

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А.О. КОВАЛЕВСКОГО

На правах рукописи

ЧЕЛЕБИЕВА ЭЛИНА СЕРГЕЕВНА

УДК 582.263:577.127

**ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА
У ЗЕЛЁНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**

03.02.10. - гидробиология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
Минюк Галина Семёновна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник

Севастополь – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ВТОРИЧНЫЙ КАРОТИНОГЕНЕЗ КАК МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ И ЭВРИБИОНТНЫХ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ К АБИОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ.....	16
1.1. Определение понятия «вторичный каротиногенез» и распространение этого явления у микроводорослей разных таксонов и экологических групп.....	16
1.2. Локализация, состав, биосинтез и физико-химические свойства вторичных каротиноидов	21
1.3. Функциональная роль биосинтеза астаксантина в адаптациях микроводорослей к действию повреждающих факторов среды	31
1.4. Биологическая активность астаксантина и их использование в различных сферах экономики.....	33
1.5. Двухстадийная накопительная культура как метод исследования вторичного каротиногенеза у микроводорослей и скрининга новых коммерчески перспективных продуцентов астаксантина	36
РАЗДЕЛ 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	39
2.1. Штаммы микроводорослей и условия культивирования.....	39
2.1.1. Происхождение использованных в работе штаммов микроводорослей	39
2.1.2. Методы и условия выращивания микроводорослей.....	40
2.2. Молекулярно-генетические методы определения таксономического статуса микроводорослей	45
2.3. Методы измерений и анализов.....	49
РАЗДЕЛ 3. ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА У КОККОИДНЫХ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ ПОРЯДКА VOLVOCALES НА ПРИМЕРЕ <i>ETTLIA CAROTINOSA</i> КОМА́РЕК 1989.....	55
3.1. Особенности введения в лабораторную культуру коллекционного	

штамма <i>Ettlia carotinos</i> АСКУ 573-06	55
3.2. Морфологические и физиолого-биохимические особенности реакции <i>Ettlia carotinos</i> на действие различных химических стресс-агентов.....	63
3.2.1. Динамика численности и размеров клеток <i>Ettlia carotinos</i> в постстрессорный период в зависимости от природы химических активаторов вторичного каротиногенеза.....	63
3.2.2. Динамика содержания суммарных каротиноидов и их фракционного состава в культурах, клетках и биомассе <i>Ettlia carotinos</i>	67
3.2.3. Динамика содержания сухого вещества и его основных компонентов в культурах, клетках и биомассе <i>Ettlia carotinos</i>	77
РАЗДЕЛ 4. ОСОБЕННОСТИ РОСТА И ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПОРЯДКА SCENEDESMALES В УСЛОВИЯХ ДВУХСТАДИЙНОЙ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ.....	87
4.1. Верификация таксономического статуса объектов исследования.....	87
4.1.1. Верификация таксономического статуса <i>Pseudospongiococcum protococcoides</i> (CALU-221).....	89
4.1.2. Верификация таксономического статуса <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (IPPAS D-292).....	92
4.2. Ростовые характеристики сценедесмальных микроводорослей на «зелёной» стадии двухстадийной культуры.....	95
4.3. Динамика физиолого-биохимических характеристик у различных видов <i>Scenedesmales</i> на «красной» стадии культивирования.....	104
4.3.1. Динамика численности и размеров клеток сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования.....	104
4.3.2. Динамика содержания хлорофилла <i>a</i> и суммарных каротиноидов в культурах, клетках и биомассе сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования	108
4.3.3. Особенности фракционного состава вторичных каротиноидов у сценедесмальных микроводорослей	115

4.3.4. Динамика содержания сухого вещества и его основных компонентов на «красной» стадии культивирования.....	123
ВЫВОДЫ.....	133
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	135

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АДК - адониксантин,
АДР - адонирубин,
АК - аминокислоты,
АО - антиоксиданты,
АОА - антиоксидантная активность,
АСТ - астаксантин,
АФК – активные формы кислорода,
БК - β-каротин,
ВКР - вторичные каротиноиды,
ВКРГ - вторичный каротиногенез,
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота,
ДСНК - двухстадийная накопительная культура
ДЭАСТ - диэфиры астаксантина,
Е - Освещенность, лк,
КАН - кантаксантин,
ККР - вторичные кетокаротиноиды,
КР - каротиноиды,
∑ КР- суммарные каротиноиды,
МЭАСТ - моноэфиры астаксантина,
ПОЛ - перекисное окисление липидов,
ПЦР - полимеразная цепная реакция,
РНК - рибонуклеиновая кислота,
СВ - сухое вещество,
ТАГ - триацилглицериды,
ХЛ - хлорофилл,
ЭАДР - эфиры адонирубина,
–
x - средняя арифметическая

D - длина,

L - ширина,

m – ошибка средней арифметической

N - азот,

N - численность клеток,

NCBI - Национальный центр биотехнологической информации

P - фосфор,

Rf – коэффициент хроматографической подвижности

s – стандартное отклонение

T -температура, ° C,

V - объём, л,

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Многие виды эврибионтных и экстремофильных зелёных микроводорослей при резком ухудшении условий внешней среды (пересыхание, острый дефицит питания, экстремальное увеличение освещённости, температуры, солёности, действие ксенобиотиков и др.) накапливают в липидных включениях цитоплазмы или стромы пластид значительное количество специфических (вторичных) каротиноидов (ВКР), отличных по структуре и функциональным свойствам от фотосинтетических (первичных) каротиноидов (ПКР), локализованных в тилакоидных мембранах хлоропластов. По химической природе ВКР у *Chlorophyceae*, за редким исключением, являются C_{40} -кетокаротиноидами (ККР) – интермедиатами ферментативного окисления β -каротина в астаксантин (3,3'-дигидрокси- β,β -каротин-4,4'-дион) (АСТ), доля которого в общем пуле ВКР в отдельных случаях (например, у *Haematococcus pluvialis*) может достигать 95 -99 %. Процесс накопления ВКР, получивший название «вторичного каротиногенеза» (ВКРГ), рассматривается в настоящее время как неотъемлемый компонент комплекса морфо-физиологических и биохимических адаптаций эврибионтных *Chlorophyceae* к действию повреждающих факторов среды, обеспечивающих сохранение жизнеспособности клеток путём их перехода из вегетативного состояния в стадию покоя. Ключевая роль ВКРГ состоит в удержании окислительного стресса, неизбежно развивающегося при действии повреждающих факторов среды, в физиологических пределах, позволяющих водорослям перестроить метаболизм для формирования спор или цист [30, 56, 147, 159, 215]. Хотя первые попытки объяснения природы и функциональной роли «гиперсинтеза» ВКР у *Chlorophyceae* относятся к середине XX столетия [87, 92, 186, 187], серьезные исследования в этом направлении стали возможны лишь в начале 90-х гг. с появлением современных методов физико-химического анализа каротиноидов [63]. Еще одним движущим моментом активизации исследований такого плана в последние 10-15 лет послужила коммерческая

ценность АСТ, основанная на его исключительно высокой биологической активности (мощный антиоксидант, иммуностимулятор, регулятор деятельности нервной и сердечно-сосудистой систем) и широком спектре возможных областей практического применения (аквакультура, медицина, производство БАД, косметики и др.) [61, 88, 122, 154, 168, 164]. Подавляющее большинство работ, выполненных в рамках этой тематики, проведено на пресноводной планктонной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844 (Volvocales) как наиболее удобном модельном объекте и единственном среди микроводорослей промышленном источнике природного АСТ [13, 22, 56, 109, 154, 166, 174, 209]. В то же время сведения о многочисленной группе уже известных продуцентов ККР из других таксонов и экологических групп ограничиваются, как правило, лишь краткими сообщениями об их способности синтезировать АСТ [8, 37, 80, 134, 165 и др.]. И только для небольшого числа видов (*Clorella zofingiensis* [38, 132, 179], *Scenedesmus obliquus* [191], *Scenedesmus komarekii* [120], *Scenedesmus* sp. [93], *Chlorococcum* sp. [67, 153, 157, 220], *Scotiellopsis rubescens* [33] и др.) выполнены более детальные исследования, характеризующие особенности профиля их ВКР в зависимости от условий культивирования. Однако даже такие данные, полученные с использованием современной аналитической аппаратуры, плохо поддаются сравнительному анализу для выявления общих закономерностей и видоспецифичных особенностей ВКРГ у разных в систематическом и экологическом отношении водорослей, так как получены в разных лабораториях на разных видах и штаммах (и нередко водорослях, идентифицированных только до рода), при существенно различающихся параметрах культивирования. Первостепенным условием для таких обобщений является наличие материалов, полученных в сходных экспериментах на объектах с безусловно доказанным таксономическим статусом. Их актуальность определяется двумя важными в теоретическом и практическом плане аспектами:

– развитием представлений о механизмах адаптации микроводорослей в условиях глобальных климатических изменений и высокой антропогенной нагрузки на водные экосистемы как теоретической основы решения проблемы сохранения биоразнообразия и резерва хозяйственно ценных видов,

– поиском новых коммерчески перспективных источников природного астаксантина.

Особый интерес в этом плане представляют микроводоросли, характеризующие надвидовые таксоны двух эволюционных линий Chlorophyceae – *Chlamydomonas applanata* и *Chlamydomonas lobulata*, и, в частности, порядки Volvocales и Scenedesmales Kostikov, в пределах которых, по литературным данным, ВКРГ встречается наиболее часто [8, 33, 93, 120, 191 и др.].

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа выполнена в отделе физиологии животных и биохимии ИнБЮМ НАНУ в рамках исследований по следующим темам: «Разработка научных основ, методов и технологий сохранения и возобновления биоразнообразия морских экосистем» (№ гос. рег. 0106U012579, 2007-2011 гг.), «Адаптации экосистем приморских элементов экосети Украины под действием биотических и абиотических факторов» (№ гос. рег. 0112U001629, 2012-2016 гг.), конкурсному проекту НАНУ «Проведение комплексных экологических, гидробиологических и биотехнологических исследований с целью решения фундаментальных и прикладных проблем устойчивого использования ресурсного потенциала, восстановления и сохранения морского биоразнообразия и качества морской среды Азово-Черноморского региона» (№ гос. рег. 0110U006203, 2011-2013 гг.). Во всех темах автор участвовала в качестве исполнителя разделов.

Цель и задачи исследований. Цель исследования – выявить общие закономерности и особенности вторичного каротиногенеза и сопряжённых с ним морфо-физиологических адаптаций у зелёных микроводорослей – представителей двух эволюционных линий Chlorophyceae из порядков

Volvocales и *Scenedesmales* при различных моделях экспериментального абиотического стресса.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

1. В условиях двухстадийной накопительной культуры исследовать динамику морфометрических и физиолого-биохимических показателей функционального состояния зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (*Volvocales*) (численности и размеров клеток, содержания и состава пигментов и сухого вещества) в зависимости от характера стресс-воздействия, индуцирующего вторичный каротиногенез.

2. Провести молекулярно-генетическую верификацию таксономического статуса объектов исследования для подтверждения их принадлежности к порядку *Scenedesmales*.

3. Исследовать динамику численности и размеров клеток, содержания и состава пигментов и сухого вещества у сценедесмальных микроводорослей семейства *Scenedesmaceae* (*Scenedesmus rubescens* (P.J.L.Dangeard) E.Kessler et al. 1997 и *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov & Mamkaeva 1974) и *Bracteacoccaceae* (*Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova 1931) в условиях экспериментального абиотического стресса.

Объект исследования – альгологически чистые культуры 4-х видов зелёных микроводорослей порядков *Volvocales* и *Scenedesmales*.

Предмет исследования - видовая и экологическая специфичность вторичного каротиногенеза как ключевого физиолого-биохимического механизма защиты эврибионтных видов микроводорослей от абиотического стресса.

Методы исследования:

- методы лабораторного культивирования микроводорослей,
- физиолого-биохимические методы исследования функциональной активности клеток микроводорослей с использованием: световой микроскопии, микрофотосъёмки, ПЦР-диагностики, проточной цитометрии, компьютерной

программы определения морфометрических параметров клеток (ImageJ), спектрофотометрии, спектроскопии, фотоколориметрии, тонкослойной хроматографии, качественных цветных реакций, гравиметрии, расчетных методов определения скорости роста культур и теоретического выхода каротиноидов,

- методы статистического анализа.

При выполнении работы биоэтические нормы не нарушены.

Научная новизна полученных результатов. Работа является первым сравнительным исследованием особенностей вторичного каротиногенеза и сопряженных с ним физиологических процессов у 4-х видов микроводорослей различной систематической принадлежности и экологической специализации, позволившим выявить общие и специфические черты морфо-биологических и физиолого-биохимических адаптаций у представителей двух массовых, эволюционно удаленных порядка Chlorophyceae - Volvocales и Scenedesmales.

Впервые определена последовательность нуклеотидов в маркерном ядерном гене, кодирующем 18s рРНК, у двух видов микроводорослей, что послужило основанием для изменения таксономического статуса *Chlamydomonas reinhardtii* (штамм IPPAS D-292) на *Scenedesmus rubescens* (100 % идентичность последовательностей нуклеотидов) и подтверждения статуса *Pseudosporogococcum protococcoides* (CALU-221) на молекулярно-генетическом уровне.

Впервые показана высокая фенотипическая и функциональная гетерогенность лабораторных культур штамма АСКУ 573-06 *E. carotinos*, опосредованная постоянным присутствием в культурах вегетативных клеток, содержащих кетокаротиноиды. Выявлены специфические черты адаптивного ответа водоросли на экспериментальную индукцию ВКРГ:

- активный спорогенез на протяжении всей «красной» стадии,
- существенное уменьшение средних объёмов клеток (в 1,8-6,8 раза),
- определяющая роль моноацильных эфиров астаксантина в формировании цитоплазматического пула вторичных каротиноидов,

– наличие в составе вторичных каротиноидов эфиров адонирубина (10-12 % от суммы КР).

Впервые в сравнительном аспекте исследована динамика морфометрических и физиолого-биохимических показателей состояния клеток у трёх представителей порядка Scenedesmales в условиях модельного стресса. Выявлены общие и отличительные черты их адаптивного ответа на однотипное стресс-воздействие:

- существенное увеличение объёмов клеток,
- идентичность качественного состава ВКР, включающего полный набор возможных интермедиатов биосинтеза астаксантина,
- наличие у каждой из сценедесмальных микроводорослей одного или нескольких признаков, несвойственных другим объектам исследования: а) неожиданно высокое для продуцентов АСТ содержание β -каротина у *S. rubescens* – 30,6-34,0 % Σ КР, б) высокое содержание полярных ксантофиллов (17,2-21,6 % Σ КР) у *P. protococcoides*, в) преимущественное запасание АСТ в форме диацильных эфиров у *B. minor* (38,7-42,3% Σ КР), г) необычно высокое содержание (23,6-31,8 % от суммы) свободных форм астаксантина и адониксантина у водорослей семейства Scenedesmaceae (*S. rubescens* и *P. protococcoides*).

– технологически значимый выход липидов из литра исходной культуры, варьирующий в зависимости от вида и условий индукции ВКРГ в пределах 187-329 мг·л⁻¹·сут⁻¹

Практическое значение полученных результатов. Полученные результаты позволяют определить направление и метод поиска перспективных для массового культивирования продуцентов природных кетокаротиноидов, а именно - скрининг обитателей мелких пересыхающих водоемов, аэрофильных и эдафофильных видов из порядков Scenedesmales и Volvocales по унифицированной схеме двухстадийной накопительной культуры. Сведения об общих закономерностях и особенностях вторичного каротиногенеза у видов разной таксономической и экологической специализации и апробированные

варианты двухстадийной культуры могут быть использованы при разработке научных основ массового культивирования зелёных микроводорослей для получения природных кетокаротиноидов группы астаксантина

Личный вклад соискателя. Работы по таксономической идентификации объектов исследования (определению нуклеотидной последовательности ядерного гена, кодирующего малую субъединицу рибосомальной РНК), их коллекционному хранению на агаризованных средах, основной комплекс экспериментальных работ (постановка 5 многовариантных опытов, определение морфологических и физиологических критериев функционального состояния водорослей в условиях экспериментальной индукции ВКРГ: численности и размеров клеток, содержания в них хлорофиллов а и б, суммарных каротиноидов и их отдельных фракций, содержания белка и липидов в культурах и биомассе водорослей), анализ и обобщение полученных результатов выполнены автором самостоятельно.

