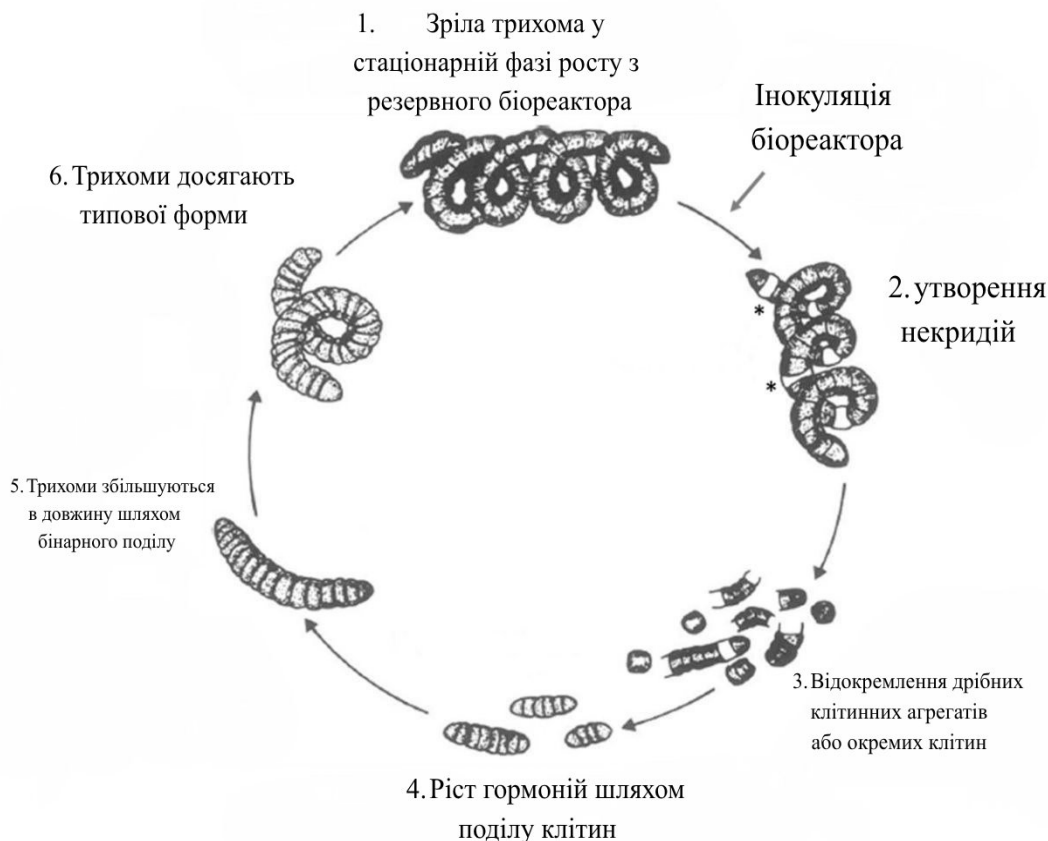


Рис. 1.2 Схема життєвого циклу ціанобактерій роду *Arthrospira* [14].

Популярність *Arthrospira* у світовій індустрії зумовлена її високою харчовою цінністю та унікальним хімічним складом біомаси [14, 16]. Клітини містять велику кількість повноцінного білка (60–70% сухої маси), незамінні амінокислоти, вітаміни (зокрема, вітамін B₁₂), поліненасичену γ -ліноленову жирну кислоту та комплекс природних пігментів: хлорофіл *a*, β -каротин, зеаксантин, міксоксантофіл та фікоціанін [16]. Такий багатий склад забезпечує виражені терапевтичні

властивості біомаси, включаючи антиоксидантну, протизапальну, імуномодулюючу та протиракову активність [3, 5, 8, 14]. Завдяки повній безпеці продукт масово використовується як білкова добавка для зміцнення імунної системи й покращення кровообігу в раціоні людини, а також як цінний функціональний корм у птахівництві та аквакультурі [14, 16].

Знання фізіології мікроорганізму є фундаментальними для розуміння й контролю закономірностей його росту. *A. platensis* здійснює кисневий фотосинтез, використовуючи воду як донор електронів, а вуглекислий газ як джерело вуглецю [14]. Основними факторами росту культури є світло, а також CO₂ або іони бікарбонату (HCO₃⁻) [9, 11, 13, 14]. За оптимальних умов освітлення фотосинтетична ефективність може досягати приблизно 8 % [5]. Окрім фотоавтотрофного росту, ціанобактерія здатна до міксотрофного та частково гетеротрофного живлення за наявності органічних джерел вуглецю, що сприяє інтенсифікації накопичення біомаси й пігментів [23, 28].

Найсприятливішими фізіологічними умовами для росту є температура в межах 25–35 °С, лужне середовище з рН приблизно 9–11 та високий вміст бікарбонатів і карбонатів у поживному середовищі [9, 16, 22]. Висока стійкість до солоності та лужності суттєво зменшує ризик контамінації зразків сторонніми мікроорганізмами та полегшує промислове культивування у відкритих системах [9, 27, 29]. Продуктивність міководорості у фотобіореакторах за оптимальних умов становить у середньому 0,2–0,6 г л⁻¹ доб⁻¹ і може перевищувати 1 г л⁻¹ доб⁻¹ за інтенсивних режимів освітлення та живлення [5, 19, 26, 27]. Водночас вміст пігментів і морфологія клітин динамічно змінюються залежно від умов культивування, що свідчить про високу адаптивність цієї ціанобактерії [18]. Поєднання стійкості до високої лужності та солоності, толерантності до коливань освітлення й метаболічної гнучкості (фотоавтотрофний, міксотрофний та обмежений гетеротрофний ріст) зумовлює високу адаптивність *Arthrospira* до

різноманітних екологічних умов і робить її перспективним об'єктом для інженерних систем культивування [1, 11, 28, 29].

1.2. Біотехнологічне значення *Arthrospira*

Біомаса *Arthrospira* характеризується високим вмістом білка, який зазвичай становить 55–70 % сухої маси, а також містить незамінні амінокислоти, поліненасичені жирні кислоти, вітаміни, мінеральні елементи та пігменти, зокрема β -каротин, хлорофіл і фікоціанін [3, 8, 18]. Такий багатий біохімічний склад зумовлює її широке використання як харчової та нутрицевтичної добавки для людини й тварин. Додавання біомаси до раціону сприяє підвищенню поживної цінності кормів, покращенню приросту маси тіла та загального фізіологічного стану сільськогосподарських тварин і об'єктів аквакультури [3, 26].

У харчовій промисловості порошок і екстракти мікроорганізму використовують для збагачення молочних продуктів, кондитерських виробів, випічки, макаронних виробів і снєків. Вони надають продуктам природного забарвлення (синього завдяки фікоціаніну та зеленого — завдяки хлорофілу) і водночас підвищують їхню харчову цінність за низького вмісту жирів і холестерину [3, 7, 18].

У медицині та сфері нутрицевтиків *Arthrospira*, а особливо її пігменти й полісахариди, проявляють антиоксидантні, протизапальні, імуномодулюючі, антимікробні, антидіабетичні, кардіопротекторні, нейропротекторні та протипухлинні властивості [7, 8, 18, 20, 26]. Особливої уваги серед біоактивних сполук заслуговує сульфатований екзополісахарид кальцій-спірулан (Ca-spirulan), який є флагманським високоцінним продуктом із доведеною антикоагулянтною, протипухлинною та противірусною активністю. Він здатний пригнічувати реплікацію або проникнення в клітину багатьох оболонкових вірусів (зокрема вірусу простого герпесу HSV-1, цитомегаловірусу, вірусу кору, грипу А та ВІЛ-1).

Препарати на його основі демонструють високу ефективність у клінічній практиці, наприклад, місцеве застосування мазей із Ca-spirulan забезпечує успішне лікування контагіозного молюска без локальних побічних ефектів [31, 15, 10].

У біотехнологічних процесах *Arthrospira* застосовується для біофіксації вуглекислого газу, очищення стічних вод, біосорбції важких металів, а також як сировина для отримання біопалива та біополімерів [1, 11, 22]. На сьогодні *A. platensis* стала модельним організмом для реалізації концепції мікрководоростевого біорефайнерінгу. Цей інноваційний підхід передбачає каскадну екстракцію пігментів, білків, екзополісахаридів та енергоносіїв з одного потоку біомаси за допомогою сучасних екологічних методів (наприклад, надкритичної CO₂, глибоких евтектичних розчинників та іонних рідин). Це дозволяє поетапно фракціонувати цінні метаболіти і переробляти залишкову біомасу на біоетанол, молочну кислоту або рослинні біостимулятори, що сприяє впровадження технологій безвідходного виробництва [12, 25, 30].