В процессе работы над диссертацией консультативную помощь автору оказывали: научный руководитель к. б. н., с. н. с. ИНБЮМ Г. С. Минюк, д. б. н., зав. кафедрой ботаники Киевского национального университета им. Т. Шевченко (КНУ) И. Ю. Костиков, доцент КНУ В. Р. Бойко, зав. лабораторией микропланктона ИнБЮМ к. б. н., с. н. с. В. С. Муханов. Практическую помощь в определении концентрации биогенных элементов в среде, содержания сухого вещества в культурах и содержания углеводов в биомассе оказывали сотрудники отдела физиологии животных и биохимии ИнБЮМ н.с., к.б.н. И. В. Дробецкая и м.н.с. И. Н. Чубчикова. Участие коллег в исследованиях отражено в совместных публикациях. Права соавторов публикаций не нарушены.

Апробация результатов исследований. Результаты исследования представлены на 8 международных и региональных конференциях: Международной научной конференции "Каразинские естественнонаучные студии" (Харьков, 1-4 февраля 2011 г.), VII Международной научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus - 2011» (Севастополь, 24-27 мая 2011 г.), XIII съезде

Украинского ботанического общества (Львов, 19-23 сентября 2011г.), IV Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Киев, 23-25 мая 2012 г.), XII конференции молодых ученых «Научные, прикладные и образовательные аспекты физиологии, генетики, биотехнологии растений и микроорганизмов» (Киев, 14-16 ноября 2012 г.), IX Международной научной конференции студентов и аспирантов, приуроченной к 150-летию со дня рождения академика В. Вернадского (Львов, 16-19 апреля 2013 г.), Международной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы ботаники та экологии» (Щёлкино, 18-22 июня 2013 г.), Международной научной конференции «Физиология и биотехнология оксигенных фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее» (Москва, 27-30 мая 2014).

Материалы диссертации докладывались на семинарах и годовых отчетах аспирантов в отделах физиологии животных и биохимии и аквакультуры и морской фармакологии ИнБЮМ (2009 - 2014 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ (четыре без соавторов), из которых: 8 статей в специализированных научных изданиях, рекомендованных ВАК, 10 работ в сборниках статей, материалах и тезисах региональных и международных конференций.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю, кандидату биологических наук, старшему научному сотруднику отдела физиологии животных и биохимии Г. С. Минюк за теоретическое руководство и практическую помощь в анализе полученных материалов, д. б. н., профессору И. Ю. Костикову за предоставленные для выполнения работы штаммы микроводорослей из коллекции АСКУ и консультации по вопросам таксономии зелёных микроводорослей, зав. лабораторией микропланктона ИнБЮМ НАНУ к. б. н., с. н. с. В. С. Муханову за помощь при освоении метода проточной цитометрии, к. б. н., доценту КНУ им. Т. Шевченко В. Р. Бойко за помощь при освоении метода ПЦР, сотрудникам отдела физиологии животных и

биохимии ИнБЮМ н. с., к. б. н. И.В. Дробецкой и м. н. с. И. Н. Чубчиковой за моральную поддержку и практическую помощь в проведении экспериментов.

РАЗДЕЛ 1

ВТОРИЧНЫЙ КАРОТИНОГЕНЕЗ КАК МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ И ЭВРИБИОНТНЫХ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ К АБИОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ.

1.1. Определение понятия «вторичный каротиногенез» и распространение этого явления у микроводорослей разных таксонов и экологических групп

Вторичный каротиногенез (ВКРГ) – один из ключевых физиолого-биохимических механизмов адаптации эврибионтных и экстремофильных видов микроводорослей к резкому ухудшению условий внешней среды, проявляющийся в массивном накоплении в липидных включениях цитоплазмы или хромопластов специфических (вторичных) каротиноидов (ВКР), отличных по структуре и функциональным свойствам от фотосинтетических (первичных) каротиноидов (ПКР), локализованных в тилакоидных мембранах хлоропластов [30, 56, 147, 215].

Наиболее широко ВКРГ распространен у эврибионтных или факультативно экстремофильных микроводорослей – обитателей временных, пересыхающих в летнее время водоемов, аэрофильных и эдафофильных видов, переживающих неблагоприятные периоды годового цикла или экстремально резкие колебания факторов внешней среды в стадии покоя. Характерной чертой их биологии является «эфемерность» вегетации и способность быстро переходить из состояния покоя к активной жизнедеятельности и наоборот [2, 7, 15]. Лабильность обмена веществ и наличие мощных физиолого-биохимических механизмов адаптации к абиотическому стрессу (включая синтез ВКР и немембранных липидов) определяют повсеместное распространение этой группы водорослей [29, 30, 147].

Значительно реже явление ВКРГ встречается у облигатных экстремофилов, постоянно населяющих биотопы, непригодные для других водорослей. Наиболее яркими примерами таких видов являются галофильная микроводоросль *Dunaliella salina* [53, 88, 128, 173, 203, 219] и криофильный обитатель антарктических ледников и высокогорных снежников *Chlamydomonas nivalis* [78, 95].

В настоящее время в литературе имеются сведения о наличии ВКРГ у нескольких десятков видов микроводорослей, принадлежащих к трём отделам: Chlorophyta, Euglenophyta и Eustigmatophyta. Наибольшее число продуцентов ВКР зарегистрировано в отделе Chlorophyta (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Водоросли-продуценты вторичных каротинодов

Виды микроводорослей	Литературный источник
CHLOROPHYTA	
1	2
<i>Ankistrodesmus ammaloides</i> , <i>A. braunii</i> , <i>A. densus</i> , <i>A. falcatusi</i> , <i>A. nannoselene</i> , <i>A. stipitatus</i>	80, 165
<i>Bracteococcus sp.</i> , <i>B. grandis</i> , <i>B. medium</i> , <i>B. pseudominor</i> ,	165
<i>Botryococcus braunii</i>	112
<i>Chlorella emersonii</i> , <i>C. fusca var. fusca</i> , <i>C. fusca var. rubescens</i> , <i>C. zofingiensis</i>	38, 40, 80, 132, 158, 165, 179, 183, 188,
<i>Chlorococcum infusionum</i> , <i>C. multinucleatum</i> , <i>C. sp.</i> , <i>C. oleofaciens</i>	67, 80, 153, 157, 220
<i>Chromochloris cinnabarina</i>	80
<i>Coelastrella striolata var. multistriata</i> , <i>C. proboscideum</i>	37, 80
<i>Crucigenia apiculata</i>	80
<i>Dictiococcus cinnabarium</i>	80
<i>Eremosphaera viridis</i>	188
<i>Gloecoccus bavaricus</i>	80

Продолжение таблицы 1.1

1	2
<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	80
<i>Monoraphidium sp.</i>	134
<i>Neochloris wimmeri</i>	188
<i>Protosiphon botryoides</i>	188
<i>Pleurasrum sarcinoideum</i>	165
<i>Scenedesmus acutiformis</i> , <i>S. acuminatus</i> , <i>S. basiliensis</i> , <i>S. dimorfus</i> , <i>S. dispar</i> , <i>S. komarekii</i> , <i>S. longus</i> , <i>S. naegeli</i> , <i>S. obliquus</i> , <i>S. quadricauda</i> , <i>S. vacuolatus</i>	73, 80, 120
<i>Scotiellopsis oocystoformis</i> , <i>S. rubescens</i>	73, 165, 188
<i>Chlanydomonas nivalis</i>	95
<i>Haematococcus pluviialis</i>	55, 110, 111, 140
<i>Neochloris wimmery</i>	188
EUGLENOPHYTA	
<i>Euglena pedunculata</i> , <i>Euglena sanguinea</i> , <i>E. rubida</i>	7, 19, 104
<i>Trachelomonas volvocina</i>	118, 147
EUSTIGMATOPHYTA	
<i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>N. salina</i> , <i>N. oculata</i>	45, 170

Достаточно обширный, и вместе с тем весьма разрозненный фактический материал, характеризующий ВКРГ у отдельных представителей филогенетически и экологически удаленных групп, полученный к тому же при разных экспериментальных условиях, нередко дает неопределенную и даже противоречивую информацию для анализа и систематизации литературных сведений по данной проблеме. Задача существенно осложняется отсутствием общепринятой классификации отдела Chlorophyta, отражающей реальные родственные связи между таксонами. Внедрение в альгологию электронно-микроскопических и молекулярно-генетических методов исследования привело к радикальному пересмотру его структуры и, что особенно важно в данном

контексте, к установлению гетерогенности класса Chlorophyceae, наиболее богатого продуцентами ВКР [8, 22, 27, 73, 165]. В результате одни и те же виды в классических (морфолого-онтогенетических) и современных (цитологических и молекулярных) системах оказываются на различных ветвях филогенетического древа Chlorophyta, что затрудняет оценку роли генетических факторов в формировании особенностей ВКРГ у водорослей. Решению этой проблемы в наибольшей степени соответствует классификация Chlorophyta, предложенная проф. Киевского национального университета И. Ю. Костиковым и сотр., базирующаяся на молекулярно-генетической основе, и одновременно с этим использующая в качестве одного из фенотипических признаков высокого ранга способность микроводорослей к синтезу ВКР [8]. Эта система четко очерчивает границы распространения продуцентов ВКР в рамках отдела Chlorophyta тремя классами – Chlorophyceae, Ulvophyceae и Trebouxiophyceae (рис. 1.1А) [8]. Подавляющее большинство водорослей, способных к ВКРГ, принадлежит к двум эволюционным линиям класса Chlorophyceae, идущим от *Chlamydomonas applanata* (порядки Volvocales, Chaetophorales, Protosiphonales) и *Ch. lobulata* (Scenedesmales) (рис. 1.1Б). Причём в порядке Scenedesmales виды, накапливающие ВКР при стрессе, выявлены во всех семействах (рис. 1.1В) [8, 33, 37, 59, 80, 119, 165, 188].

В отделе Euglenophyta наиболее ярким примером продуцентов ВКР является *Euglena sanguinea*, вызывающая «красные цветения» в мелких эвтрофированных водоёмах в жаркое время года [19, 104]. Такое «цветение» наблюдалось в окрестностях г. Севастополя в мае 2006 г. Водное зеркало небольшого искусственного озерца на протяжении двух недель было покрыто слизистой нейстонной пленкой ярко-красного цвета со специфическим запахом, образованной практически одним видом – *E. sanguinea*. Концентрация её клеток в пленке составила $47,4 \cdot 10^7$ кл·м⁻², а содержание АСТ в клетках – $560,5 \pm 35,2$ пг·кл⁻¹ [19]. Как правило, в сапробных водоёмах *E. sanguinea* сопутствует еще одна эвгленовая микроводоросль – *Trachelomonas volvocina* – также, способная к синтезу ВКР [118, 147].

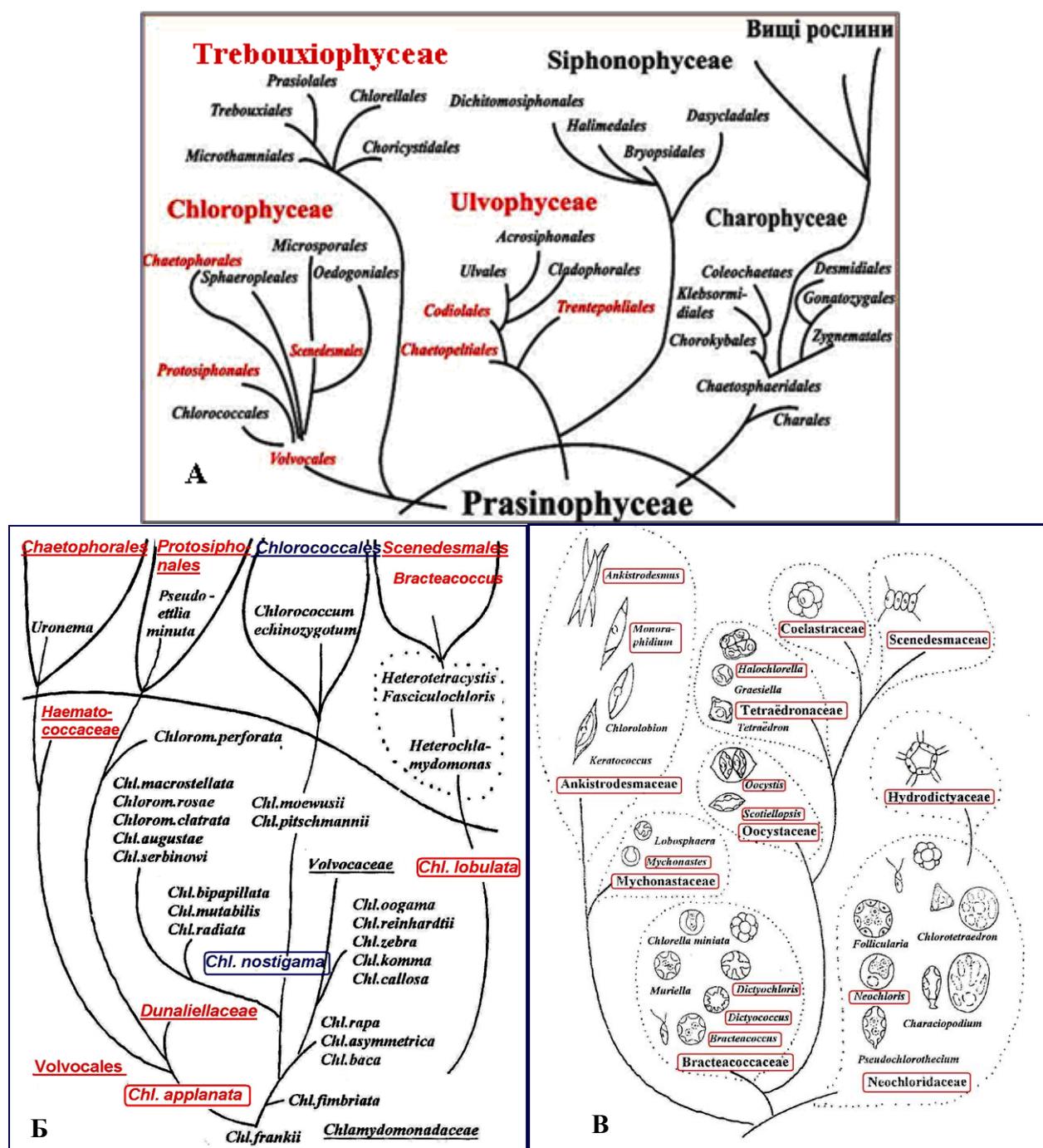


Рис. 1.1 Распространение вторичного каротиногенеза в системе Chlorophyta на уровне классов (А), порядков (Б) и семейств порядка Scenedesmales по [8]

Наличие ВКР в условиях голодания и высокой освещенности показано и для некоторых видов рода *Nannochloropsis* (*N. gaditana* и *N. salina*) [45, 170, 201]. В настоящее время этот род является пока единственным примером морских видов вообще и Eustigmatophyta в частности, способных к ВКРГ.

1.2. Локализация, состав, биосинтез и физико-химические свойства вторичных каротиноидов.

По данным световой и электронной микроскопии у подавляющего большинства микроводорослей ВКР аккумулируются вне хлоропластов в цитоплазматических липидных везикулах. Окрашенные везикулы первоначально регистрируются у разных видов или в перинуклеарном пространстве, или на периферии клетки, а затем распределяются по всему объему, полностью маскируя окраску хлорофилла [109, 120, 146, 220]. Липидные глобулы, по всей вероятности, имеют цитоплазматическое происхождение, так как во фракции полярных липидов, выделенных из изолированных везикул зелёной микроводоросли *H. pluvialis*, обнаружены только липиды, специфичные для цитоплазматических мембран и полностью отсутствует маркерный липид мембран хлоропластов - моногалактозилдиацилглицерол [109]. В отдельных случаях, например, у *D. salina* и *C. zofingiensis*, вторичные каротиноиды накапливаются в строме хлоропластов, постепенно модифицирующихся в хромопласт-подобные структуры, лишённые тилакоидных мембран, а также во внутреннем гидрофобном слое наружной клеточной мембраны [53, 183].