Крім того, полісахариди та водні екстракти *A. platensis* успішно виконують роль відновників і стабілізаторів у процесах «зеленого» синтезу наночастинок. Це дозволяє створювати екологічно чисті наноматеріали (наприклад, наночастинки срібла розміром 12–15 нм або наноккомпозити Ag–ZnO) з потужними антибактеріальними та цитотоксичними властивостями проти ракових клітин, що позиціонує цю ціанобактерію як універсальний біологічний шаблон для потреб наномедицини [2, 6]. Для отримання біомаси фармацевтичної якості перевагу надають контрольованому культивуванню у фотобіореакторах, що забезпечує високу чистоту продукту та стабільність технологічного процесу, незважаючи на вищі капітальні та експлуатаційні витрати [11, 22].

1.3. Фікоціанін: структура, функції та практичне застосування

Фікоціанін С є водорозчинним синім фікобілопротеїном і входить до складу фікобілісом — світлозбирального комплексу, локалізованого на тилакоїдних мембранах ціанобактерій [4, 5]. Молекула білка складається з α - та β -поліпептидних ланцюгів, що містять ковалентно зв'язаний фікоціанобілін — лінійний тетрапірольний хромофор, який зумовлює інтенсивне синє забарвлення та флуоресцентні властивості фікоціаніну [7, 9].

У ціанобактерій фікоціанін С поглинає світло переважно в зелено-помаранчевій ділянці спектра (приблизно 550–630 нм) і передає енергію до хлорофілу *a* у фотосистемах, підвищуючи ефективність фотосинтезу за умов змінного спектрального складу освітлення [8]. Зміни співвідношення фікоціаніну та хлорофілу за різних режимів світла і температури допомагають *A. platensis* адаптувати фотосинтетичний апарат та підтримувати стабільний ріст [13].

Фікоціанін і його хромофор характеризуються вираженою антиоксидантною активністю: вони здатні нейтралізувати активні форми кисню та захищати ліпіди, білки й ДНК від окисного ушкодження [7-9]. У клітинних і тваринних моделях фікоціанін демонструє протизапальні, імуномодулюючі, гепато- та нефропротекторні, кардіопротекторні, антидіабетичні, нейропротекторні та протипухлинні ефекти, які часто пов'язують із регуляцією окисного стресу та запальних сигнальних шляхів [7, 8, 9, 22, 28]. Наведені результати обґрунтовують перспективність фікоціаніну як нутрицевтичного інгредієнта, однак для визначення ефективних і безпечних доз для людини необхідні додаткові клінічні дослідження [7, 22, 28].

Завдяки нетоксичності, водорозчинності та інтенсивному забарвленню фікоціанін С широко застосовують як природний синій барвник у харчових продуктах, напоях, кондитерських і молочних виробках; фракції високої чистоти використовують також у косметичних засобах і фармацевтичних композиціях [7-

9]. Флуоресцентні властивості зумовлюють використання фікоціаніну як біохімічного зонда в імуноаналізах і проточній цитометрії.

За прогнозами, світовий ринок фікоціаніну може досягти приблизно 245 млн доларів США до 2027 року, що відображає зростаючий попит на природні пігменти [9]. Промислове отримання фікоціаніну передбачає ефективну екстракцію за температури не вище 45 °C та рН 5,5–6,0, а також подальше очищення (наприклад, осадженням сульфатом амонію, фільтрацією, хроматографією) для досягнення високої чистоти й стабільності продукту. Для підвищення стабільності кольору й біологічної активності застосовують стабілізатори, зокрема цукри та природні полімери [9].

1.4. Основні фактори, що впливають на ріст *Arthrospira* та біосинтез фікоціаніну

1.4.1. Світлова інтенсивність, спектр і фотоперіод. Світло є основним джерелом енергії для росту *Arthrospira* і визначальним чинником інтенсивності фотосинтезу та синтезу пігментів [8, 23, 26,]. В умовах фотобіореактора встановлено, що освітленість 2300 мкмоль м⁻² с⁻¹ за помірної щільності культури (OD ≈ 0,6) забезпечує максимальну продуктивність біомаси (близько 0,62 г л⁻¹ доб⁻¹) і фікоціаніну (приблизно 123 мг л⁻¹ доб⁻¹). За нижчої інтенсивності світла, зокрема 635 мкмоль м⁻² с⁻¹, спостерігалася дещо менша продуктивність, проте вища фотосинтетична ефективність — до 8 % [5].

Спектральний склад світла істотно впливає на фізіологічні процеси *Arthrospira*. Дослідження показують, що червоне світло сприяє максимальному накопиченню біомаси, тоді як зелене та синє світло зазвичай забезпечують нижчі темпи росту [8, 26]. Наприклад, за використання червоних світлодіодів було отримано до 1,77 г л⁻¹ біомаси з вмістом білка близько 57 % сухої маси [26].

Водночас накопичення фікоціаніну часто підвищується за умов зеленого або синього світла чи комбінованих спектрів, хоча це може супроводжуватися зниженням загальної біомаси. У дослідях із частковим фотоперіодом зелене світло забезпечувало максимальну концентрацію фікоціаніну — до 126 мг г^{-1} біомаси [26]. Інші експерименти показали найвищий вміст фікоціаніну за червоного світла інтенсивністю 3000 люкс при високій щільності інокуляту, тоді як синє світло стимулювало синтез хлорофілу [8].

Для *Spirulina subsalsa* ефективною виявилася двостадійна стратегія культивування: на першому етапі біомасу вирощували за температури $35 \text{ }^\circ\text{C}$, після чого переводили культуру під зелене освітлення для стимуляції синтезу фікоціаніну. За таких умов продуктивність пігменту досягала $70 \text{ мг л}^{-1} \text{ доб}^{-1}$ у прісній воді та $11 \text{ мг л}^{-1} \text{ доб}^{-1}$ у морській [13].

Загалом інтенсивне освітлення та червоно-білий спектр сприяють максимальному накопиченню біомаси, тоді як зелено-синє світло або світлові переходи ефективніші для підвищення вмісту фікоціаніну. Тривалість освітлення (безперервна чи періодична) також суттєво впливає на продуктивність культури та енергетичну ефективність процесу [11, 26].

1.4.2. Температурний режим. Оптимальна температура культивування *Arthrospira* зазвичай становить $30\text{--}35 \text{ }^\circ\text{C}$ [9, 13, 22]. Для виду *S. subsalsa* максимальна швидкість росту спостерігалася при $35 \text{ }^\circ\text{C}$, тоді як найвищий вміст фікоціаніну досягався за цієї температури у поєднанні із зеленим світлом, що підтверджує ефективність двостадійного культивування [13]. Перевищення оптимального температурного діапазону призводить до ушкодження фотосинтетичних структур і деградації пігментів, тоді як зниження температури сповільнює ріст культури та зменшує її продуктивність [11].

1.4.3. Реакція середовища (рН). *Arthrospira* є типовою алкалофільною мікроводорістю, для культивування якої найчастіше використовують поживні середовища з рН у межах 9–11 [9, 22, 27]. Узагальнення експериментальних даних

свідчить, що оптимум для поєднання високої біомаси та фікоціаніну становить приблизно рН 10,0–10,5 за температури близько 30 °С та освітленості близько 300 мкмоль м⁻² с⁻¹ [9].

Підвищення рН може стимулювати ріст культури, проте часто супроводжується зменшенням вмісту фікоціаніну. Зокрема, у спіралеподібних і лінійних штамів *Arthrospira* збільшення рН підвищувало ріст до 65 %, але знижувало вміст пігменту до 83 % порівняно з нижчими значеннями рН [18]. У *Limnospira platensis* максимальна продуктивність біомаси (1,596 г л⁻¹ доб⁻¹) спостерігалася при рН 11, тоді як максимальний вміст фікоціаніну — при рН 10 та помірній солоності [27]. Отже, рН близько 10 є компромісним оптимумом між ростом і синтезом пігментів.