По химической природе ВКР микроводорослей, за редким исключением, являются C_{40} -кетокаротиноидами (ККР) – окисленными производными β -каротина, содержащими в β -иононовых циклах одну или две кето-группы при C_4 и/или C_4' . Их состав формируется в ходе метаболического пути синтеза АСТ из β -каротина (БК), детально изученного на примере *H. pluvialis* [97, 102, 109, 111, 123, 147] (рис. 1.2). В серии блестящих работ К. Grunewald и сотр. было показано, что начальные звенья биосинтеза АСТ – синтез изопентенилпирофосфата (IPP), образование из него фитоина и трансформация последнего в β -каротин путем последовательной десатурации и β -циклизации – протекают в хлоропластах [109, 110].

Причем у одноклеточных Chlorophyta IPP синтезируется, как у высших растений, из 1-дезоксид-Д-ксилозулозо-5-фосфата (DOX-P путь) а, не в ходе мевалонового пути, как у цианобактерий и микроводорослей других отделов [84, 109, 151]. Следующий этап – IPP → БК – также протекает в хлоропластах и аналогичен биосинтезу каротиноидов у других окисленных фототрофов [46, 159]. Формирование конечных продуктов – кетокаротиноидов – происходит в липидных включениях цитоплазмы из БК путем введения кетогрупп в β-иононовые циклы в положение С-4 и/или С-4' (стадия катализируется β-каротиноксигеназой CRTO, ВКТ) и гидроксирования кольца по С-3 и С-3' по действием β-каротингидроксилазы (CRTR-b) [77, 111, 152]. При этом БК, не синтезируется в липидных включениях, а транспортируется в них из хлоропластов, как и ферменты, катализирующие заключительные этапы биосинтеза АСТ. [109, 110]. Последовательность введения кето- и гидроксигрупп в β-циклы зависит как от видовой специфичности ферментов, катализирующих этот процесс, так и физико-химической природы стресс-воздействия [118, 147]. Считается, что у *H. pluvialis* введение кетогрупп в β-иононовые кольца предшествует их гидроксированию, так как ВКТ у этой водоросли не способна использовать в качестве субстрата зеаксантин [103, 156, 147]. У *S. zoofingiensis* ВКТ не только осуществляет конвертацию БК в кантанксантин (КАН) через эхиненон (ЭХ), но и катализирует образование адониксантина (АДК) и АСТ из зеаксантина. Причем второй путь является доминирующим и опосредован наличием у *S. zoofingiensis* трёх видов ВКТ, специфичных по отношению к разным субстратам [118, 133]. У *Chlorococcum* sp. одновременно функционируют 5 путей синтеза АСТ: 1) БК → ЭХ → КАН → АДР → АСТ; 2) БК → ЭХ → 3'-ГОЭХ (3'-гидроксиэхиненон) → АДР → АСТ; 3) БК → ЭХ → 3'-ГОЭХ → АДК → АСТ; 4) БК → БКРК (β-криптоксантин) → 3'-ГОЭХ → АДР → АСТ; 5) БК → БКРК → 3'-ГОЭХ → АДР → АСТ, и ни один из них не является главным [153]. Такая поливариантность биосинтеза и определяет, по всей вероятности, различия в составе ВКР у разных видов и его варибельность у отдельных продуцентов в зависимости от условий среды. У некоторых видов,

например *H. pluviialis* и *E. sanguinea*, АСТ является практически единственным ККР, составляющим 80-90% Σ КР, экстрагируемых из биомассы [13, 19, 55, 90, 97, 110, 111, 210]. Из трех возможных энантиомеров астаксантина водоросли синтезируют главным образом 3S,3'S-изомер, который депонируется в клетках в виде моно- и диацильных эфиров [111]. Моноэфиры представлены обычно одной-двумя, а диэфиры – тремя-четырьмя фракциями, различающимися по полярности в зависимости от структуры жирных кислот, образующих сложноэфирную связь ($C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{18:3}$). Соотношение ди-/моноэфиры увеличивается по мере накопления ВКР и, возможно, зависит от индивидуальных особенностей штаммов [13, 22, 55, 111, 147].

У некоторых видов, например у *C. zofingiensis*, *C. emersonii*, *Chlorococcum* spp, *Coelastrella striolata* var. *multistriata*, *S. komarekii* и *Neosporangiococcum* spp. в составе ККР преобладает КАН [37, 40, 67, 179, 183]. У *C. zofingiensis* и *C. striolata* его содержание может достигать 84-96% от суммы КР [179, 183]. У других видов, таких как *Chlorococcum* sp. и *Botryococcus braunii*, наряду с КАН (24-38%) и АСТ (7-12%) зарегистрировано значительное количество таких промежуточных метаболитов как 3'-ГОЭХ (13-28%), АДК (3-9% у *Chlorococcum* и 42% у *Botryococcus*) и АДР (9-17%) [67, 71, 200].

У отдельных видов Chlorophyceae ферменты синтеза АСТ отсутствуют (*Dunaliella salina*, *Trentepohlia aurea*) и в качестве ВКР в пластоглобулах хлоропластов накапливается БК [53]. В данном обзоре, посвященном ВКРГ у продуцентов АСТ, они рассматриваться не будут.

Общие физико-химические свойства каротиноидов детально описаны в ряде крупных обзоров, монографий и учебных пособий [3,57, 62-64, 149]. Поэтому в данном разделе будут кратко освещены лишь некоторые специфические свойства ККР, определяющиеся особенностями их структуры, наиболее важные для характеристики фракционного состава и функциональной роли ВКР у микроводорослей.

Как и другие терпеноиды, ККР нерастворимы в воде, но хорошо растворимы во многих органических растворителях (хлороформе, бензоле,

гексане, петролейном эфире, четыреххлористом водороде и др.). Гидроксильированные по С3,С3' каротиноиды лучше растворяются в спиртах (метанол, этанол). Растворы всех ККР в органических растворителях имеют характеристические полосы поглощения в видимой области спектра, а стереоизомеры – дополнительные максимумы в ультрафиолетовой области. Абсорбционные спектры ККР существенно отличаются от спектров фотосинтетических КР, имеющих специфическую трехпиковую структуру с четкими узкими максимумами и типичным для каждого пигмента отношением величин второго и третьего максимумов поглощения. Наличие при С4/С4' одной или двух кето-групп приводит к увеличению системы π -связей в молекулах ККР, утрате тонкой структуры спектра, существенному батохромному сдвигу максимума в спектре и, как следствие, к изменению цвета пигментов с жёлтого на оранжево-красный (рис. 1.3) [3, 198].

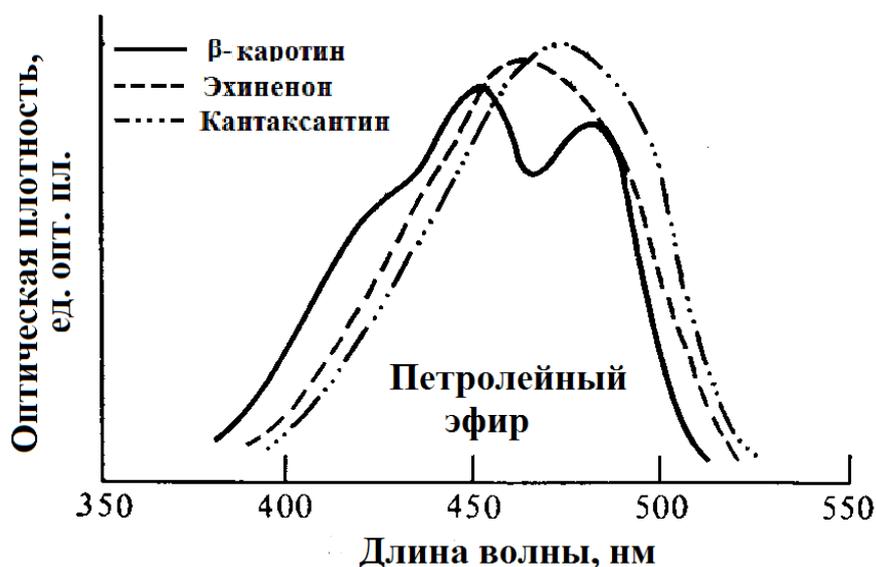


Рис. 1.3 Влияние карбонильных групп при С4/С4' на спектры поглощения в петролейном эфире эхинонена (одна группа С=О) и кантаксантина (две группы С=О) по [3]

Причем в спектре ККР с одной кето-группой обычно наблюдается «плечо»

в области центрального максимума β -каротина. Фракции таких ККР имеют оранжево-красноватый цвет после разделения на пластинах для ТСХ. Появление второй кето-группы полностью сглаживает спектр и сдвигает максимум в область 479-480 нм. При этом цвет пигмента приобретает малиново-красный оттенок. Особенно наглядно такие изменения видны при сравнении спектров АДК и АСТ (рис. 1.4).

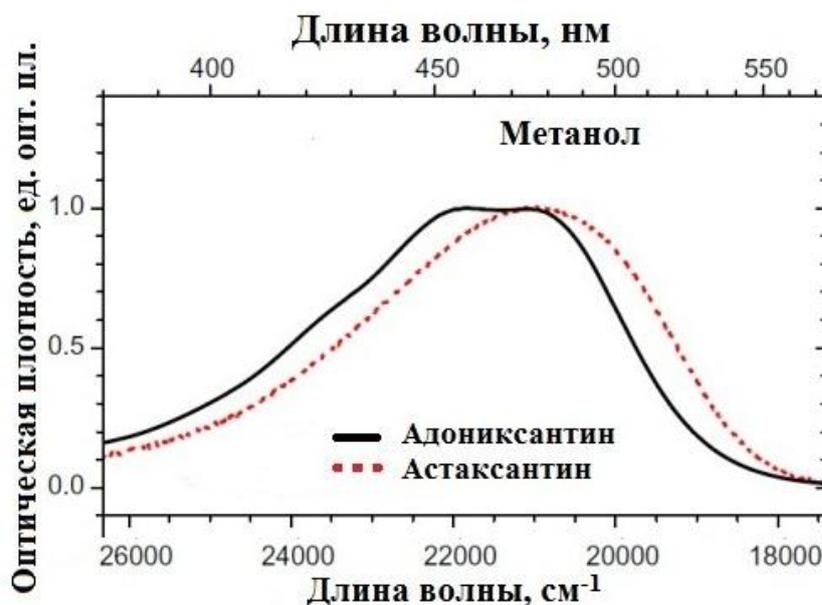


Рис. 1.4 Спектры поглощения кетокаротиноидов атаксантина и адониксантина в метаноле по [100]

Считается, что другие заместители в β -цикле (в том числе и ОН-группа, при С3,С3') оказывают незначительное влияние на спектр поглощения ККР либо не оказывают его вовсе [147, 196]. Из этого правила, однако, есть исключение. По данным [191], при введении гидроксигруппы в молекулу эхиненона (образование 3-гидросиэхиненона) максимум поглощения в гексане сдвигается с 460 до 452 нм.

Восстановление кето-группы при помощи боргидрида натрия приводит к реверсии тонкой структуры спектра и гипсохромному сдвигу максимума (рис. 1.5) [138, 196, 171]. Эта реакция является качественной на все ККР группы АСТ.

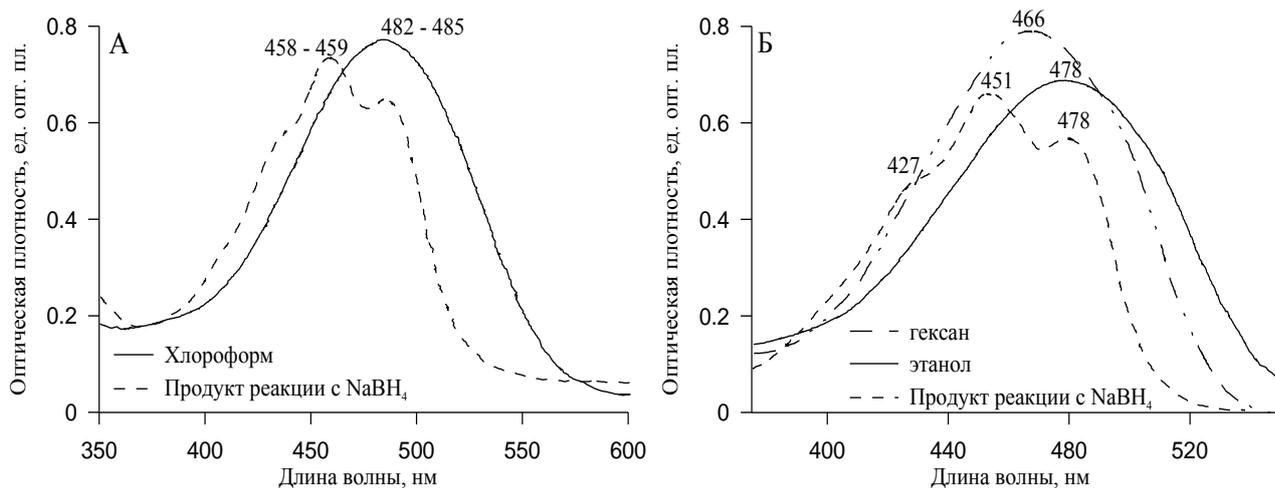


Рис. 1.5 Видимые спектры поглощения астаксантина (А) и кантаксантина (Б) и продуктов их восстановления после реакции с боргидридом натрия [138, 171]

На максимум поглощения в спектрах ККР существенное влияние оказывает природа растворителя (рис. 1.6).

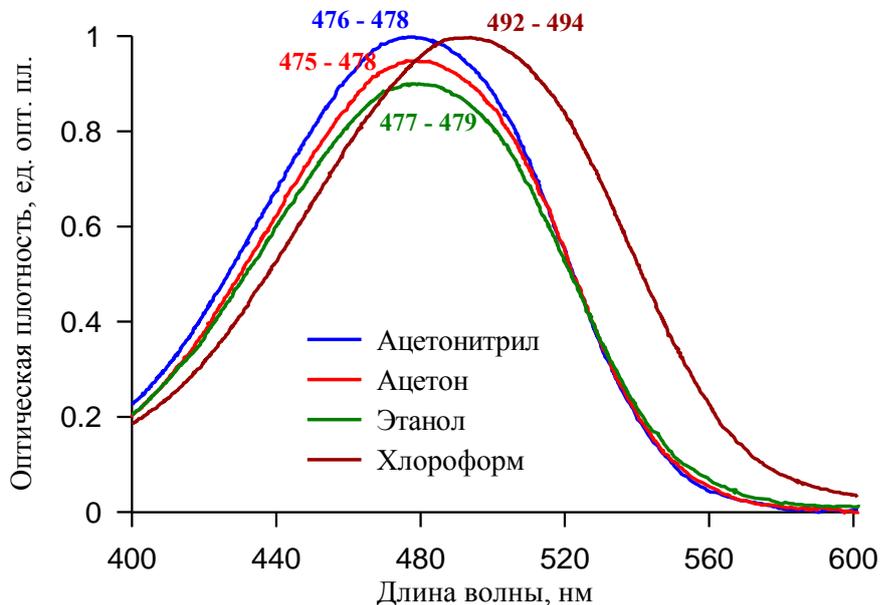


Рис. 1.6 Абсорбционные спектры кетокаротиноида астаксантина в различных органических растворителях [211]

В ароматических или галогенированных растворителях максимумы могут

сдвигаться в длинноволновую область на 15-20 нм, причем величины этого сдвига при смене растворителя у разных ККР не совпадают. Эта особенность нередко используется в качестве дополнительного критерия при идентификации ККР [3]. С этой целью проводят сравнительный анализ абсорбционных спектров ККР в трех-четырех растворителях, из которых наиболее часто используют гексан, ацетон, бензол и этанол [153, 191, 196]. Сводная таблица величин максимумов поглощения β -каротина и кетокаротиноидов группы астаксантина в 4-х растворителях, составленная по данным разных авторов, полученным в разные годы приведена ниже (табл. 1.1).

Характерной особенностью ККР является более высокая устойчивость по отношению к агрессивным факторам среды (солнечному свету, кислороду, температуре, кислотам, щелочам и пр.), по сравнению с ключевыми ПКР Chlorophyceae – БК и лютеином [3, 63, 64].

Важной составляющей ВКРГ у микроводорослей является накопление липидов, представленных главным образом, триацилглицеринами (ТАГ). Их доля в суммарных липидах может достигать 95%. В жирнокислотном составе ТАГ доминируют олеиновая (до 40% от суммы), пальмитиновая и линолевая кислоты. Биосинтез астаксантина и олеиновой кислоты связаны линейно. Не исключено, что в условиях дефицита элементов питания, уровень определенных интермедиатов биосинтеза липидов может служить сигналом для запуска вторичного каротиногенеза [22, 29, 39, 56, 173, 201, 217, 219].

Максимумы поглощения каротиноидов в различных растворителях

Название	Максимумы поглощения, λmax			
	ацетон	гексан	бензол	этанол
1	2	3	4	5
β-каротин	(429), 454, 480 [124], (427), 452, 478 [64], (428), 453, 482 [44], 452, 479 [191] ,	(425), 451, 477 [124] , (425), 450, 477 [64] , 451, 489 [191],	(435), 462, 487 [64] 463, 489 [191]	(428), 451, 480 [117] 450, 476 [64]
Эхиненон	456 [211] 459-460 (475) [197] 462 [191]	458(482) [64] 453 [62] 460 [191]	470 [64] 472 [62, 191]	461 [64] 453 - 461 [197] 466 [101]
Кантаксантин	468 [91] 472 [191] 460 [211]	462 [62] 467 [191]	-	474 [62] 476 [155] 474-477[197]
3'-гидрокси- эхиненон	459 (471) [112] 458 (475) [125] 463 [191] 464 [44]	450 (470) [125] 452 [191] 456 [197]	465 [191] 469 [218] 472 [197]	460-462 [197]

Продолжение таблицы 1.2

1	2	3	4	5
Адоирубин	474 [44, 191]	466-468 [79] 471 [161] 462 [191]	483 [218, 62] 482 [191] 482 [70]	477[62, 202]
Адониксантин	479[191]	459-460 [202] 462 [161] 465 [101]	470 (487) [145] 472 [62] 468 [191]	465[62]
Астаксантин	475 [111] 477 [191] 478 [211] 480 [62]	466-467 [69] 468 [145] 472 [191]	484 [191] 485 [64]	478 [64] 479 [211]

1.3. Функциональная роль биосинтеза астаксантина в адаптациях микроводорослей к действию повреждающих факторов среды

Главными внешними абиотическими факторами, вызывающими образование активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, индукцию ВКРГ у микроводорослей, являются дефицит питания, экстремально высокая освещённость, температура, солёность, влиянию которых посвящено значительное количество работ [56, 62, 147, 183, 219]. Долгое время шла дискуссия, какой из факторов является ключевым. Было показано, что биосинтез ККР у микроводорослей активизирует увеличение освещённости в сочетании с дефицитом азота [55, 73, 110, 120, 129, 153, 158, 170, 183, 188, 210, 220], введением в среду органического углерода (ацетата и малоната натрия, аспарагина, глюкозы и др.) [6, 66, 89, 129], гидрокарбоната натрия [137], повышением температуры до 28 - 35⁰ С [96, 220] и солёности до 0,1-1 % [6, 55, 73, 121]. В качестве самостоятельного индуктора, свет, по всей вероятности, может выступать лишь при плотностях светового потока >1500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$, вызывающих фотодеструкцию клеточных мембран АФК и свободными радикалами [193]. Способность *H. pluvialis* и *C. zoofingiensis* активно синтезировать АСТ в условиях гетеротрофного роста на ацетате натрия и глюкозе также указывает на то, что свет не является необходимым условием индукции ВКРГ [87, 89, 132, 137]. Внесение ацетата натрия позволяет увеличить скорость накопления и максимальный уровень АСТ у *H. pluvialis* в расчёте на клетку и сухое вещество как минимум в 2 - 3 раза, однако массовая гибель клеток гематококкуса в постстрессорный период нивелирует данное преимущество [13]. Механизм индукции ВКРГ ацетатом до конца не ясен. С одной стороны, ацетат через Ацетил-КоА включается в энергетический и конструктивный метаболизм клеток водорослей, обеспечивая энергией и углеродом сопряжённые между собой синтезы КР, липидов и углеводов. С другой – высокие концентрации ацетата ингибируют фотосинтез, вызывают массовую гибель клеток и неизбежно предшествующий ей окислительный

стресс. Внесение в питательные среды вместе с ацетатом соединений - «ловушек» свободных радикалов, полностью блокирует синтез АСТ у *H. pluvialis* [127]. Практически все ключевые факторы внешней среды при интенсивности, близкой к пределам толерантности видов, могут быть индукторами ВКРГ. Такая универсальность ответа на разные условия указывает на наличие общего механизма его индукции.

В последние годы было установлено, что биосинтез ВКР может запускаться многими химическими соединениями генераторами АФК и свободных радикалов (H_2O_2 , метилвиологеном, Fe^{+2} , метиленовым синим и др.) [47, 131, 141, 157]. Современные представления о функциональной роли биосинтеза АСТ наиболее чётко сформулированы в [118, 147]. Она состоит в снижении концентрации внутриклеточного молекулярного кислорода (как субстрата для образования АФК) двумя путями: 1) использования кислорода для образования молекул АСТ и 2) восстановления кислорода до H_2O за счёт оттока электронов десатуразной и фотосинтетической электрон-транспортной цепей с пластохинонового пула на пластидную терминальную оксидазу [76]. Показано, что эфиры АСТ нейтрализуют такие АФК, как супероксид анион-радикалы (O_2^-) и синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) [116, 142, 166]. Предполагается также, что молекулы АСТ выступают в качестве «зонтика» для уменьшения проникновения синего света в хлоропласты, снижая тем самым фотоокислительное повреждение фотосистем [115]. АСТ может служить физико-химическим барьером для защиты ДНК, РНК, ферментов и мембранных липидов от АФК [115, 142, 166]. Синтез триацилглицеридов и жирных кислот, необходимых для эстерификации молекул астаксантина также служит стоком электронов при фотоокислительном стрессе. Y. Li и соавт. [76] предположили, что биосинтез астаксантина является полифункциональным защитным механизмом от фотоокислительного стресса (рис. 1.7).

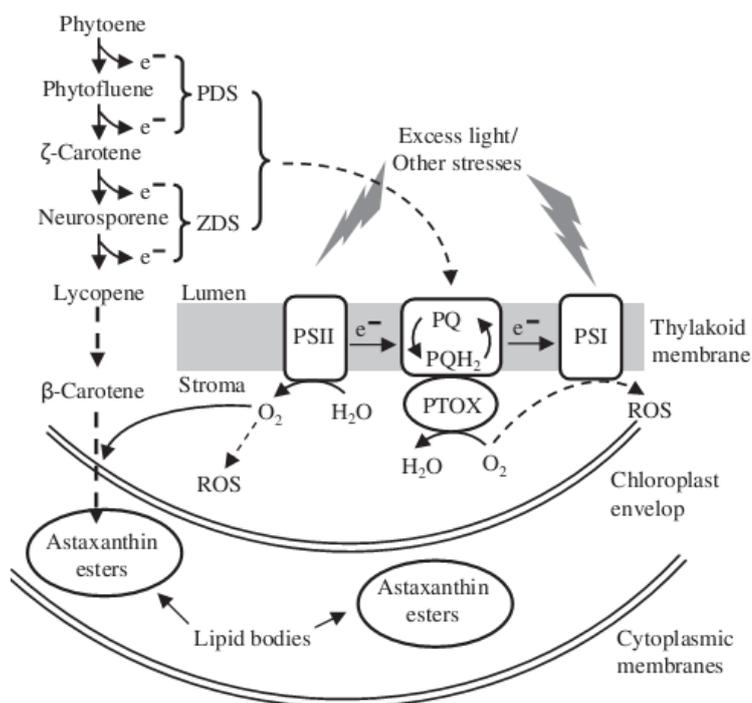


Рис. 1.7 Полифункциональная роль биосинтеза астаксантина в адаптациях микроводорослей к окислительному стрессу [76]

1.4. Биологическая активность астаксантина и их использование в различных сферах экономики

Кетокаротиноид астаксантин – 3,3'-дигидрокси-β,β-каротин-4,4'-дион – проявляет свойства полифункционального биологически активного соединения, оказывающее мощное положительное воздействие на организм человека и животных. Интерес к исследованию его биологической ценности и перспектив использования в различных сферах экономики растет год от года. За период 2000-2014 гг. только в библиографической базе «Google scholar» зареферировано около десяти тысяч научных работ (включая патенты), посвященных этим проблемам. Результаты исследований обобщены в ряде широко цитируемых обзоров, анализирующих эффективность использования каротиноида в профилактике и лечении обширной группы заболеваний человека и животных, а также для замедления старения [88, 113, 122, 139, 164,

185, 193, 215]. К ним относятся: различные виды рака (фибросаркома, лейкоз, рак желудка, молочной железы, предстательной железы, печени); хронические воспалительные заболевания (сепсис, ревматоидный артрит); метаболические синдромы (астма, сахарный диабет); сердечно-сосудистые заболевания (гипертония, атеросклероз, инфаркт, инсульт); желудочно-кишечные заболевания (гастрит, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки); заболевания печени (жировая дистрофия, гепатит, повреждения ксенобиотиками); нейродегенеративные заболевания (рассеянный склероз, болезни Паркинсона и Альцгеймера); заболевания глаз (катаракта, глаукома, конъюнктивиты); кожные заболевания (ожоги, повреждения УФ-излучением, рак кожи) и др. [49-52, 72, 82, 108, 113, 139, 162, 163, 178, 185, 205, 222].

В основе широкого спектра физиологического действия АСТ на организм человека и животных лежит его исключительно высокая антиоксидантная активность (АОА). По этому признаку АСТ превосходит широко используемые в медицине БК, лютеин, ликопен и α -токоферол как минимум, на порядок [168, 176]. Такое существенное преимущество опосредовано тремя главными факторами:

- синергизмом действия C_{40} -изопреноидной цепи, выполняющей функцию «тушителя» синглетного кислорода, и 3,3'-гидроксогрупп, участвующих в инактивировании свободных радикалов;
- спецификой локализации АСТ в мембранах – поперечной ориентацией амфифильной молекулы одновременно в гидрофобных и гидрофильных областях мембран, обеспечивающей регуляцию проницаемости и механической прочности мембран, их защиту от свободно-радикальной атаки и транспорт алкоксильных радикалов вдоль полиеновой цепи к границе раздела фаз, где гидрофильные частицы инактивируются водорастворимыми АО (рис. 1.8);
- способностью АСТ проникать через гемато-энцефалический барьер и участвовать в регуляции интенсивности ПОЛ в клетках мозга [118, 147, 176, 139, 185].

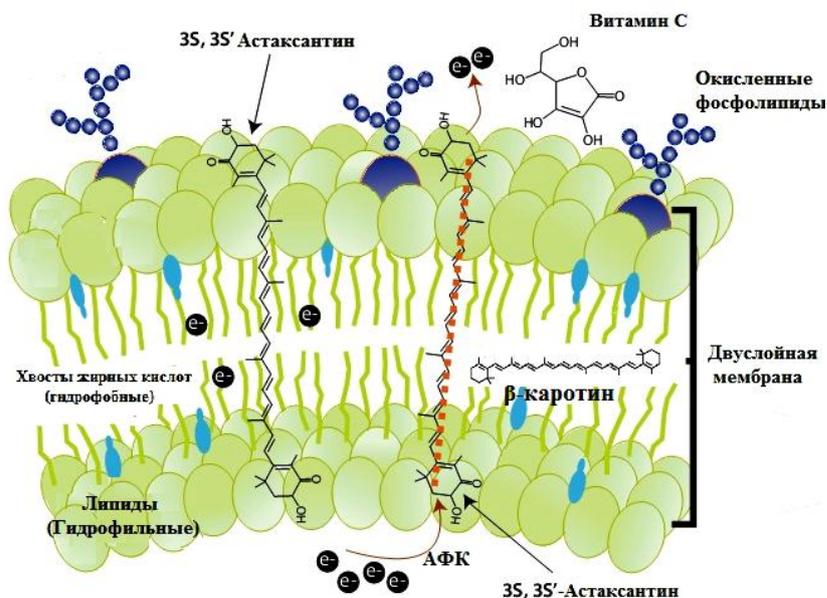


Рис. 1.8 Расположение каротиноидов в клеточной мембране по [178]

Традиционной и наиболее ёмкой областью применения АСТ является аквакультура лососевых рыб (форели, лосося, сёмги) и ракообразных (креветок, омаров, лобстеров), где он является незаменимым ингредиентом кормов, определяющим нормальный метаморфоз и выживаемость личинок, устойчивость к болезням взрослых особей, окраску их мышечных тканей и наружных покровов, и в конечном итоге, товарный вид и потребительские свойства морепродуктов [52, 88, 154, 164, 171, 184, 212].

В последние годы к перспективным областям использования АСТ относят производство нутрицевтиков и продуктов функционального питания для повышения иммунитета, замедления старения и профилактики хронических заболеваний, в этиологии которых присутствует окислительный стресс [88, 113, 122, 139, 185, 215]. Коммерческая целесообразность этого направления очевидна – в 2013 г. по экспертным оценкам («Global Industry Analytics Inc.» и «Business Communication Co.») объём продаж природного АСТ для производства БАД не превышал 40 млн US\$, а годовой объём продаж изготовленных из него продуктов был многократно выше (в 30 раз) и составил 1,2 млрд US\$. Активный интерес к АСТ проявляют специалисты

масложировой, молочной и кондитерской промышленности, где он может быть использован для улучшения цвета и продления сроков хранения растительных и животных масел, спредов, майонезов, йогуртов, мороженого, кондитерских кремов и т.п. Новой и также коммерчески привлекательной сферой использования АСТ является космецевтика – производство косметических продуктов с лечебно-профилактическим действием [88, 164, 185, 215].

1.5. Двухстадийная накопительная культура как метод исследования вторичного каротиногенеза у микроводорослей и скрининга новых коммерчески перспективных продуцентов астаксантина

Двухстадийная накопительная культура (ДСНК) является одной из модификаций метода двухфазного проточного культивирования микроводорослей, предложенного в конце 60-х годов В. Семененко и Л. Цоглиным для непрерывного выращивания водорослей с «заданным» химическим составом биомассы [26]. Авторская система культивирования состояла из двух последовательно включенных фотореакторов. В одном из них создавали условия для оптимального деления клеток, во втором – условия с действием фактора, управляющего скоростью биосинтеза целевого продукта. По достижению заданной плотности культуры в реакторе I, часть суспензии переливали в реактор II, и культуру подвергали действию факторов, интенсифицирующих биосинтез получаемого вещества. В культиватор I доливали свежую среду и продолжали процесс выращивания в полупроточном режиме. Скорость потока и объём реактора II рассчитывали, исходя из двух основных условий: необходимости поддержания культуры в культиваторе I на стадии линейного роста и достижения желаемой концентрации конечного продукта в реакторе II в максимально короткий срок [34]. В начале 90-х гг. идея двухфазного культивирования водорослей для была успешно использована М. Kobayashi и сотр. в исследованиях зелёной микроводоросли *N. pluvialis* как перспективного продуцента АСТ [140, 141]. Авторы сохранили основной

принцип метода – создание оптимальных условий среды для каждой из двух противоположных по своей сути стадий культивирования водоросли, но при этом отказались от полупроточного режима и на обеих стадиях использовали метод периодической культуры. В этом варианте водоросли сначала культивируют в накопительном режиме при условиях, благоприятных для деления клеток (вегетативная или «зелёная» стадия), а затем подвергают резкому стресс-воздействию, приводящему к индукции биосинтеза АСТ, образованию стадий покоя (спор или цист) и массивному накоплению в последних ККР («красная» стадия). Метод получил название «двухстадийной накопительной культуры» («two-stage batch culture»), в отличие от «одностадийной культуры» («one-step culture»), при которой ВКР синтезируются в вегетативных делящихся клетках [23, 194]. Эта терминология была принята специалистами и в настоящее время широко используется в научной литературе [56, 174, 210]. Причем понятие «двухстадийная накопительная культура» подразумевает не число технологических звеньев в процессе культивирования, а число стадий жизненного цикла, которые водоросли проходят за этот период [140].