1.4.4. Склад поживного середовища. Азот є ключовим елементом для формування білків і фікоціаніну, який є азотовмісним пігментним білком. У більшості поживних середовищ основним джерелом азоту слугує нітрат натрію (NaNO₃). Дефіцит нітратів у безперервних культурах знижував продуктивність біомаси до 0,015 г л⁻¹ доб⁻¹ [11]. Натомість додавання 2,5 г л⁻¹ NaNO₃ майже вдвічі підвищувало вміст фікоціаніну — з 34,4 до 68,4 мг г⁻¹ сухої маси [19].

Оптимізація складу середовища показала, що поєднання 16 г л⁻¹ NaHCO₃ і 5 г л⁻¹ NaNO₃ забезпечує максимальний приріст біомаси, тоді як підвищення фосфатів майже вдвічі збільшує вміст фікоціаніну та його чистоту [24]. Альтернативні джерела азоту (сечовина, амонійні солі) також можуть стимулювати ріст, але потребують точного контролю рН [9, 21].

Arthrospira використовує розчинений CO₂ та бікарбонати, зокрема NaHCO₃, як основне джерело вуглецю в лужних середовищах. Додавання органічного вуглецю (глюкоза, ацетат натрію) сприяє міксотрофному росту та часто підвищує продуктивність біомаси й пігментів [21, 23].

Фосфор необхідний для енергетичного обміну та синтезу нуклеїнових кислот і істотно впливає на накопичення фікоціаніну. Підвищення концентрації фосфатів

значно покращує чистоту й кількість пігменту [24]. Калій і мікроелементи беруть участь у регуляції ферментативних процесів і фотосинтезу [9].

Arthrospira природно мешкає в солоних лужних водоймах і добре витримує широкий діапазон солоності. Найшвидший ріст культури спостерігався за солоності близько 10 ‰, тоді як максимальна фотосинтетична ефективність — за 27–45 ‰ [17]. У *L. platensis* підвищення NaCl до 10 г л⁻¹ не знижувало продуктивність біомаси, а помірна солоність оптимізувала вміст фікоціаніну [27].

1.4.5. Стратегії збирання біомаси *Arthrospira*. Режим збору культури також впливає на продуктивність. У безперервних системах часті збори з низькою часткою видалення біомаси (близько 10 %) дозволяють підтримувати стабільний ріст і високий вміст пігментів, запобігаючи самозатіненню культури [19].

Аналіз досліджень свідчить про наявність компромісу між максимальним накопиченням біомаси та високим вмістом фікоціаніну: інтенсивне світло, високий рН і солоність сприяють росту, але можуть знижувати частку пігментів у біомасі *Spirulina*, тоді як помірні умови та спеціально підібрані спектри світла стимулюють синтез фікоціаніну [13, 18, 23, 27]. У зв'язку з цим дедалі частіше застосовують двофазні системи культивування, що поєднують швидкий ріст біомаси з подальшою індукцією пігментного синтезу.

Таким чином, *Arthrospira* є нитчастою ціанобактерією, добре пристосованою до масштабного культивування завдяки високій фотосинтетичній активності, здатності переносити лужні та солоні умови середовища, а також метаболічній гнучкості. Її біомаса характеризується високою поживною цінністю, а основний синій пігмент — фікоціанін С — відіграє важливу роль у фотосинтезі та проявляє перспективні антиоксидантні й оздоровчі властивості.

Результати численних експериментальних досліджень свідчать, що інтенсивність і спектральний склад світла, температурний режим, реакція середовища, співвідношення поживних елементів, солоність і стратегія збирання

культури істотно впливають на продуктивність біомаси та вихід фікоціаніну. Для досягнення оптимального балансу між швидким ростом і високим вмістом пігменту найбільш ефективними є умови культивування за температури близько 30 °С, рН приблизно 10, помірної або високої освітленості (300–1000 мкмоль м⁻² с⁻¹), використання середовищ, багатих на бікарбонати з достатнім вмістом нітратів і фосфатів, а також помірної солоності.

Застосування двофазних або напівбезперервних режимів культивування дозволяє поєднати інтенсивне накопичення біомаси з подальшою стимуляцією синтезу фікоціаніну, що підвищує загальну ефективність процесу. Сформульовані закономірності створюють практичну основу для розроблення технологій вирощування *Arthrospira*, орієнтованих як на отримання великої кількості біомаси, так і на виробництво цінного пігменту фікоціаніну для харчових і біотехнологічних потреб.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження та умови культивування

Об'єктом дослідження була культура *A. platensis* штам 700, отримана з музею культур Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України, яку використовували для серії експериментів з вивчення впливу температурного режиму та фотоперіоду на ріст біомаси й накопичення фікоціаніну С.

Усі маніпуляції з культурою здійснювали з дотриманням вимог біобезпеки у кабінеті біологічної безпеки II класу Streamline SC2-4S1 (Esco, Сінгапур), що забезпечував стерильність виконання робіт і мінімізував ризик контамінації культури.

Культивування проводили у прозорих скляних колбах об'ємом 250 мл із робочим об'ємом поживного середовища 100 мл у фототрофному режимі протягом 6 діб. У процесі культивування здійснювали регулярний відбір проб для оцінки приросту біомаси, динаміки росту культури та її морфологічного стану.

2.2. Поживне середовище та його приготування

Для культивування *A. platensis* штам 700 використовували типове лужне мінеральне поживне середовище Заррука, яке широко застосовується для вирощування ціанобактерій даного роду та забезпечує оптимальні умови для їх фотосинтетичного росту. Середовище готували шляхом послідовного розчинення всіх компонентів у дистильованій воді з подальшою стерилізацією. Реакцію середовища встановлювали у лужному діапазоні, характерному для культивування *Spirulina*, що сприяло активному росту культури та зменшенню ризику мікробної

контамінації. До складу середовища входили бікарбонат натрію як основне джерело вуглецю, нітрат натрію як джерело азоту, фосфатні солі, а також комплекс макро- та мікроелементів, необхідних для перебігу фізіологічних і біохімічних процесів у клітинах *A. platensis* (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

**Класичний склад поживного середовища Заррука для культивування
*A. platensis***

Компонент	Концентрація, г/л	Функціональне значення
NaHCO ₃	16,8	Основне джерело вуглецю для фотосинтезу
NaNO ₃	2,5	Джерело азоту для синтезу білків і пігментів
K ₂ HPO ₄	0,5	Джерело фосфору, регуляція обміну речовин
K ₂ SO ₄	1,0	Джерело сірки та калію
NaCl	1,0	Осмотичний баланс клітин
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	Кофактор ферментів, компонент хлорофілу
CaCl ₂	0,04	Участь у клітинному метаболізмі
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	Синтез фотосинтетичних пігментів
ЕДТА	0,08	Хелатуючий агент для стабілізації іонів металів
Розчин мікроелементів*	1 мл	Забезпечення мікроелементами

* До складу мікроелементного розчину зазвичай входять сполуки бору, марганцю, цинку, міді, молібдену та кобальту у слідових кількостях.

Основні компоненти поживних середовищ стерилізували в автоклаві YXQ-LS-18SI (Shanghai Voxun Medical Biological Instrument Corp., Китай) за температури 121 °C протягом 20 хв. Термолабільні інгредієнти та окремі розчини мікроелементів, стерилізували шляхом мембранної фільтрації через фільтри з розміром пор 0,22 мкм і додавали до охолоджених середовищ асептично.

2.3. Параметри культивування

2.3.1. Температурний режим. Для дослідження впливу температури на ріст біомаси *A. platensis* штам 700 та накопичення фікоціаніну С культивування проводили за температурних режимів 30 °C та 35 °C, що відповідають фізіологічно оптимальному діапазону розвитку даної мікробіодорості та дозволяють оцінити реакцію культури на помірне підвищення температури. Інкубацію здійснювали на орбітальному шейкер-інкубаторі ES-20 (BioSan, Латвія), який забезпечував рівномірне перемішування культуральної суспензії та автоматичне підтримання заданої температури протягом усього експерименту, що створювало стабільні умови росту та забезпечувало коректність порівняння експериментальних варіантів.

2.3.2. Світловий режим (фотоперіод). Для оцінки впливу тривалості освітлення на фізіологічну активність *A. platensis* штам 700 досліджували два режими фотоперіоду: безперервне освітлення (24:0 год) та циклічне чергування світла і темряви (12:12 год, світло:темрява). Освітлення забезпечували фітосвітильником повного спектра LED-Story Florian PRO, 30 W (Chip Bridgelux), що створював стабільний світловий потік із постійною інтенсивністю та забезпечував відтворювані умови для перебігу фотосинтетичних процесів. Світлові режими встановлювали відповідно до експериментального дизайну до моменту інокуляції культури та підтримували протягом усього періоду культивування.