Эффективность указанного методического подхода к исследованию ВКРГ у экстремофильных видов привлекает многих исследователей, так как он позволяет получить в одном эксперименте за сравнительно короткое время (15-20 сут.) данные по ключевым физиолого-биохимическим характеристикам продуцентов ККР: скорости нелимитированного условиями среды роста, морфо-физиологическим особенностям перехода вегетативных клеток в стадию покоя, специфике состава ВКР, динамике метаболических процессов, сопряженных с развитием ВКРГ и др. [13, 27, 28, 33, 38, 56, 140, 174, 210]. Пополнение массива информации по этим вопросам важно не только для углубления представлений о физиолого-биохимических механизмах адаптации обитателей экологически проблемных биотопов, но и для оценки перспективности использования отдельных видов для промышленного получения природных ККР.

Главной проблемой при сравнительном анализе литературных данных, полученных методом ДСНК, является плохая сопоставимость экспериментальных материалов, приводимых разными авторами, так как большинство из них, приняв идеологию ДСНК, используют в своей работе разные практические методы и приемы ее реализации (штаммы разного происхождения, питательные среды разного состава, существенно различающаяся освещённость, способы индукции ВКРГ и методы физиолого-биохимического анализа биомассы и др.). Поэтому одной из методических задач данной работы была разработка, унифицированной схемы ДСНК, применимой к водорослям различной таксономической принадлежности и экологической специализации.

РАЗДЕЛ 2

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Штаммы микроводорослей и условия культивирования

2.1.1. Происхождение использованных в работе штаммов микроводорослей

Объектом исследования служили 4 вида микроводорослей из двух массовых порядков Chlorophyceae – Volvocales (*Ettlia carotinos*) и Scenedesmales Kostikov (*Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova 1931, *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, et al. 1997 и *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov et Mamkaeva 1974). Указанные порядки представляют две эволюционно удаленные линии Chlorophyceae (линии *Chlamydomonas applanata* и *C. lobulata*) в пределах которых ВКРГ распространен наиболее широко [8]. Дополнительными критериями выбора микроводорослей служили: эволюционная близость *E. carotinos* к *H. pluvialis* (общепризнанному модельному объекту в исследованиях ВКРГ), принадлежность сценедесмальных микроводорослей к разным семействам и экологическим группам, особый статус *P. protococcoides* как единственного представителя редкого рода.

E. carotinos Komárek 1989 штамм Mainx (АСКУ 573-06) была получена в мае 2009 г. из коллекции кафедры ботаники Киевского национального университета им. Т. Шевченко (КНУ) [18], куда она, в свою очередь поступила из коллекции Гёттингенского университета, Германия (= SAG 213-4). Штамм выделен из почвы в бывшей Чехословакии. Дата выделения неизвестна. По последовательности нуклеотидов в ядерном гене, кодирующем 18S рРНК, штамм на 99 % идентичен *Haematococcus* sp. (штамм KORD103, рег. № в Генбанке FJ877140). Характеризуется ярко-красной окраской стареющих агаризованных культур.

B. minor (Chodat) Petrová 1931 (*Bracteacoccaceae*) штамм Chodat (АСКУ 506-06 = SAG 221-1= UTEX 66) поступил также из коллекции КНУ [18]. Рег. № в Генбанке JF 717398.1.

Chlamydomonas reinhardtii Dangeard штамм Gromov (IPPAS D-292) поступил в ИнБЮМ в 2007 году из коллекции Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН как мутант штамма, выделенного Б. В. Громовым в 1967 г на полуострове Камчатка из налёта на берегу термального озера [9, 17].

P. protococcoides Gromov et Mamkaeva 1974 (*Scenedesmaceae*) штамм Gromov (CALU-221) был передан в ИнБЮМ в 2006 году из коллекции культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического Института Санкт-Петербургского университета. Штамм выделен проф. Б. В. Громовым в 1962 году в окрестностях Севастополя [106].

2.1.2. Методы и условия выращивания микроводорослей

Штаммы микроводорослей хранили на агаризованной (1,5 %) среде BBM в модифицированной бытовой холодильной витрине «Snaige», оснащённой дополнительным терморегулятором RTC-85.26 «MENRED» (Китай) и лампами подсветки «Feron» САВ1В 8W Т4 (Россия) (рис. 2.1), при освещённости 2000 лк и температуре (Т) 13-15° С. Пересев культур проводили по графику через каждые 2-3 месяца в зависимости от скорости роста разных видов на агаризованной среде BBM.

Общий вид установки для культивирования микроводорослей в колбах малого объёма (100-500 дм³), обеспечивающей стабильность условий культивирования представлен на рис 2.2. Объем культур в конических стеклянных колбах составлял 50-400 дм³. Подачу воздуха в систему осуществляли с помощью воздушного компрессора Resun АСО-9630 (рис 2.3Д) и силиконовых шлангов TetraTec АН 50-400 (рис. 2.3И). Для контроля за постоянством скорости воздушного потока компрессор соединяли с ротаметром РМ-02-0,4 ГУЗ (рис 2.3 З). Во избежание контаминации культур в систему

после ротаметра включали «стерилизационный блок», состоящий из двух последовательно соединенных склянок Дрекслея (рис. 2.3 К), одна из которых на $\frac{1}{4}$ была заполнена 1% раствором перманганата калия, а вторая оставалась пустой и выполняла функцию ловушки для воздушно-капельной дисперсии перманганата. Этой же цели служили врезанные в шланги стеклянные соединительные трубки, заполненные стерильной ватой. После очистки воздух поступал в смеситель (колбу Бунзена), где смешивался с CO_2 (0,3-0,7% CO_2 v/v, подаваемым из газового баллона (рис. 2.3А), и далее через разветвитель («гребёнку»), снабженный двухходовыми винтовыми кранами Trixie (рис 2.3 Г) по силиконовым шлангам TetraTec AN 50-400 (рис. 2.3 И) – в колбы.



Рис. 2.1 Хранение штаммов микроводорослей



Рис. 2.2 Общий вид установки для культивирования микроводорослей в стеклянных колбах объёмом 100 мл



Рис. 2.3 Составляющие элементы установки для лабораторного культивирования микроводорослей

Подачу углекислого газа регулировали газовым редуктором УРП-4-2ДМ (рис. 2.3 Б) и электромагнитным клапаном Camozzi A7E (рис. 2.3 В), соединенным с рН-контроллером Aqua Medic рН 2001 (рис. 2.3 Е). Для визуального контроля за поступлением CO_2 использовали капельницу от системы переливания крови, заполненную до половины водой (рис 2.3 Л).

Система освещения представляла собой световые решетки, состоящие из 6 люминесцентных светильников «Feron CAB2» или «Feron CAB28» с лампами дневного света «Feron» DL 20W (28 W) T4 G5 6400 К (рис 2.3 М). Для создания резкого положительного градиента освещённости на «красной» стадии культивирования, с противоположной стороны колб устанавливали вторую решётку. Перегревание культур предотвращали путём кондиционирования воздуха в помещении и охлаждения поверхности ламп потоками воздуха от двух вентиляторов, расположенных по краям системы. Продолжительность световой фазы на «зелёной стадии» устанавливали при помощи таймера «Feron» TM22 (рис 2.1В). В работе использовали модифицированные питательные среды BBM [213], CHU-13 [217], ОНМ [175] и BG-11 [213] (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Состав питательных сред для лабораторного культивирования зелёных микроводорослей - продуцентов ККР

Реагент	Содержание реагента в среде, мг·л ⁻¹			
	BBM	CHU-13	ОНМ	BG-11
1	2	3	4	5
KNO_3	-	400	410	
NaNO_3	250		-	1500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25	107	110,9	36
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-	20	2,62	6,9
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,98		-	

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75	200	246,5	75
Na_2HPO_4	-		30	
K_2HPO_4	75	80	-	
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$				50,2
KH_2PO_4	175		-	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-		0,85	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		3,67		18
Na_2CO_3				20
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,82	0,44	-	2,22
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,57	0,16	0,012	0,79
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	0,084	0,12	3,9
MoO_3	0,71		-	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	0,11	0,011	0,5
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,49		-	
Cr_2O_3	-		0,076	
SeO_2	-		0,005	
H_3BO_3	11,42	5,72	-	28,6
КОН	31		-	
NaCl	25		-	
Лимонная кислота		100		60
Биотин (вит. Н)	-		0,025	
Витамин В ₁	-		0,018	
Витамин В ₁₂			0,015	
H_2SO_4 (0,072 N)		1 капля		

Для приготовления сред использовали реактивы квалификации х.ч. и ч.д.а. В отдельных экспериментах в их состав вносили изменения в соответствии с

решаемыми задачами.

Водоросли культивировали методом двухстадийной накопительной культуры (ДСНК) [27, 89, 141]. Общая характеристика метода дана в литературном обзоре (с. 36-38). На I, вегетативной или «зелёной» стадии, во всех экспериментах, за исключением эксперимента по подбору питательной среды для *E. carotinos*, использовали универсальную для Chlorophyceae минеральную среду BBM 3N [213]. Перевод культур на II («красную») стадию осуществляли путём резкого изменения условий культивирования: разбавления культуры дистиллированной водой или 10-кратно редуцированной по N и P средой BBM и изменения режима освещения с одностороннего периодического на двухстороннее круглосуточное. Для интенсификации ВКРГ использовали химические промоторы перекисного окисления липидов: ацетат натрия (NaAc), хлорид натрия (NaCl) и смесь FeSO_4 и H_2O_2 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$).

2.2. Молекулярно-генетические методы определения таксономического статуса микроводорослей

Таксономическое положение двух штаммов микроводорослей (IPPAS D-292 и CALU-221) определяли при помощи молекулярно-генетических методов. Выделение ДНК из клеток микроводорослей проводили в соответствии с протоколом выделения ДНК из растений (DNA Microprep Isolation from Plants, http://www.scienceboard.net/resources/protocols.asp?action=article&protocol_id=300&criteria). Амплификацию последовательностей малой субъединицы проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием пары универсальных эукариотических праймеров для 18S рРНК: прямого 1-F (5'- AACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3') и обратного 1528-R (5'- CTTCTGCAGGTTTCACCTAC-3'). Объем амплифицируемой смеси составлял 50 μl . Амплификацию проводили в термоциклере Techne TC 412. Устанавливали следующий температурный профиль реакции: 94 °C - 3 мин, (94 °C - 45 с, 54 °C - 1 мин, 72 °C - 3 мин) - 30 циклов, 72 °C - 5 мин, 4 °C - ∞ [42]. Ампликоны,

полученные в результате ПЦР, визуализировали методом горизонтального электрофореза в 1 % агарозном геле в TBE буфере [58]. Секвенирование амплифицированных последовательностей осуществляли с прямыми (1 -F), (528- F), (1055- F) и обратными праймерами (1055- R), (536- R), (1528 - R) в лаборатории Macrogen Inc. (Нидерланды) (табл. 2.2).

Редактирование и составление консенсусной последовательности проводили путём визуального сопоставления прямой и обратной хроматограмм с помощью программы Chromas (версия 1.45). Составление матрицы и её выравнивание осуществляли с помощью редактора BioEdit и программы CLUSTAL W v 1.75 [207]. Филогенетические деревья строили по методу максимального правдоподобия (Maximal Likelihood, ML), методом ближайших соседей (Neighborhood - Joining, NJ) и методом максимальной парсимонии (Maximum Parsimony, MP) в филогенетической программе PHYLIP 3.69 [99]. Статистическую поддержку филогенетических деревьев в NJ и MP анализах оценивали бутстреп - методом, используя 100 бутстреп - реплик [98].

Таблица 2.2

Последовательности праймеров, использованных для амплификации и секвенирования.

Название праймера	Последовательность
1-F	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'
1528-R	5'-CTTCTGCAGGTTACCTAC-3'
528-F	5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAA-3'
1055-R	5'-ACGGCCATGCACCACCACCA-3'
1055-F	5'-GGTGGTGCATGGCCGTTCTT-3'
536-R	5'-AATTACCGCKGCTGGCA-3'

Условия культивирования водорослей в отдельных экспериментах.

Эксперимент № 1. «Введение в культуру зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos*» (2010 г.). Физико-химические параметры культивирования на

«зелёной» стадии. Водоросль выращивали на модифицированных питательных средах ВВМ [213], CHU-13 [217], ОНМ [175], усиленных по азоту и фосфору в 1,5-5 раз, и BG-11, приготовленной по авторской рецептуре [213] (табл. 2.3).

Таблица 2.3

Содержание азота и фосфора в питательных средах

Питательные среды	Содержание биогенных элементов, мг·л ⁻¹		N/P (молярное отношение)
	азот	фосфор	
ВВМ 3N	123,6	53,2	5,1
CHU-13 мод. 3N-3P	166,3	42,8	8,6
CHU-13 мод. 5N-3P	277,2	42,8	14,3
ОНМ мод. 1,5N-1,5P	85,2	9,8	19,3
BG-11	247,0	27,3	20,0

Остальные параметры культивирования были следующими: стеклянные конические колбы, объемом 0,1 л, объём культуры (V) - 0,07 л, начальная численность клеток (N) $\approx 3 \cdot 10^5$ кл·л⁻¹, освещённость (E) на наружной поверхности колб - 4000 лк, фотопериод -15 ч свет : 9 ч темнота, температура питательной среды - 25°C, скорость продувки суспензии клеток газовой смесью - 108 л·ч⁻¹·л⁻¹ (0,3% CO₂ v/v), продолжительность стадии - 8 сут.

По завершении «зелёной» стадии культуры, полученные на разных средах, объединили и использовали для первичной оценки особенностей ВКРГ у данного вида. Для этого в стеклянные конические колбы объемом 0,5 л внесли по 0,05 л объединённой культуры, 0,3 л дистиллированной воды и несколько капель маточных растворов нитрата и фосфата натрия до концентрации азота (N) и фосфора (P) в среде 5,5 и 1,4 мг·л⁻¹, соответственно. Для интенсификации ВКРГ в каждую колбу добавили раствор ацетата натрия (NaAc) до концентрации 20 мМ. Культуры перевели на круглосуточное двухстороннее освещение, увеличив при

этом Е до 8000 лк с каждой стороны. Скорость продувки и состав газовой смеси оставили без изменений. Температуру среды поддерживали на уровне 25-26 °С при помощи бытового кондиционера и охлаждения поверхности колб направленным потоком воздуха, создаваемым вентилятором.

Эксперимент № 2. «Оценка влияния природы химических стрессоров на морфометрические, физиологические и биохимические характеристики *Ettlia carotinos* в условиях экспериментальной индукции вторичного каротиногенеза» (2011 г.).

На I («зелёной») стадии водоросль выращивали методом накопительной культуры в конических колбах на модифицированной среде CHU-13 с увеличенным содержанием N (164,7 мг·л⁻¹) и P (28,2 мг·л⁻¹). Освещённость (лампы «Feron» DL 28W 6400K) постепенно увеличивали (с интервалом в 3 сут) от 1000 до 4000 лк. Скорость продувки культуры воздушно-углекислотной смесью (0,1% CO₂ v/v) составляла 108 л·ч⁻¹·л⁻¹, температура питательной среды - 22-24 °С. При численности клеток 6·10⁵·кл·мл⁻¹ и остаточной концентрации N и P в среде 15,34 мг·л⁻¹ и 1,09 мг·л⁻¹, соответственно, культуру использовали для проведения эксперимента по оценке интенсивности ВКРГ в зависимости от природы химических стресс-агентов. Индукцию ВКРГ в клетках водоросли осуществляли путем разведения культуры дистиллированной водой в 3 раза. Содержание азота в среде составило 4,95 мг·л⁻¹, фосфора - 0,75 мг·л⁻¹. Численность клеток - 1,90·10⁵ кл·мл⁻¹. Активаторы ВКРГ вносили следующим образом: вариант (вар.) № 1 - контроль (без добавок), вар. № 2 - ацетат натрия (NaAc) до 50 мМ (для интенсификации ПОЛ и увеличения отношения C/N), вар. № 3 - хлорид натрия (NaCl) до 200 мМ (для создания осмотического шока), в) вар. № 4 - смесь сульфата железа II и пероксида водорода (Fe²⁺ + H₂O₂) до 0,45 мМ и 10⁻⁴ мМ, соответственно (для увеличения концентрации активных форм кислорода в клетках). Культуры перевели на круглосуточное двухстороннее освещение 8000 лк с каждой стороны. Температуру среды поддерживали в диапазоне 20-21 °С при помощи кондиционирования воздуха в помещении и охлаждения поверхности колб направленным потоком воздуха от вентилятора. Каждый вариант

эксперимента выполняли в трёх биологических и трёх аналитических повторностях.