2.4. Методи контролю росту культури, морфологічного стану, накопичення біомаси, виділення, очищення та аналізу фікоціаніну

2.4.1. Оцінка росту культури за показниками оптичної густини. Для забезпечення однакових стартових умов перед інокуляцією культуральну суспензію *A. platensis* штам 700 стандартизували до оптичної густини

$OD_{680} = 0,10 \pm 0,01$. Приріст біомаси визначали шляхом спектрофотометричного вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 680 нм, що відповідає максимуму поглинання хлорофілу а. Отримані значення OD_{680} використовували як непрямий показник концентрації клітин і динаміки росту культури, що дозволяло порівнювати швидкість накопичення біомаси за різних температурних режимів і фотоперіодів.

Вимірювання проводили у динаміці культивування з відбором проб у визначені часові точки. Перед вимірюванням культуральну суспензію ретельно перемішували для забезпечення рівномірного розподілу трихомів у зразку. Як контроль використовували відповідне поживне середовище без культури.

2.4.2. Визначення сухої біомаси культури. Для прямої кількісної оцінки накопичення біомаси *A. platensis* штам 700 визначали суху масу культури. З кожного експериментального варіанта відбирали однаковий об'єм культуральної суспензії, після чого біомасу відокремлювали від культурального середовища шляхом центрифугування або фільтрування. Отриманий осад промивали дистильованою водою для видалення залишків мінеральних солей поживного середовища. Після промивання біомасу переносили у попередньо зважені ємності або на фільтри та висушували при температурі 60–80 °С до сталої маси. Суху біомасу виражали у г/л культурального середовища. Отримані значення використовували для порівняння продуктивності культури за різних умов культивування, а також для оцінки відповідності між спектрофотометричними показниками росту OD_{680} і фактичним накопиченням біомаси.

Концентрацію сухої біомаси у культуральній суспензії визначали за співвідношенням маси висушеного зразка до об'єму відібраної культури:

$$X = \frac{m}{V},$$

де:

X — концентрація сухої біомаси, г/л;

m — маса висушеної біомаси, г;

V — об'єм відібраної культуральної суспензії, л.

2.4.3. Мікроскопічна оцінка морфологічного стану культури.

Морфологічний стан культури *A. platensis* штам 700 оцінювали методом світлової мікроскопії з використанням мікроскопа Carl Zeiss Axiolab A1 FL (Німеччина) у світлопольному режимі при збільшеннях $\times 5$ – 10 . Для аналізу відбирали краплю культуральної суспензії, наносили її на предметне скло, накривали покривним скельцем і досліджували без попереднього фарбування.

Під час мікроскопічного аналізу оцінювали форму та цілісність трихомів, рівномірність клітинної організації, наявність спіральних або лінійних форм, ознаки активного росту, а також можливу наявність сторонніх мікроорганізмів. Особливу увагу приділяли проявам стресового стану культури, зокрема фрагментації ниток, укороченню трихомів, деформації спіральної структури, втраті рівномірності забарвлення та порушенню типової морфології.

2.4.4. Морфометричний аналіз трихомів. Для кількісної оцінки морфологічного стану *A. platensis* штам 700 проводили морфометричний аналіз мікроскопічних зображень. У кожному експериментальному варіанті аналізували не менше 50 трихомів. За можливості мікрофотографії обробляли з використанням програмного забезпечення ImageJ або аналогічного програмного інструменту для аналізу біологічних зображень.

Основними морфометричними показниками були: середня довжина трихомів, частка інтактних трихомів, частка фрагментованих трихомів, наявність деформованих форм і загальний морфологічний стан культури. Частку фрагментованих трихомів визначали як відсоткове співвідношення кількості пошкоджених або укорочених ниток до загальної кількості проаналізованих трихомів.

Частку фрагментованих трихомів визначали як відсоткове співвідношення кількості фрагментованих трихомів до загальної кількості проаналізованих трихомів за формулою:

$$F = \frac{N_{\text{ф}}}{N_{\text{заг}}} \times 100,$$

де:

F — частка фрагментованих трихомів, %;

$N_{\text{ф}}$ — кількість фрагментованих трихомів;

$N_{\text{заг}}$ — загальна кількість проаналізованих трихомів.

2.4.5. Контроль рН культурального середовища. Оскільки *A. platensis* є алкалофільною ціанобактерією, важливим показником стабільності умов культивування був контроль рН культурального середовища. Вимірювання рН проводили на початку експерименту та в динаміці культивування, зокрема на 3-тю і 6-ту добу. Для цього використовували рН-метр або індикаторні тест-смужки з відповідним діапазоном визначення лужних значень рН.

Отримані показники рН використовували для оцінки змін хімічних умов середовища під час росту культури. Динаміку рН порівнювали з показниками OD_{680} , сухої біомаси та накопичення фікоціаніну. Це дозволяло оцінити, чи супроводжується інтенсивний ріст культури змінами реакції середовища та чи можуть ці зміни впливати на біосинтез пігментів.

2.4.6. Екстракція фікоціаніну методом заморожування–розморожування. Для виділення фікоціаніну біомасу *A. platensis* штам 700 відокремлювали від культурального середовища центрифугуванням, після чого клітинний осад піддавали руйнуванню методом багаторазового заморожування–розморожування для вивільнення водорозчинного фікоціаніну. Заморожування проводили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом щонайменше 12 год із подальшим розморожуванням за кімнатної температури. Загалом здійснювали три послідовні цикли, що забезпечували ефективну деструкцію клітинних структур.

Після екстракції суспензію повторно центрифугували при швидкості до $7000 \text{ об} \cdot \text{хв}^{-1}$ для осадження клітинних залишків. Надосадову рідину, що містила розчинений фікоціанін, відбирали для подальшого очищення та спектрофотометричного аналізу.

2.4.7. Очищення фікоціаніну методом діалізу. Екстракт фікоціаніну піддавали очищенню з метою видалення розчинних солей, низькомолекулярних метаболітів та супутніх домішок. Очищення здійснювали методом діалізу з використанням напівпроникної целюлозної мембрани з молекулярно-масовим порогом відсікання 10–14 кДа, що забезпечувало утримання білкових комплексів фікоціаніну С та дифузійне видалення низькомолекулярних компонентів.

Діалізні мішечки занурювали у фосфатний буферний розчин із рН 6,8–7,0, який періодично замінювали для підтримання концентраційного градієнта. Очищення проводили протягом 12–24 год при температурі $+4 \text{ }^\circ\text{C}$, що сприяло збереженню стабільності пігменту та запобігало його деградації.

2.4.8. Спектрофотометричний аналіз фікоціаніну. Для кількісної оцінки концентрації та відносної чистоти фікоціаніну зразки пігменту піддавали спектрофотометричному аналізу. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 615 нм, що відповідає максимуму поглинання фікоціаніну С, а також при 280 нм — характерній для загального поглинання білків.

Співвідношення значень OD_{615}/OD_{280} використовували як показник відносної чистоти препарату. Такий підхід дозволяв порівнювати ефективність очищення та якість фікоціаніну, отриманого за різних умов культивування.

2.4.9. Розрахунок відносного виходу фікоціаніну на одиницю біомаси. Для більш повної оцінки ефективності культивування визначали відносний вихід фікоціаніну на одиницю сухої біомаси. Такий підхід дозволяв порівняти не лише загальне накопичення пігменту в екстракті, а й здатність культури синтезувати фікоціанін відносно фактично утвореної біомаси.

Відносний вихід фікоціаніну визначали як співвідношення оптичної густини екстракту при 615 нм до концентрації сухої біомаси у відповідному експериментальному варіанті за формулою:

$$Y_{\text{ф}} = \frac{OD_{615}}{X},$$

де:

$Y_{\text{ф}}$ — відносний вихід фікоціаніну;

OD_{615} — оптична густина екстракту фікоціаніну при 615 нм;

X — концентрація сухої біомаси, г/

Отриманий показник використовували для порівняння ефективності різних температурних і світлових режимів. Це давало можливість визначити, які умови сприяють переважно накопиченню біомаси, а які — підвищенню пігментної продуктивності культури.

2.5. Статистична обробка результатів

Отримані експериментальні дані обробляли шляхом розрахунку середнього значення (M) та стандартного відхилення (SD), що дозволяло оцінити відтворюваність результатів. Результати подавали у вигляді $M \pm SD$.

Для порівняння експериментальних варіантів враховували показники оптичної густини OD_{680} , сухої біомаси, рН культурального середовища, частки фрагментованих трихомів, OD_{615} , співвідношення OD_{615}/OD_{280} та відносного виходу фікоціаніну на одиницю біомаси. Статистичні розрахунки здійснювали з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Візуалізацію результатів виконували у вигляді лінійних, стовпчикових графіків і порівняльних діаграм.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ АНАЛІЗ

3.1. Вплив умов культивування на ріст *A. platensis* штам 700

Динаміку росту культури *A. platensis* штам 700 оцінювали за зміною оптичної густини культуральної суспензії при $\lambda = 680$ нм протягом усього періоду культивування (рис. 3.1).

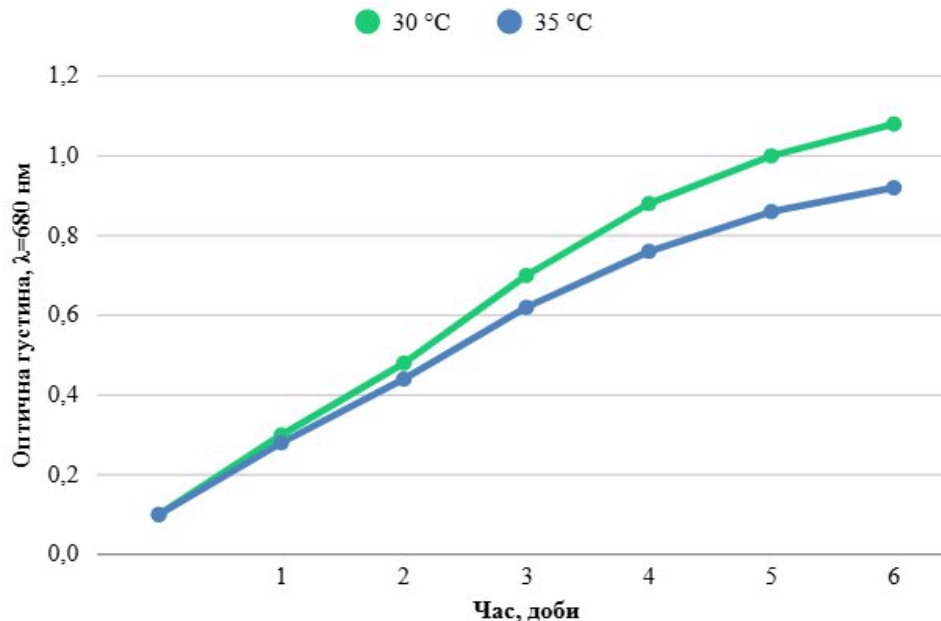


Рис. 3.1 Динаміка росту *A. platensis* штам 700, виражена через зміну оптичної густини культури при довжині хвилі 680 нм (OD_{680}), за різних температурних режимів культивування (30 °C та 35 °C) протягом 6 діб.

Обрана довжина хвилі відповідає максимуму поглинання хлорофілу *a* та є інформативною для оцінки фотосинтетично активної біомаси, оскільки значення OD_{680} відображає концентрацію клітин у суспензії та функціональний стан фотосинтетичного апарату. За температури 30 °C культура демонструвала інтенсивне та стабільне наростання біомаси з досягненням на 6-ту добу середнього

значення $OD_{680} = 1,08 \pm 0,06$. Підвищення температури до $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ супроводжувалося зниженням темпів росту та меншими кінцевими значеннями оптичної густини ($OD_{680} = 0,92 \pm 0,05$ на 6-ту добу), що свідчить про наближення до верхньої межі температурної толерантності культури (рис. 3.1).

Ймовірною причиною уповільнення росту за $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ є часткове пригнічення фотосинтетичних процесів і ферментативної активності внаслідок теплового стресу, що знижує ефективність утворення біомаси.

Дослідження впливу світлового режиму на накопичення біомаси *A. platensis* штам 700 проводили за температури $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, яку за результатами попереднього експерименту визначено як оптимальну для накопичення біомаси (рис. 3.2).

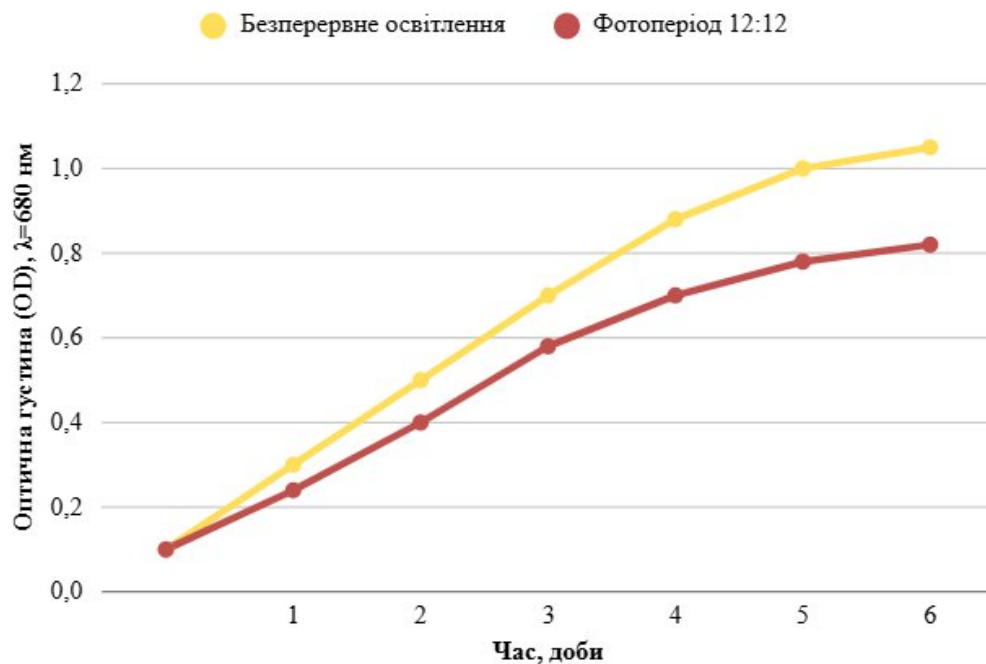


Рис. 3.2 Кінетика накопичення біомаси *A. platensis* штам 700 за різних режимів освітлення (безперервне та фотоперіод 12:12), визначена за показниками OD_{680} .

Зокрема, за умов безперервного освітлення (24:0 год) спостерігалось більш активне зростання оптичної густини протягом усього періоду культивування порівняно з циклічним режимом 12:12 год (світло:темрява). На 6-ту добу

культивування за умов безперервного освітлення середнє значення оптичної густини становило $OD_{680} = 1,05 \pm 0,06$, тоді як за циклічного фотоперіоду 12:12 год — $OD_{680} = 0,82 \pm 0,05$, що відповідало підвищенню продуктивності біомаси на 20–25 % (рис. 3.2).

Перевага безперервного освітлення зумовлена відсутністю темної фази, що забезпечує постійне надходження енергії для фотосинтезу, інтенсивніший синтез органічних речовин і прискорене клітинне ділення, унаслідок чого відбувається швидше накопичення біомаси.

3.2. Накопичення сухої біомаси *A. platensis* штам 700 за різних умов культивування

Визначення сухої біомаси підтвердило тенденції, встановлені за показником OD_{680} . Найвищий рівень накопичення біомаси спостерігали за температури 30 °C та безперервного освітлення, де суха маса культури на 6-ту добу становила $0,82 \pm 0,04$ г/л. За тієї ж температури, але за фотоперіоду 12:12, показник сухої біомаси був нижчим і становив $0,63 \pm 0,03$ г/л (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Накопичення сухої біомаси *A. platensis* штам 700 на 6-ту добу культивування

Умови культивування	OD_{680} на 6-ту добу	Суша біомаса, г/л	SD, г/л
30 °C, 24:0	$1,05 \pm 0,06$	0,82	0,04
30 °C, 12:12	$0,82 \pm 0,05$	0,63	0,03
35 °C, 24:0	$0,92 \pm 0,05$	0,70	0,04
35 °C, 12:12	$0,72 \pm 0,04$	0,54	0,03

Підвищення температури до 35 °С супроводжувалося зниженням накопичення сухої біомаси. За безперервного освітлення при 35 °С суха біомаса становила $0,70 \pm 0,04$ г/л, тоді як за фотоперіоду 12:12 — $0,54 \pm 0,03$ г/л. Отримані дані свідчать, що температура 30 °С є більш сприятливою для продуктивного росту *A. platensis* штам 700, а безперервне освітлення забезпечує інтенсивніше накопичення біомаси порівняно з циклічним фотоперіодом.