Эксперименты № 3, 4, 5. «Особенности роста и вторичного каротиногенеза у зелёных микроводорослей порядка *Scenedesmales* Kostikov в условиях двухстадийной культуры» (2012 г.). Режим культивирования микроводорослей *Bracteacoccus minor*, *Scenedesmus rubescens* и *Pseudospongiococcum protococcoides* на обеих стадиях был идентичным. На I («зелёной») стадии продолжительностью 16 сут условия культивирования были следующими: питательная среда BBM 3N, освещённость 7000 лк (лампы «Feron» DL 20W T4 6400K), фотопериод 15 ч свет : 9 ч темнота, температура среды 25-26 °С, скорость продувки газо-воздушной смесью 26,4 л·ч⁻¹·л⁻¹ (0,7 % CO₂ (v/v), объём культур в стеклянных литровых колбах 0,6 л, начальная численность клеток (2,3-2,4)·10⁶ кл·мл⁻¹. Перевод культур на II («красную») стадию продолжительностью 11 сут осуществляли путём 10-кратного разбавления «зелёной» культуры редуцированной по N и P средой BBM (4,12 мг·л⁻¹ N и 5,32 мг·л⁻¹ P) и изменения режима освещения с одностороннего периодического на двухстороннее круглосуточное (по 7000 лк с каждой из сторон). Скорость продувки увеличили до 60 л·ч⁻¹·л⁻¹ во избежание оседания на дно колб красных апланоспор, более тяжёлых, чем зелёные вегетативные клетки. Температуру питательной среды (26 °С) поддерживали при помощи бытового кондиционера и охлаждения колб встречными потоками воздуха от двух вентиляторов. В одном из вариантов эксперимента для интенсификации биосинтеза ККР в среду внесли NaAc до концентрации 0,05 М. Вариант без добавления NaAc служил контролем. Каждый вариант эксперимента выполняли в трёх биологических и трёх аналитических повторностях.

2.3. Методы измерений и анализов

Интенсивность освещения на поверхности культуры регистрировали при помощи люксметра Ю-116, pH среды – при помощи автоматического pH-

контроллера Aqua Medic pH 2001. Температуру среды измеряли ртутным термометром ТТП 0/ 60 °С.

Пробы для анализа плотности культуры и химического состава биомассы получали следующим образом. Ежедневно в одно и то же время объем культуры доводили до метки водой (для компенсации испарения), суспензию тщательно перемешивали и быстро отбирали несколько проб необходимого объёма.

Рост культур водорослей регистрировали методом прямого счёта числа клеток в культурах в камере Горяева (эксперименты № 1, 2) и методом проточной цитометрии (Cytomics TM FC 500 (Beckman Coulter, США, оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером) (эксперименты № 3, 4, 5). Линейные размеры – длину (L) и ширину (D) клеток – устанавливали по микрофотографиям при помощи микроскопа Leica DM-1000, оснащённого цифровой камерой Leica Microsystem AG, и компьютерной программы ImageJ [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]. Объёмы клеток (V) рассчитывали по формуле шара или вытянутого сфероида (при соотношении L/D > 1.03) [4].

Содержание сухого вещества (СВ) в культурах определяли весовым методом на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах «Sartorius» (6, 8 мкм). Фильтры с биомассой дважды промывали дистиллированной водой для удаления солей и высушивали при 100°С до постоянного веса.

Определение содержания белка в биомассе водорослей проводили по методу Лоури в модификации [190], с использованием яичного альбумина (Реахим) в качестве стандарта для построения калибровочного графика. Для извлечения белков сырую биомассу микроводорослей, полученную после центрифугирования 3 мл культуры водорослей, растирали в натрий-фосфатном буфере (PBS-буфере), содержащем 0,15 % дезоксихолата натрия (Sigma). Белки осаждали насыщенным раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Конечная концентрация ТХУ в растворе составляла 5%, время выдерживания проб в темноте - 0,5 ч. Надосадочную жидкость удаляли при помощи центрифугирования (10 минут при скорости 3000 g). Осадок растворяли в 0,5

мл 0,1 н NaOH при нагревании на водяной бане в течение 5 мин. Из полученного раствора отбирали аликвоту 0,2 мл и дальнейший анализ проводили в соответствии с методикой, предложенной Лоури и соавт. [189].

Содержание общих липидов анализировали колориметрическим сульфосфосфо-ванилиновым методом в модификации [41]. Липиды экстрагировали хлороформ-метанольной смесью (2:1). Время сжигания пробы в серной кислоте составляло 20 минут, время развития окрашенного комплекса - 30 мин. В качестве стандарта для построения калибровочного графика использовали оливковое масло первого холодного отжима (Olive Line, Spain), пропущенное через колонку с оксидом алюминия.

Содержание углеводов определяли колориметрическим методом при помощи фенольного и сернокислотного реагентов [199], с использованием глюкозы (Реахим) в качестве стандарта.

Пигменты из сырой биомассы экстрагировали холодным 100 % ацетоном (ОСЧ, ТУ 6-09-3513-86) с добавлением 0,1 % раствора ионола (ВНТ Sigma) [64] путём растирания сырой биомассы микроводорослей с кварцевым песком. Объединённый ацетоновый экстракт упаривали при помощи вакуумного роторного испарителя досуха и растворяли в 0,5 - 1,0 мл 100 % ацетона. Полученную пробу использовали для количественного анализа пигментов.

Содержание хлорофилла *a* (ХЛа), хлорофилла *b* (ХЛb) и суммарных каротиноидов (ΣКР) в экстрактах анализировали спектрофотометрическим методом на СФ 46 (ЛОМО) по Лихтенталеру с использованием уравнений, предложенных для Chlorophyta [150].

$$C \text{ ХЛа} = 11,24D_{661,6} - 2,04 D_{644,8} \quad (1)$$

$$C \text{ ХЛb} = 20,13 D_{644,8} - 4,19 D_{661,6} \quad (2)$$

$$C \Sigma\text{КР} = (1000D_{470} - 1,9 \text{ ХЛа} - 63,14 \text{ ХЛb}) / 214 \quad (3)$$

где $C \text{ ХЛа}$ - концентрация хлорофилла *a*, $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$,

$C \text{ ХЛb}$ - концентрация хлорофилла *b*, $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$,

$C \Sigma KP$ - концентрация суммарных каротиноидов, $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ экстракта

Среднюю скорость накопления ΣKP в расчёте на литр культуры, клетки и единицу объёма клетки рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{\Sigma KP_1 - \Sigma KP}{(t_1 - t)} \quad (4)$$

где V - средняя скорость накопления ΣKP ($\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, $\text{пг} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, $\text{пг} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$),

KP_1 и KP - среднее содержание ΣKP в последние и 0-е сутки «красной» стадии, соответственно ($\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, $\text{пг} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, $\text{пг} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$);

$t_1 - t$ - промежуток времени между определениями, сут.

Фракционный состав ΣKP исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (Россия) и «TLC Silica gel 60» (Merck, Германия) в двух системах растворителей. I - гексан-ацетон 9 : 1, II - гексан-бензол-ацетон 5 : 3,75 : 0,8 [24].

Содержание отдельных фракций каротиноидов в единице объёма культуры рассчитывали по уравнению 5:

$$[KP] = \frac{D_{\lambda_{\text{макс}}} \times V_3 \times V_1 \times 10000}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times V_2 \times V_{\text{культ.}}} \quad (5)$$

где: $[KP]$ - содержание каротиноида в пробе, мкг ,

$D_{\lambda_{\text{макс}}}$ - оптическая плотность элюата каротиноида в 100 % ацетоне в области его характеристического максимума, ед. опт. пл.,

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ - коэффициент удельной экстинкции каротиноида в ацетоне,

V_1 - суммарный объём экстракта, мл ,

V_2 - объём аликвоты, нанесённой на хроматографическую пластину, мл,

V_3 - объём элюата хроматографической фракции, мл.

$V_{\text{культ.}}$ - объём культуры микроводорослей, мл

Идентификацию фракций КР проводили по следующим химическим, спектральным и хроматографическим тестам:

а) наличие и количество кето-групп, конъюгированных с основной полиеновой цепью (по величине гипсохромного сдвига $\lambda_{\text{макс}}$ в абсорбционном спектре после реакции с боргидридом натрия);

б) наличие и количество свободных гидроксогрупп (по изменению коэффициента хроматографической подвижности фракций (R_f) после реакции ацетилирования);

в) наличие сложноэфирных связей по изменению R_f после реакции щелочного гидролиза;

г) идентичность абсорбционных спектров поглощения в диапазоне 400-750 нм в трёх растворителях различной полярности (гексане, бензоле и ацетоне) спектрам КР, приведённым в справочных руководствах по химии КР;

г) совпадение R_f при совместной ТСХ анализируемых фракций со стандартами [57, 63, 64, 149, 182, 196, электронная база данных JCBL «Lipid bank» <http://www.lipidbank.jp>].

Стандарты кетокаротиноидов получали путем экстракции пигментов из свежего материала и выделения отдельных компонентов методом адсорбционной ТСХ с соблюдением всех необходимых при работе с пигментами предосторожностей [63, 64]. Моно- и диэфиры АСТ получали из апланоспор *Haematococcus pluvialis* [64], свободный АСТ – из мышц *Salmon salar* [54], кантаксантин (КАН) - из цист *Artemia salina* [83]. Для расчёта концентрации отдельных КР использовали следующие коэффициенты удельного поглощения в ацетоне: для АСТ = 2177,4 [43], β -каротина - 2500, лютеина - 2550, КАН - 2200, эхиненона - 2200, адониксантина - 2200, адонирубина - 2200 [182].

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программ “Microsoft Excel 10.0” и “Grapher-7” для персонального компьютера. Рассчитывали средние арифметические (\bar{x}) стандартные отклонения (s), ошибки средней арифметической (m), достоверность различий выборочных средних с помощью парного t-критерия (α), коэффициенты детерминации (R^2).

РАЗДЕЛ 3

ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА У КОКОИДНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПОРЯДКА VOLVOCALES НА ПРИМЕРЕ *ETTLIA CAROTINOSA* KOMÁREK 1989.

В настоящем разделе представлены результаты, характеризующие влияние химических активаторов вторичного каротиногенеза (ацетата натрия NaAc, хлорида натрия NaCl и смеси сульфата железа II FeSO₄ и H₂O₂) на динамику численности и размеров клеток, динамику содержания суммарных каротиноидов, фракционный состав вторичных каротиноидов, динамику содержания сухого вещества и его основных компонентов (белка, углеводов и липидов) в культуре и клетках зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* при лабораторном выращивании методом двухстадийной накопительной культуры.

3.1. Особенности введения в лабораторную культуру коллекционного штамма *Ettlia carotinos* АСКУ 573-06

Зелёная микроводоросль *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (= *Neochloris wimmeri* (Hilse) Archibald & Bold 1971) характеризующаяся ярко-красной окраской стареющих агаризованных культур, филогенетически близка к *Haematococcus pluvialis* – «классическому» модельному объекту в исследованиях вторичного каротиногенеза. В настоящее время эволюционная близость родов *Haematococcus* и *Ettlia* (а именно, принадлежность к порядку Volvocales) подтверждена при помощи морфологических, ультраструктурных и молекулярно-генетических методов [1, 204, 216]. Так, по данным Т. Friedl, D. Hepperle (2009) [114], использованный в работе штамм *E. carotinos* (АСКУ 573-06 = SAG 213-4, рег. № в Генбанке GU 292342) по последовательности нуклеотидов в ядерном гене, кодирующем 18S рРНК, на 99 % идентичен

Haematococcus sp. (штамм KORD103, рег. № в Генбанке, NCBI FJ877140). Вместе с тем, *H. pluvialis* и *E. carotinos* существенно различаются между собой по ряду морфо-биологических и эколого-физиологических признаков. Гематококкус - планктонный монадный крупноклеточный вид, населяющий эфемерные пресноводные водоёмы [92, 187]. Этлия же - наземная микроводоросль с более мелкими (в 1,5-2 раза) безжгутиковыми клетками колониально-коккоидного морфотипа [1, 8]. Клетки этлии мононуклеарные, сферические или близкие к сферическим, клеточная оболочка ровная, гладкая, хлоропласт пристеночный с пиреноидом, зооспоры с абсолютной ориентацией по часовой стрелке жгутикового аппарата и тонкой клеточной оболочкой [204, 216], строение которой можно наблюдать только при помощи электронной микроскопии [214].

В 1989 г. J. Komarek, взяв за основу число ядер как генетическую характеристику, вывел из рода *Neochloris* Starr (Chlorococcales, Chlorococcaceae) виды с мононуклеарными вегетативными клетками в новый род *Ettlia* [143] с типовым видом *Ettlia carotinos* Komarek 1989, описанным на основе пражской субкультуры (Praha-As. 93) штамма из Коллекции культур водорослей и простейших Кембриджского университета (№ 213/4) [204].

Штамм выделен из почвы в бывшей Чехословакии. Дата его выделения неизвестна. Судя по историческим сведениям о периоде работы Ф. Майнкса (F. Mainx) в Карлов университете г. Праги (1927-1931 гг.) и по наличию субкультур штамма (= CCAP 213/4 = CCALA E 348 = UTEX 113) в коллекциях, заложенных проф. Е. Принсгеймом (E. Pringsheim) на основе пражского фонда в Кембридже и Гёттингенском университете в начале 40-х и 50-х гг., штамм АСКУ 573-06 к моменту поступления в ИнБЮМ уже более 70 лет поддерживался в коллекциях на твердых органо-минеральных средах при пониженной освещённости, влажности и температуре. Видимо поэтому долгое время нам не удавалось получить активно растущую культуру ни на одной из жидких питательных сред для коллекционного хранения или интенсивного культивирования зелёных микроводорослей (BBM, CHU-13, AF6, BG-11,

ОНМ), приготовленных как по оригинальной рецептуре [175, 213, 217], так и с добавлением органических субстратов (почвенного экстракта, ацетата натрия, глюкозы, гуминовых кислот, пептона, мидийного гидролизата и др.). После пересева с агаровых «косяков» на жидкие среды культуры развивались по сходному сценарию:

а) длительная лаг-фаза (2-4 сут.), сопровождающаяся увеличением размеров и агрегацией клеток в псевдоколониальные (пальмеллоидные) скопления, устойчивые при интенсивном перемешивании и барботаже вследствие прочной иммобилизации клеток на детрите (рис. 3.1 А),

б) слабый непродолжительный рост в течение 2-3 сут. за счёт деления с образованием апланоспор (2 - 4, реже 6 клеток в спорангии), сохранение в центре образующихся дочерних клеток зон, окрашенных в красный цвет каротиноидами, отсутствие размножения зооспорами (рис. 3.1 Б),

в) усиление каротиногенеза, утолщение оболочек и переход клеток в стадию покоя (рис. 3.1 В).