3.3. Динаміка рН культурального середовища

У процесі культивування *A. platensis* штам 700 спостерігали поступове підвищення рН культурального середовища в усіх експериментальних варіантах. Початкове значення рН становило 9,65, що відповідає лужному діапазону, сприятливому для росту представників роду *Arthrospira*. На 6-ту добу культивування рН підвищувався до 9,91–10,12 залежно від умов вирощування (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Динаміка рН культурального середовища за різних умов культивування *A. platensis* штам 700

Умови культивування	рН на 0 добу	рН на 3 добу	рН на 6 добу	Загальна тенденція
30 °С, 24:0	9,65	9,82	10,05	помірне підвищення рН
30 °С, 12:12	9,65	9,76	9,91	стабільне помірне підвищення
35 °С, 24:0	9,65	9,88	10,12	виразніше підвищення рН
35 °С, 12:12	9,65	9,78	9,96	помірне підвищення рН

Найвиразніше підвищення рН спостерігали за температури 35 °С і безперервного освітлення, де на 6-ту добу показник становив 10,12. Це може бути пов'язано з активним використанням неорганічного вуглецю та змінами

карбонатно-бікарбонатної рівноваги середовища. За температури 30 °С і безперервного освітлення рН на 6-ту добу становив 10,05, що залишалось в межах фізіологічно сприятливого діапазону для культури.

За фотоперіоду 12:12 зміни рН були менш вираженими, що може бути наслідком нижчої інтенсивності фотосинтетичної активності внаслідок наявності темної фази. Загалом, збереження лужного середовища протягом усього періоду культивування свідчить про стабільність умов вирощування та придатність середовища Заррука для підтримання росту *A. platensis*.

3.4. Мікроскопічна оцінка морфологічного стану культури *A. platensis* штам 700

Мікроскопічний аналіз культури *A. platensis* штам 700 проводили з метою оцінки морфологічного стану трихомів, їхньої цілісності, форми та наявності можливих ознак стресу. Оцінка морфологічних характеристик є важливою, оскільки фізіологічний стан культури не завжди повністю відображається лише показниками OD₆₈₀ або сухої біомаси. Збереження типової структури трихомів свідчить про стабільність культури та сприятливість умов культивування.

У зразках, вирощених за температури 30 °С, переважали цілісні трихоми з типовою морфологією, рівномірною клітинною організацією та без виражених ознак руйнування. Культура мала однорідний вигляд, а кількість фрагментованих або деформованих ниток була незначною. Це свідчить про те, що температурний режим 30 °С є фізіологічно сприятливим для росту *A. platensis* штам 700 (рис. 3.3).

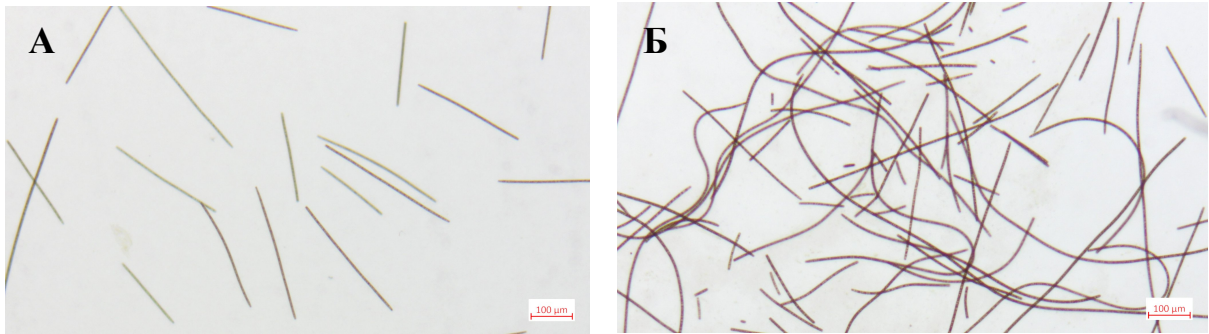


Рис. 3.3 Мікроскопічна характеристика культури *A. platensis* штам 700 за різних температурних режимів культивування. Збільшення $\times 5$; масштабна лінійка — 100 мкм. **А** — культура за температури 30 °С: переважають інтактні трихоми з цілісною лінійною формою; **Б** — культура за температури 35 °С: спостерігаються ознаки фрагментації трихомів.

За температури 35 °С спостерігали більш виражені ознаки морфологічних змін культури. Зокрема, відзначали збільшення частки укорочених і фрагментованих трихомів, часткову деформацію ниток та менш рівномірну структуру культури. Такі зміни можуть бути наслідком теплового стресу, який впливає на стабільність клітинних структур, фотосинтетичний апарат і загальний фізіологічний стан ціанобактерій.

Порівняння світлових режимів показало, що за безперервного освітлення культура демонструвала активний ріст, однак у частині зразків могли проявлятися ознаки підвищеного фотосинтетичного навантаження, зокрема поодинокі фрагментація трихомів. За фотоперіоду 12:12 морфологічний стан культури був більш стабільним, хоча загальний приріст біомаси був нижчим. Це може свідчити про те, що наявність темної фази частково знижує інтенсивність росту, але водночас може сприяти збереженню структурної цілісності клітин.

Отже, мікроскопічна оцінка підтвердила, що оптимальним для збереження морфологічної стабільності культури є температурний режим 30 °С. Безперервне освітлення забезпечує активніше накопичення біомаси, проте потребує контролю

морфологічного стану культури, оскільки тривала дія світла може супроводжуватися додатковим фізіологічним навантаженням.

3.5. Морфометричний аналіз трихомів *A. platensis* штам 700

Морфометричний аналіз показав, що найкращий морфологічний стан культури спостерігався за температури 30 °С. У варіанті 30 °С, 24:0 середня довжина трихомів становила 285 ± 32 мкм, а частка інтактних трихомів — 88 % (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Морфометричні показники культури *A. platensis* штам 700 за різних умов культивування

Умови культивування	Середня довжина трихомів, мкм	SD, мкм	Інтактні трихоми, %	Фрагментовані трихоми, %	Морфологічна характеристика
30 °С, 24:0	285	32	88	12	активний ріст, переважно цілісні трихоми
30 °С, 12:12	270	28	92	8	стабільна морфологія, нижчий приріст біомаси
35 °С, 24:0	215	35	74	26	ознаки теплового та світлового навантаження
35 °С, 12:12	205	31	78	22	уповільнений ріст, часткова фрагментація

За фотоперіоду 12:12 при 30 °С середня довжина трихомів була дещо нижчою — 270 ± 28 мкм, однак частка інтактних форм була найвищою і становила 92 %. Це свідчить про сприятливий вплив помірного світлового режиму на збереження структурної цілісності культури.

За температури 35 °С спостерігали зменшення середньої довжини трихомів і зростання частки фрагментованих форм. У варіанті 35 °С, 24:0 середня довжина трихомів становила 215 ± 35 мкм, а частка фрагментованих трихомів досягала 26 %. За умов 35 °С, 12:12 середня довжина трихомів становила 205 ± 31 мкм, а частка фрагментованих форм — 22 %. Такі зміни можуть свідчити про стресовий вплив підвищеної температури на морфологічну стабільність культури.

3.6. Вплив факторів середовища на накопичення фікоціаніну

Концентрацію та відносну чистоту фікоціаніну С визначали після екстракції та діалізного очищення методом спектрофотометрії. Найвищий рівень накопичення пігменту спостерігали у зразках, культивованих за температури 30 °С та безперервного освітлення, де середнє значення оптичної густини становило $OD_{615} = 0,82 \pm 0,04$. За фотоперіоду 12:12 при тій самій температурі концентрація фікоціаніну С була нижчою — $OD_{615} = 0,67 \pm 0,03$. Підвищення температури культивування до 35 °С призводило до зменшення накопичення пігменту незалежно від світлового режиму. За безперервного освітлення середнє значення OD_{615} становило $0,65 \pm 0,03$, тоді як за фотоперіоду 12:12 — $0,52 \pm 0,03$, що свідчить про негативний вплив надмірного температурного навантаження на біосинтез фікоціаніну (рис. 3.4).