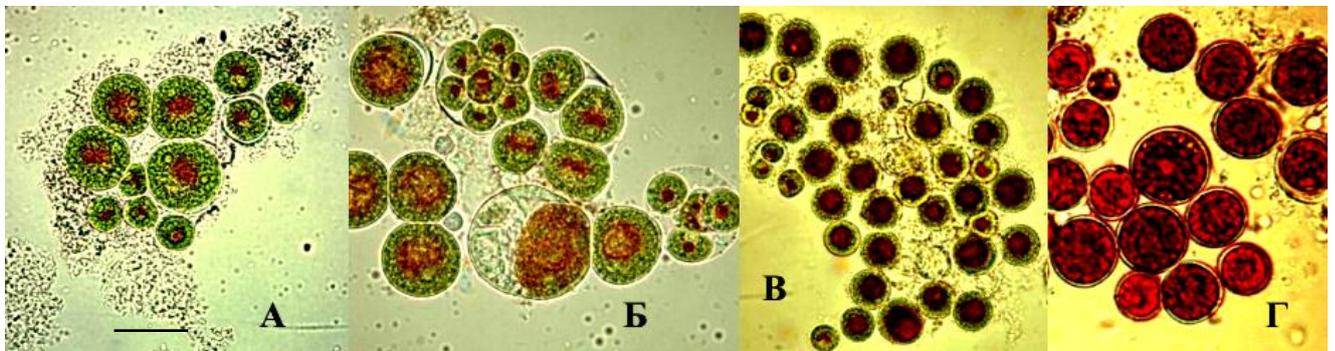


Рис. 3.1 Динамика развития культуры *E. carotinos* при неблагоприятных условиях среды. Масштаб 10 мкм

Только на жидкой среде СНУ-13 в культурах, поддерживавшихся при естественном свете, после многократных пересевов было зарегистрировано активное деление клеток с образованием зооспор (рис. 3.2 В, Г), хотя и в данном варианте как старые, так и молодые клетки на протяжении всего

периода культивирования между посевами сохраняли некоторое количество вторичных каротиноидов. В подвижных зооспорах пигменты, как правило, сосредоточены в апикальной части клетки (рис. 3.2 Г), в недавно осевших округлившись зооспорах и созревающих апланоспорах - вокруг ядра. Увеличение числа зооспор особенно заметно через сутки после разбавления (2:1) стареющих культур водой или редуцированной средой. На среде CHU-13 бедной, как все коллекционные среды, биогенными элементами ($55,4 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1} \text{ N}$ и $14,3 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1} \text{ P}$), но содержащей лимонную кислоту ($100 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) в качестве хелатирующего агента [217], культуры обычно достигали стационарной фазы роста на 5-6-е сут. при максимальной плотности $1 \cdot 10^4 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$.

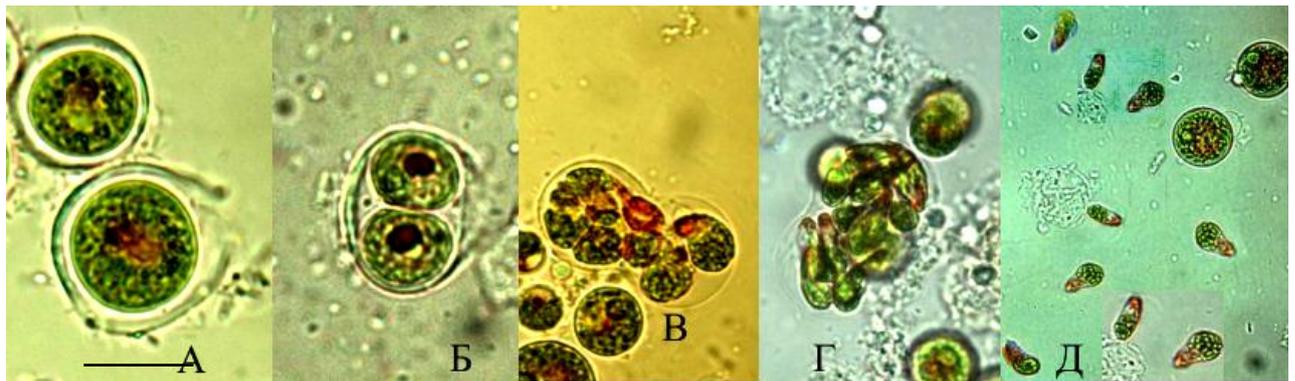


Рис. 3.2 Бесполое размножение *Ectocarpus carotinosa* путём образования неподвижных авто- и апланоспор (А) и подвижных двухжгутиковых зооспор (Б-Д). Шкала 10 мкм

Для определения оптимальных условий питания на I («зелёной») стадии двухстадийной накопительной культуры водоросль *E. carotinosa* выращивали на питательных средах BBM [213], CHU-13 [217], ОНМ [175] и BG-11 [213], усиленных по азоту и фосфору в 1,5-3 раза (табл. 2.3). Характер накопительных кривых на вегетативной стадии (рис. 3.3 А) и данные таблицы 3.1 свидетельствуют о том, что при невысокой освещённости и ограниченном снабжении культур CO_2 увеличение концентрации N в среде

выше $85 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (среда ОНМ) не даёт ощутимых положительных результатов в плане повышения численности клеток в культурах в конце I стадии культивирования. Средние удельные скорости роста *E. carotinos* на разных средах, рассчитанные по *N* и СВ, достоверно не различались и, следовательно, любая из них может с одинаковым успехом быть использована для культивирования реакклимированного штамма Mainx на «зелёной» стадии.

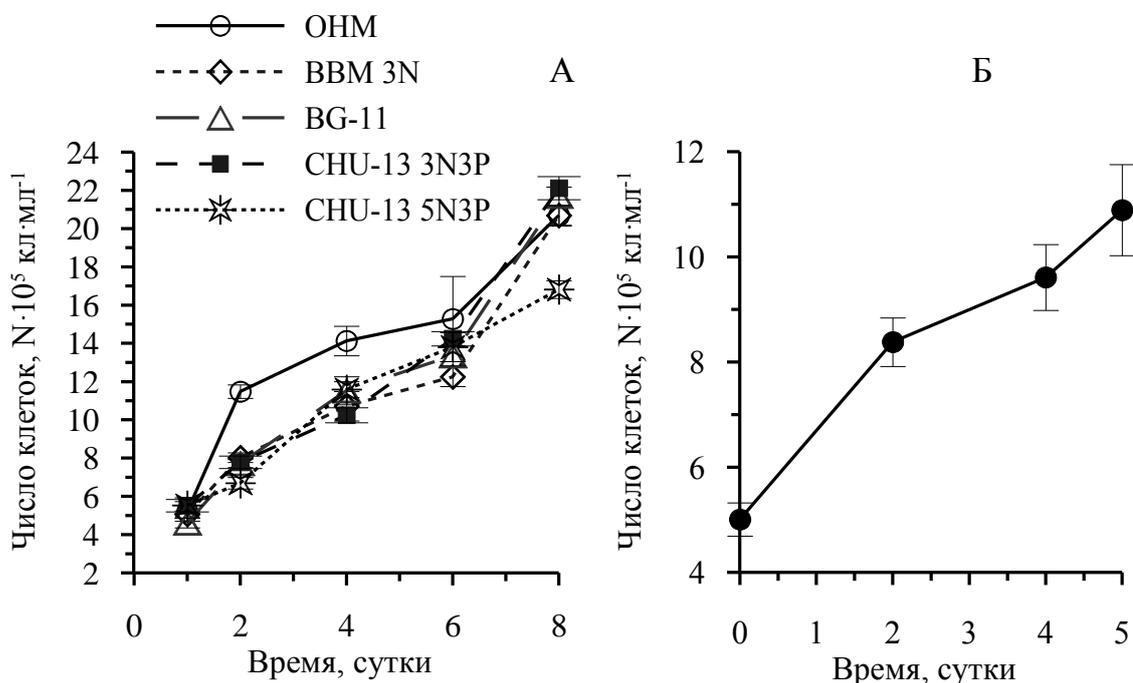


Рис 3.3 Динамика численности клеток в культурах *E. carotinos* на «зелёной» (А) и «красной» (Б) стадиях двухстадийной накопительной культуры ($\bar{x} \pm m$)

Однако, с учётом величин максимальной удельной скорости роста культур (табл. 3.1) и необходимости создания к концу «зелёной» стадии острого дефицита элементов питания (главного фактора индукции ВКРГ), предпочтение следует отдать модифицированной среде ОНМ (1,5N-1,5P), содержащей наиболее низкое из

всех протестированных сред содержание азота (85, 2 мг·л⁻¹) и фосфора (9, 8 мг·л⁻¹) (табл. 2.3).

Таблица 3.1

Ростовые характеристики культур *Ettlia carotinos* в зависимости от состава питательной среды

Показатели роста	Питательные среды				
	ОНМ 1,5N-1,5P	ВВМ 3N	BG-11	CHU13 3N-3P	CHU13 5N-3P
$\mu_{\text{макс}}^*$, сут ⁻¹	0,79±0,03	0,46±0,05	0,52 ±0,06	0,51 ±0,04	0,51 ±0,04
$\mu_{\text{ср}}^*$, сут ⁻¹	0,23±0,04	0,23±0,03	0,22 ±0,03	0,24±0,001	0,20±0,004
$\mu_{\text{ср}}^{**}$, сут ⁻¹	0,25±0,001	0,27±0,007	0,22 ± 0,02	0,27±0,005	0,28 ± 0,01
$R_{\text{ср}}^{**}$, г·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	0,11±0,001	0,13±0,008	0,08±0,008	0,13±0,006	0,14±0,012
$СВ_{\text{макс}}$, г·л ⁻¹	1,02±0,007	1,17±0,064	0,78 ±0,02	1,18±0,041	1,24±0,012

Примечание:

* – расчёт по численности клеток; ** – расчёт по сухому веществу

Принимая во внимание отсутствие литературных сведений о характере стресс-реакции *E. carotinos* на негативные внешние воздействия, в данном эксперименте для индукции ВКРГ был использован «облегчённый» вариант стрессирования культуры по сравнению с методами, использовавшимися при работе с *H. pluvialis* [6, 22]. Из комплекса стресс-факторов исключили наиболее агрессивный агент - NaCl, концентрацию NaAc снизили до 20 мМ, и температуру питательной среды стабилизировали на уровне 25-26 °С.

На протяжении всей «красной» стадии наблюдалось активное деление клеток с образованием аплано- и зооспор, в результате чего численность клеток в культурах этлии на 5-е сут. увеличилась более чем в 2 раза (рис. 3.3 Б). В условиях дефицита питания вновь образовавшиеся клетки останавливались в

росте и средний размер клеток в «красной» культуре уменьшился почти в 1,5 раза (от $8,44 \pm 2,27$ мкм в начале эксперимента до $5,21 \pm 1,36$ мкм в конце). Это отразилось в несоответствии между кратностью прироста содержания Σ КР и сухого вещества в культурах в расчёте на литр и клетку (рис. 3.4 А, Б). Уже через 4 ч после стресс-воздействия культуры изменили цвет с зелёного на бурый, а через 3 сут. приобрели ярко-красную окраску. За 5 сут. содержание суммарных каротиноидов (Σ КР) в расчёте увеличилось в расчёте на литр культуры в 11 раз, в расчёте на клетку \approx в 6 раз (рис. 3.4 А).

Массовая доля Σ КР в сухой биомассе *E. carotinos*, собранной в конце эксперимента, составила $2,3 \pm 0,2$ %, а среднесуточный выход Σ КР из литра исходной культуры *E. carotinos* - около $13 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$. Такой высокий уровень Σ КР уже сам по себе, безотносительно к их фракционному составу, представляет существенный интерес в плане выявления новых видов растительного сырья для получения природных каротиноидов, так как их содержание в красных овощах, фруктах и морепродуктах на 1-2 порядка ниже.

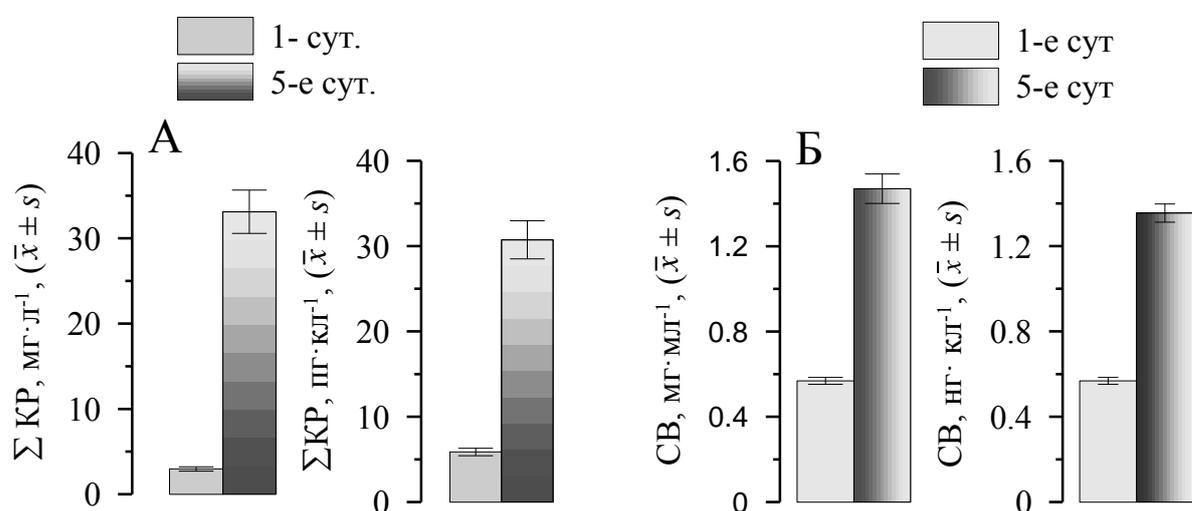


Рис. 3.4 Содержание суммарных каротиноидов (А) и сухого вещества (Б) в расчёте на литр культуры и клетку *E. carotinos* в начале и конце «красной» стадии

Ещё одна важнейшая характеристика *E. carotinos* состоит в том, что в красной биомассе водоросли более 90 % от Σ КР приходится на кетокаротиноиды (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Состав каротиноидов у *Ettlia carotinos* на 5-е сутки «красной» стадии

Наименование фракции каротиноидов	Содержание, % от суммы, ($\bar{x} \pm s$)
Моноэфиры астаксантина	50,78 \pm 0,54
Диэфиры астаксантина	10,92 \pm 0,46
Кантаксантин	10,65 \pm 0,44
Эфиры адонирубина	10,55 \pm 0,11
Сумма неидентифицированных ККР	9,19 \pm 0,73
Сумма первичных каротиноидов (β -каротин, неоксантин, лютеин/зеаксантин, виолаксантин)	6,04 \pm 0,26
Сумма кетокаротиноидов	92,09 \pm 2,28

Доля эфиров АСТ у эттлии составляет немногим более 60% от Σ КР. Помимо этого в составе ККР по результатам химических, хроматографических и спектроскопических тестов [24, 196] были идентифицированы кантаксантин и эфиры адонирубина (примерно по 10 % от Σ КР), которые в зрелых апланоспорах гематококкуса регистрируются лишь в следовых количествах [6, 13, 23].

3.2. Морфологические и физиолого-биохимические особенности реакции *Ettlia carotinos* на действие различных химических стресс-агентов.

Целью исследования была оценка морфологических и физиолого-биохимических характеристик *E. carotinos* при использовании более жёстких приёмов экспериментальной индукции биосинтеза ККР, основанных на внесении в среду химических активаторов ВКРГ в сочетании с увеличением облучённости клеток за счёт снижения их начальной численности. Основные задачи работы состояли в оценке влияния природы химических активаторов ВКРГ (NaAc, NaCl и смеси FeSO₄ и H₂O₂) на динамику численности и размеров клеток, содержания сухого вещества и каротиноидов в культуре, клетках и биомассе водоросли на «красной» стадии двухстадийной накопительной культуры.

3.2.1. Динамика численности и размеров клеток *Ettlia carotinos* в постстрессорный период в зависимости от природы химических активаторов вторичного каротиногенеза.

При исследовании особенностей автотрофного роста *E. carotinos* на различных питательных средах была отмечена высокая фенотипическая и функциональная гетерогенность лабораторных культур этого вида, определяющаяся характером деления клеток. В культуре этлия размножается одновременно при помощи двухжгутиковых зооспор (чаще всего по 8 - 16 в зооспорангии) и апланоспор. В последнем случае из материнской клетки образуются 2 - 6 или 1 апланоспора. Это определяет значительную вариабельность линейных размеров ($L = 4 - 15$ мкм, $D = 3 - 14$ мкм) и объёмов клеток ($V = 27 - 1340$ мкм³). Ещё одна особенность вида (или данного штамма?), отмеченная также [73], состоит в том, что в культурах этой водоросли всегда (даже при достаточном содержании элементов питания в среде) присутствуют вегетативные клетки, содержащие АСТ. В

противоположность этому, в клетках *H. pluvialis* и других продуцентов ККР вторичные каротиноиды появляются только при ухудшении условий среды (прежде всего, при остром дефиците азота) [6, 22, 28, 33, 36]. Основу культуры, полученной в конце «зелёной» стадии составляли агрегированные в скопления или одиночные зелёные клетки среднего размера ($L = 8 - 11$ мкм, $D = 8 - 10$ мкм, $V = 268 - 576$ мкм³) с узким красным кольцом ККР вокруг ядра. Доля таких клеток в общем числе составляла около $\approx 49\%$. Около 20% приходилось на крупные делящиеся клетки с формирующимися внутри них зоо- и апланоспорами ($L = 15 - 16$ мкм, $V = 700 - 1125$ мкм³). Кроме того, в культуре присутствовали подвижные зооспоры (двухжгутиковые клетки грушевидной формы с $L = 5,6 - 16$ мкм), только что осевшие зооспоры (мелкие шаровидные клетки с $L = 3 - 6$ мкм и $V = 30 - 60$ мкм³), молодые растущие вегетативные клетки ($L = 6 - 8$ мкм), а также немногочисленные крупные зрелые апланоспоры, полностью окрашенные ККР в красный цвет ($L = 11 - 13$ мкм и $V = 700 - 900$ мкм³). Такая неоднородность популяции и, в частности, наличие в ней значительного резерва вегетативных клеток, способных быстро перейти к делению, и определила характер адаптивной реакции водоросли на резкое изменение комплекса ключевых факторов внешней среды на «красной» стадии культивирования. Несмотря на достаточно жёсткое стресс-воздействие, численность клеток во всех культурах не только не снизилась (как это регистрировалось в экспериментах с *H. pluvialis* и эдафотфильными видами из других порядков в сходных условиях [28, 33, 36]), но и заметно увеличилась к концу «красной стадии» в вар. № 1, 2 и 4 (рис. 3.5 А).