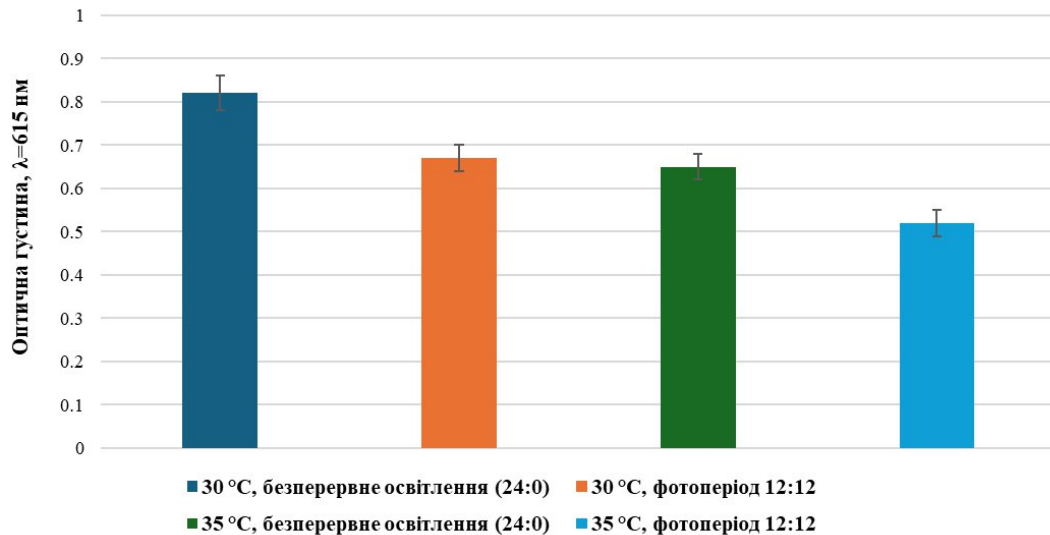


Рис. 3.4 Вплив температури культивування (30 °C і 35 °C) та режиму освітлення (безперервне освітлення і фотоперіод 12:12) на накопичення фікоціаніну С в культурі *A. platensis* штаму 700, визначене за оптичною густиною при $\lambda = 615$ нм. Дані подано як $M \pm SD$.

Аналіз співвідношення OD_{615}/OD_{280} показав тенденцію до дещо вищої відносної чистоти пігменту у зразках, отриманих за циклічного світлового режиму 12:12, що може бути пов'язано зі зменшенням кількості супутніх білкових домішок за помірнішого фотосинтетичного навантаження. Таким чином, оптимальні умови для максимального накопичення фікоціаніну С у *A. platensis* штаму 700 відповідали температурі 30 °C та безперервному освітленню, тоді як підвищення температури до 35 °C та скорочення фотоперіоду негативно впливали на синтез пігменту, підтверджуючи наявність компромісу між інтенсивністю росту культури та накопиченням біологічно активних метаболітів.

3.7. Відносний вихід фікоціаніну на одиницю сухої біомаси

Аналіз відносного виходу фікоціаніну на одиницю сухої біомаси показав, що найвище загальне накопичення пігменту спостерігалось за умов 30 °C і безперервного освітлення. У цьому варіанті OD_{615} становив $0,82 \pm 0,04$, а суха

біомаса — $0,82 \pm 0,04$ г/л. Відносний показник OD_{615} /суха біомаса становив 1,00, що свідчить про високу ефективність цього режиму для одночасного накопичення біомаси та фікоціаніну (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Відносний вихід фікоціаніну на одиницю сухої біомаси

***A. platensis* штамп 700**

УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ	OD_{615}	SD OD_{615}	Суха біомаса, г/л	OD_{615} /суха біомаса	Відносна чистота OD_{615}/OD_{280}	Біотехнологічна оцінка режиму
30 °C, 24:0	0,82	0,04	0,82	1,00	1,20	максимальне накопичення пігменту
30 °C, 12:12	0,67	0,03	0,63	1,06	1,35	вища відносна чистота пігменту
35 °C, 24:0	0,65	0,03	0,70	0,93	1,10	зниження пігментної продуктивності
35 °C, 12:12	0,52	0,03	0,54	0,96	1,22	нижче загальне накопичення пігменту

Водночас у варіанті 30 °C і фотоперіод 12:12 відносний вихід фікоціаніну на одиницю біомаси був дещо вищим — 1,06. Це вказує на те, що, хоча загальна кількість біомаси та OD_{615} була нижчою, культура могла накопичувати порівняно більше пігменту відносно утвореної сухої маси. Крім того, саме цей режим характеризувався вищою відносною чистотою фікоціаніну — $OD_{615}/OD_{280} = 1,35$.

За температури 35 °C показники пігментної продуктивності були нижчими. У варіанті 35 °C, 24:0 відносний вихід фікоціаніну становив 0,93, а за 35 °C, 12:12 — 0,96. Це свідчить про негативний вплив підвищеної температури на біосинтез фікоціаніну та загальний фізіологічний стан культури.

Отже, режим 30 °C і 24:0 є найбільш ефективним для максимального накопичення фікоціаніну та біомаси, тоді як режим 30 °C і 12:12 може бути перспективним для отримання пігментного препарату з вищою відносною чистотою.

3.8. Визначення оптимальних параметрів культивування *A. platensis* штам 700

Для визначення оптимальних параметрів культивування *A. platensis* штам 700 було проведено порівняльний аналіз основних ростових, пігментних, морфологічних і фізико-хімічних показників, отриманих за різних температурних режимів і фотоперіодів. Узагальнені результати наведено в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Порівняльна характеристика показників культивування *A. platensis* штам 700 за різних температурних режимів і фотоперіодів

УМОВИ культивування	OD ₆₈₀	Суха біомаса, г/л	OD ₆₁₅	Чистота OD ₆₁₅ /OD ₂₈₀	OD ₆₁₅ /біомаса	Інтактні трихоми, %	Фрагментовані трихоми, %	pH на 6 добу
30 °C, 24:0	1,05	0,82	0,82	1,20	1,00	88	12	10,05
30 °C, 12:12	0,82	0,63	0,67	1,35	1,06	92	8	9,91
35 °C, 24:0	0,92	0,70	0,65	1,10	0,93	74	26	10,12
35 °C, 12:12	0,72	0,54	0,52	1,22	0,96	78	22	9,96

Аналіз узагальнених показників засвідчив, що найвищу інтенсивність росту культури забезпечувало культивування при 30 °C за безперервного освітлення 24:0.

За цих умов відзначено максимальні значення оптичної густини культури при 680 нм, сухої біомаси та OD_{615} , що свідчить про найактивніше накопичення біомаси й фікоціаніну С.

Водночас найвищу відносну чистоту фікоціаніну та найбільшу частку інтактних трихомів було встановлено за температури 30 °С і фотоперіоду 12:12. Це свідчить про сприятливий вплив циклічного освітлення на морфологічну стабільність культури та якість отриманого пігментного препарату. За підвищення температури до 35 °С спостерігалось зниження показників росту, накопичення фікоціаніну та збільшення частки фрагментованих трихомів, що може свідчити про посилення стресового впливу на культуру.

Таким чином, у межах проведеного дослідження оптимальним режимом для максимального накопичення біомаси *A. platensis* штам 700 є культивування при 30 °С за безперервного освітлення 24:0. Для отримання фікоціаніну з вищою відносною чистотою доцільним є застосування температури 30 °С у поєднанні з фотоперіодом 12:12. Отримані результати свідчать про можливість цілеспрямованого регулювання ростових і біосинтетичних процесів *A. platensis* шляхом зміни температурного режиму та світлових умов залежно від цільового продукту — біомаси або фікоціаніну С.

ВИСНОВКИ

1. На підставі аналізу наукових джерел показано, що ціанобактерії роду *Arthrospira* (комерційна назва *Spirulina*) є перспективними об'єктами біотехнології як продуцентами білкової біомаси та фікоціаніну С, а їхня продуктивність істотно залежить від температурного режиму та умов освітлення.

2. Встановлено, що оптимальною температурою для росту *A. platensis* штам 700 є 30 °С. На 6-ту добу культивування за цієї температури показник OD₆₈₀ становив 1,08 ± 0,06, а накопичення сухої біомаси досягало 0,82 г/л. Натомість підвищення температури до 35 °С призводило до зниження інтенсивності росту OD₆₈₀ становив 0,92 ± 0,05, суха біомаса 0,70 г/л), що свідчить про наближення до верхньої межі температурної толерантності.

3. Показано, що за температури 30 °С безперервний світловий режим (24:0) забезпечує вищу продуктивність біомаси *A. platensis* штам 700 порівняно з фотоперіодом 12:12: на 6-ту добу значення OD₆₈₀ становило 1,05 ± 0,06 проти 0,82 ± 0,05, що відповідає збільшенню накопичення біомаси приблизно на 20–25 %.

4. За допомогою мікроскопічного та морфометричного аналізів доведено, що температурний режим 30 °С є оптимальним для збереження структурної цілісності культури (88–92 % інтактних трихомів із середньою довжиною 270–285 мкм). Культивування за 35 °С викликає тепловий стрес, що супроводжується зміною морфології та фрагментацією до 22–26 % трихомів.

5. Визначено, що в усіх варіантах вирощування відбувалося поступове підлушення культурального середовища від початкового значення 9,65 до 9,91–10,12 на 6-ту добу. Найвиразніше підвищення рН (до 10,12) зафіксовано за температури 35 °С та безперервного освітлення, що пов'язано з активним споживанням неорганічного вуглецю й змінами карбонатно-бікарбонатної

рівноваги, проте в усіх досліджених режимах показники залишалися в межах фізіологічного оптимуму для *A. platensis*.

6. Встановлено, що максимальне накопичення фікоціаніну С після екстракції та діалізу спостерігалось за температури 30 °С і безперервного освітлення ($OD_{615} = 0,82 \pm 0,04$). Скорочення фотоперіоду до 12:12 за цієї температури знижувало показник ($OD_{615} = 0,67 \pm 0,03$), тоді як підвищення температури до 35 °С призводило до подальшого зменшення накопичення пігменту незалежно від світлового режиму ($OD_{615} = 0,65 \pm 0,03$ для 24:0 та $0,52 \pm 0,03$ для 12:12).

7. Визначено, що найвища відносна чистота фікоціаніну С ($OD_{615}/OD_{280} = 1,35$) та найбільший відносний вихід пігменту на одиницю сухої біомаси (1,06) досягаються за фотоперіоду 12:12 при 30 °С. Це підтверджує наявність компромісу між максимальною продуктивністю загальної біомаси та якісними й кількісними характеристиками цільового пігментного препарату.

8. Рекомендовано для максимального накопичення біомаси *A. platensis* штам 700 застосовувати температуру 30 °С та безперервне освітлення (24:0), а для одержання фікоціаніну з підвищеною відносною чистотою — температуру 30 °С і фотоперіод 12:12; результати можуть бути використані для оптимізації лабораторних умов культивування та подальшого масштабування процесу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abreu A. Martins R. Nunes J. Emerging Applications of *Chlorella* sp. and *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. *Bioengineering*. 2023. 10(№8). 955.
2. Ai X. Yu P. Li X. Lai X. Yang M. Liu F. Luan F. Meng X. Polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction methods, structural features and bioactivities diversity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. 123211.
3. AlFadhly N. Alhelfi N. Altemimi A. Verma D. Cacciola F. Narayanankutty A. Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of *Spirulina* and Their Health Benefits: A Review. *Molecules*. 2022. 27(№17). 5584.
4. Braune S. Krüger-Genge A. Kammerer S. Jung F. Küpper J.H. Phycocyanin from *Arthrospira platensis* as Potential Anti-Cancer Drug: Review of In Vitro and In Vivo Studies. *Life*. 2021. 11(№2). 91.
5. Chaiklahan R. Chirasuwan N. Srinorasing T. Attasat S. Nopharatana A. Bunnag B. Enhanced biomass and phycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by a cultivation management strategy: Light intensity and cell concentration *Bioresource Technology*. 2022. 343. 126077.
6. Chen W. Chen Y. Liao Y.-C. Huang X.-W. Lu T. Shih S. Effect of hot water extracts of *Arthrospira maxima* (*spirulina*) against respiratory syncytial virus. *Phytomedicine*. 2022. 110. 154611.
7. Citi V. Torre S. Flori L. Usai L. Aktay N. Dunford N. Lutz G. Nieri P. Nutraceutical Features of the Phycobiliprotein C-Phycocyanin: Evidence from *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). *Nutrients*. 2024. 16(№11). P. 1752.
8. Dianursanti Chempaka R. Hartono N. Habibah L. Praharyawan S. Effect of Light Quality, Light Intensity, and Cell Inoculum Arrangement on Growth, Pigment and Carbon Content from *Spirulina platensis* using LED Light. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2025. 32(№5). P. 1123-1134.

17. Lao I. Edullantes B. Growth, Productivity, and Size Structure of *Spirulina* Strain Under Different Salinity Levels: Implications for Cultivation Optimization. *Phycology*. 2025. 5(№3). P. 31.
18. Lijassi I. Arahou F. Mansouri Z. Wahby A. Rhazi L. Wahby I. Comparative Analysis of Effect of Culture Conditions on Growth and C-Phycocyanin Production in Helical and Linear *Spirulina*. *Current Microbiology*. 2024. №81. P. 152.
19. Lim H. Khoo K. Show P. Impact of nutrient deficiency and harvesting strategy on biomass and phycocyanin production in *Spirulina* cultures. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2025. №13. P. 1546801.
20. Maddiboyina B. Vanamamalai H. Roy H. Gandhi S. Kavisri M. Moovendhan M. Food and drug industry applications of microalgae *Spirulina platensis*: A review. *Journal of Basic Microbiology*. 2023. 63(№6). P. 573-583.
21. Marciano L. Pedro G. Santos W. Tagliaferro G. Batista F. Guimarães D. New nutrients evaluation in *Spirulina maxima* growth for phycocyanin, carbohydrate, and biochar production. *Pigment & Resin Technology*. 2024. 5 (№6). P. 1008–1016.
22. Musa M. Jirgi G. Zango Z. Isah M. Abdurrazak M. Adamu A. Wadi I. Adeleke A. Garba Z. Bello U. Adamu H. Hosseini-Bandegharai A. Bokov D. A review on techno-economic assessment of *Spirulina* for sustainable nutraceutical, medicinal, environmental, and bioenergy applications. *Bioresources and Bioprocessing*. 2025. №12. P. 51.
23. Nosratimovafagh A. Fereidouni A. Krujatz F. Modeling and Optimizing the Effect of Light Color, Sodium Chloride and Glucose Concentration on Biomass Production and the Quality of *Arthrospira platensis* Using Response Surface Methodology (RSM). *Life*. 2022. 12(№3). P. 371.
24. Nurjannah I. Subroto T. Hardianto A. Adinisa L. Mochida K. Key Nutrient Drivers for Biomass and C-Phycocyanin Production in *Spirulina* sp. Revealed by Media Optimization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025. 26(№21). P. 10425.

25. Pan-Utai W. Iamtham S. Boonbumrung S. Mookdasanit J. Improvement in the Sequential Extraction of Phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* Using Green Technologies. *Life*. 2022. 12(№11). 1896.

26. Prates D. Radmann E. Duarte J. Morais M. Costa J. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource Technology*. 2018. №256. P. 38-43.

27. Rizzoli M. Lutz G. Usai L. Fais G. Dessì D. Soto-Ramírez R. Cosenza B. Concas A. Photoautotrophic Batch Cultivation of *Limnospira* (*Spirulina*) *platensis*: Optimizing Biomass Productivity and Bioactive Compound Synthesis Through Salinity and pH Modulation. *Marine Drugs*. 2025. 23 (№7). P. 281.

28. Sabat S. Bej S. Swain S. Bishoyi A. Sahoo C. Sabat G. Padhy R. Phycochemistry and pharmacological significance of filamentous cyanobacterium *Spirulina* sp. *Bioresources and Bioprocessing*. 2025. №12. P. 27.

29. Sinetova M. Kupriyanova E. Los D. *Spirulina*/*Arthrospira*/*Limnospira*—Three Names of the Single Organism. *Foods*. 2024. 13(№17). P. 2762.

30. Villaró S. Acién G. Alarcon J. Ruiz Á. Rodríguez-Chikri L. Viviano E. Lafarga T. A zero-waste approach for the production and use of *Arthrospira platensis* as a protein source in foods and as a plant biostimulant in agriculture. *Journal of Applied Phycology*. 2023. 35. 2619–2630.

31. Wei Q. Fu G. Wang K. Yang Q. Zhao J. Wang Y. Ji K. Song S. Advances in Research on Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides from Seaweeds. *Pharmaceuticals*. 2022. 15(№5). 581.