В культуре клетки на протяжении первых 3-х суток размножались как зооспорами, так и апланоспорами. В последующие дни при углублении дефицита питания наблюдалось только деление с образованием апланоспор. При этом ККР, содержащиеся в материнских клетках, распределялись между дочерними клетками. В зооспорах они концентрировались преимущественно в апикальной части вблизи жгутиков и реже (при делении полностью красных клеток) распределялись по всему объёму. В апланоспорах ККР были

локализованы, как и у *H. pluvialis* [22], сначала в виде красного кольца в перинуклеарной зоне цитоплазмы, а затем равномерно распределялись по всей клетке. Необходимо отметить, что, несмотря на положительную динамику численности клеток в культурах с активаторами ВКРГ, все они угнетали спорогенез, и численность клеток в вариантах с добавками химических стрессоров на протяжении всего периода наблюдений была ниже, чем в контроле. Наиболее ярко это проявилось в культурах, подвергнутых солевому стрессу (вар. 3), где активизация деления была отмечена только на 6-е сутки, когда все клетки были уже красными. Характерной особенностью культур, подвергнутых воздействию NaCl, было отсутствие в них размножения зооспорами и более высокая степень агрегации клеток в хлопьевидные скопления.

Активный спорогенез, продолжавшийся в течение всей «красной» стадии, привёл к существенному уменьшению размеров клеток этлии во всех вариантах эксперимента (в 1,8- 6,8 раза) (рис. 3.6).

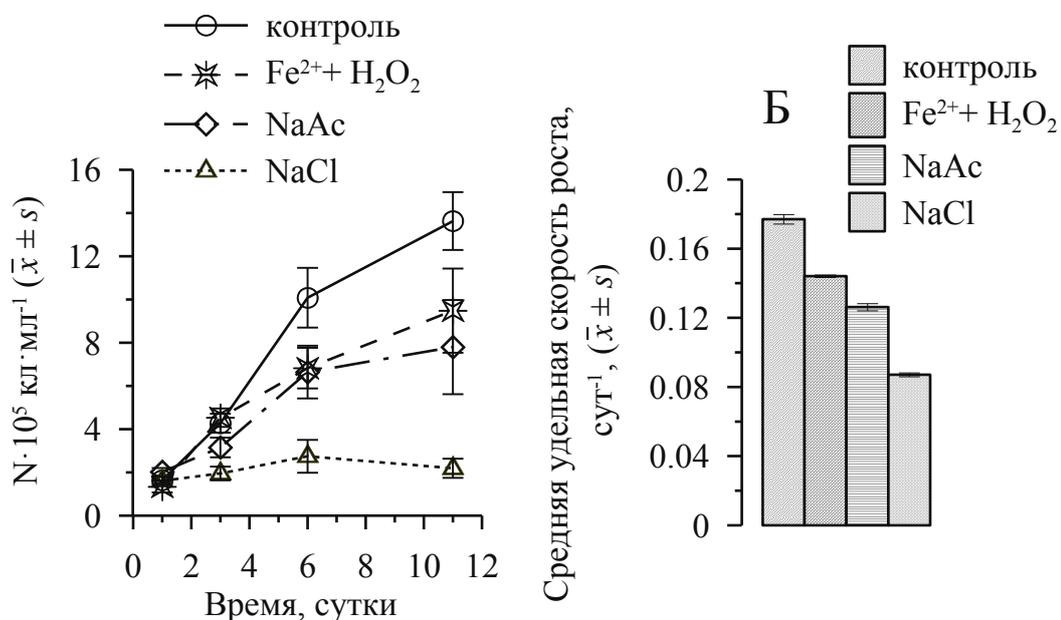


Рис. 3.5 Динамика численности клеток (А) и средняя удельная скорость роста (Б) культур *Ettlia carotinosa* на «красной» стадии культивирования в зависимости от химической природы стресс-агентов

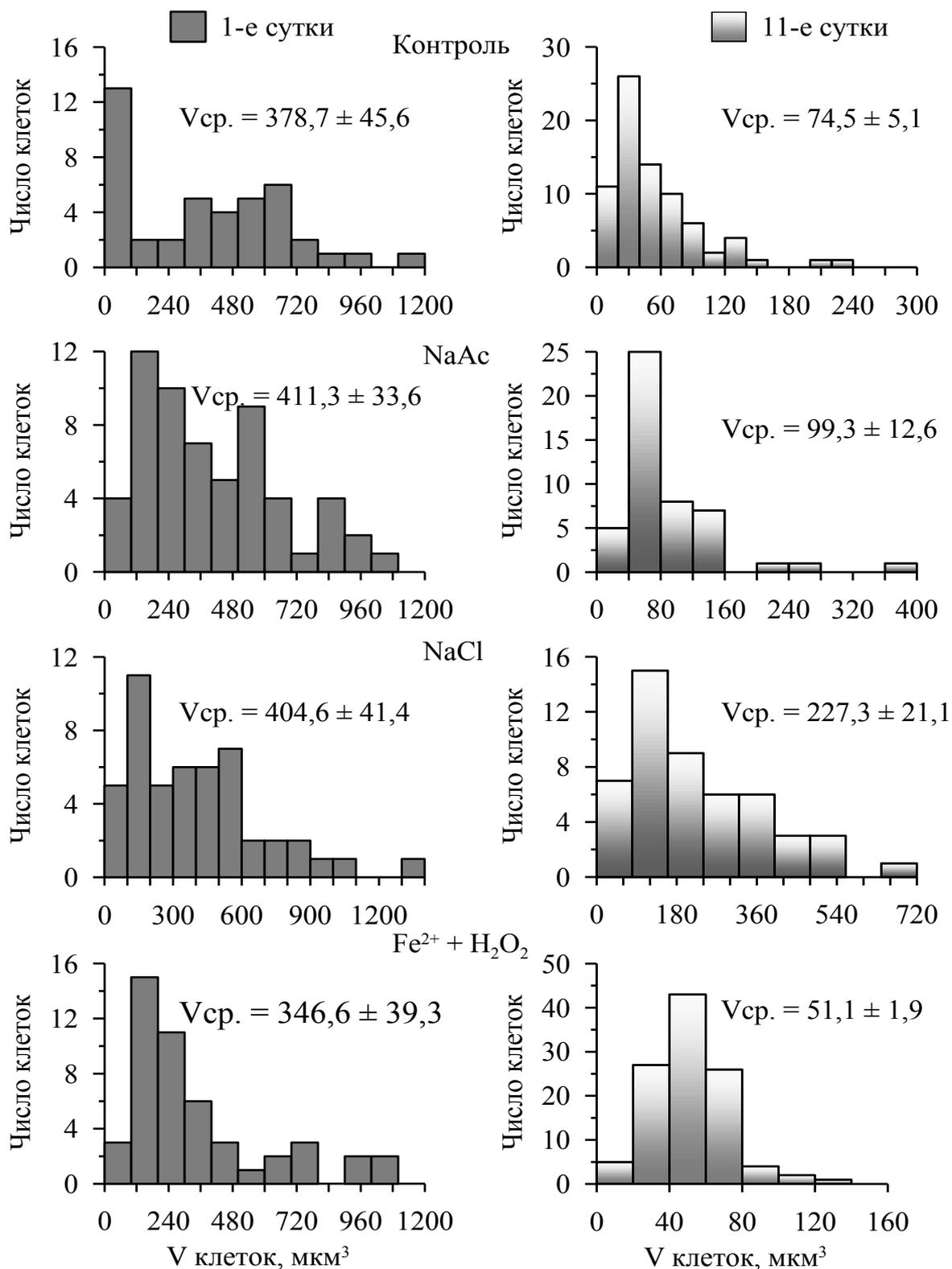


Рис. 3.6 Гистограммы распределения клеток *E. carotinos* по объёму в 1-е и 11-е сутки «красной» стадии в зависимости от природы химических стресс-агентов

3.2.2. Динамика содержания суммарных каротиноидов и их фракционного состава в культурах, клетках и биомассе *E. carotinos*

Высокая устойчивость водоросли *E. carotinos* к используемым моделям экспериментального стресса в общем плане может быть объяснена с позиции гипотезы о наличии положительной связи между степенью гетерогенности природных и лабораторных популяций микроводорослей и их выносливостью по отношению к повреждающим факторам среды [10, 11]. Конкретизация этих представлений применительно к *E. carotinos* предполагает особое внимание к факту наличия в исходной культуре значительного пула вегетативных клеток, защищённых ККР от неконтролируемого развития окислительного стресса. Подтверждением тому могут быть данные, полученные в экспериментах с *N. pluvialis*. При стрессировании функционально однородной культуры этого вида, состоящей из вегетативных монадных клеток, не содержащих ККР, смертность достигала 80 %, в то время как в гетерогенных культурах, включающих помимо монад неподвижные пальмеллы (еще зелёные, но уже с увеличенным отношением КР/ХЛ а), отход клеток снижался до 25-30 % [6].

Наличие в клетках исходной культуры вторичных каротиноидов (т.е. уже запущенного механизма трансляции генов биосинтеза АСТ) определили быстрый метаболический ответ клеток этлии на комплексное стресс-воздействие: уже через 3-4 часа все культуры приобрели бурый оттенок. Раньше других изменение окраски было отмечено в варианте с добавлением инициаторов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – смеси Fe^{2+} и H_2O_2 (вар. № 4). В конце «красной стадии» содержание $\Sigma КР$ ($37,34 \pm 0,34 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) (рис. 3.7А), их массовая доля в сухом веществе ($2,09 \pm 0,05 \%$) (рис. 3.7 Б) и среднесуточный выход из литра исходной культуры ($9,04 \pm 0,10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) (рис. 3.7 В) здесь были такими же высокими, как и в контроле (во всех случаях $P > 0,05$), хотя плотность культуры ($\text{кл} \cdot \text{мл}^{-1}$) на завершающей стадии эксперимента была приблизительно в 1,4 раза ниже (рис. 3.5А).

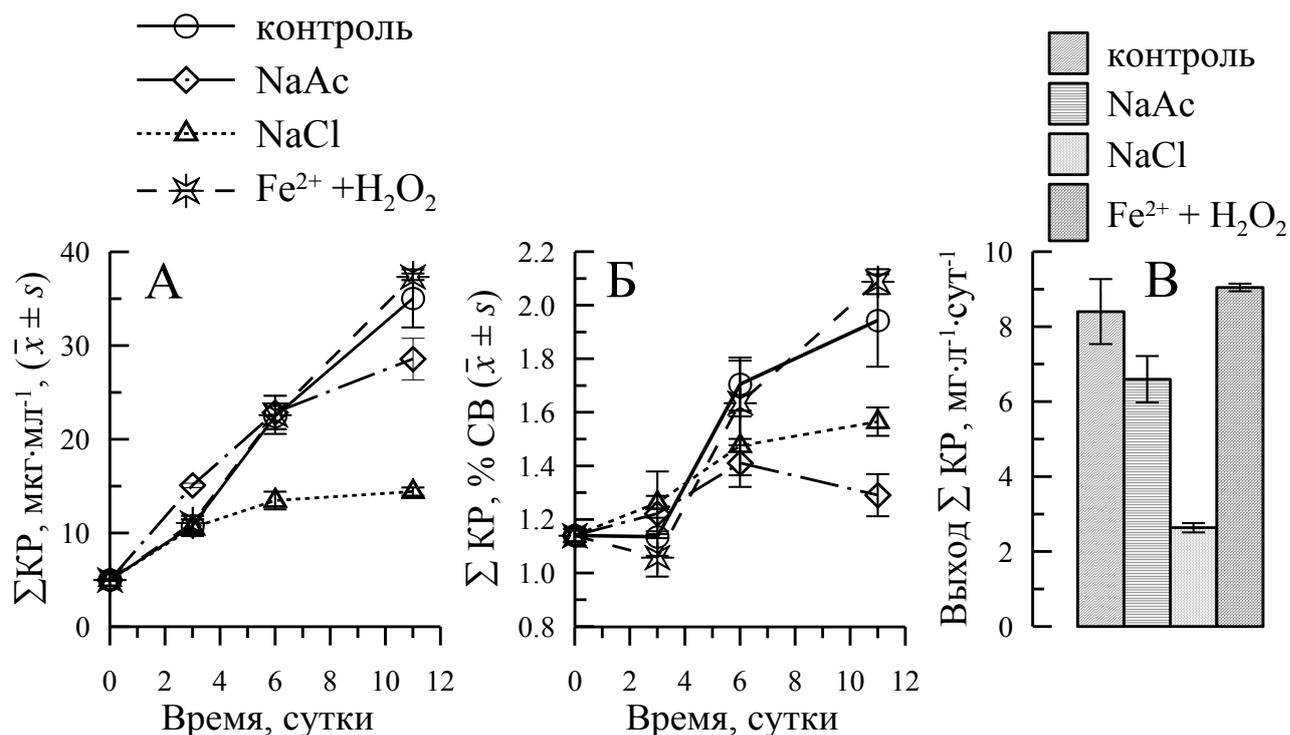


Рис. 3.7 Динамика содержания суммарных каротиноидов в культурах (А) и сухой биомассе (Б) *Ectocarpus carotinosa* и среднесуточный выход каротиноидов (В) в зависимости от химической природы стресс-агентов

Анализируя описанные выше изменения в состоянии культур, следует акцентировать внимание на том, что такие показатели как выход Σ КР из литра культуры и содержание Σ КР в сухом веществе, широко используемые для характеристики продуцентов АСТ, далеко не всегда адекватно отражают интенсивность вторичного каротиногенеза в клетках водорослей, так как зависят не только от скорости биосинтеза ККР, но и от выживаемости клеток, и от скорости накопления в них сухого вещества. Эти критерии в большей степени отражают биотехнологический потенциал вида. Для сравнительной оценки интенсивности ВКРГ в зависимости от условий внешней среды, как правило, анализируют характер динамики и скорость накопления Σ КР и ключевых фракций ККР в расчёте на клетку. Однако результаты, полученные при работе с *E. carotinosa*, свидетельствуют о том, что и этот подход имеет свои ограничения и может

привести к ошибочной трактовке экспериментальных данных, так как активный спорогенез, продолжавшийся в течение всей «красной» стадии, привёл к существенному и неравнозначному уменьшению размеров клеток эвглены во всех вариантах эксперимента в 1,8 - 6,8 раза (рис. 3.6). Столь значительная вариабельность размеров клеток в зависимости от стадии клеточного цикла и характера стресс-воздействия не позволяет использовать показатели, основанные на содержании каротиноидов в расчёте на клетку, для характеристики интенсивности стресс-реакции этой водоросли на негативное внешнее воздействие. Так, например, в контрольных культурах равенство содержания $\Sigma\text{КР}$ в клетках в начале и конце «красной стадии» ($\approx 26 \text{ пг}\cdot\text{кл}^{-1}$) (рис. 3.8 А) без учёта уменьшения их среднего объёма (рис. 3.6), может быть интерпретировано как отсутствие ВКРГ в культурах, стрессированных без использования химических добавок.

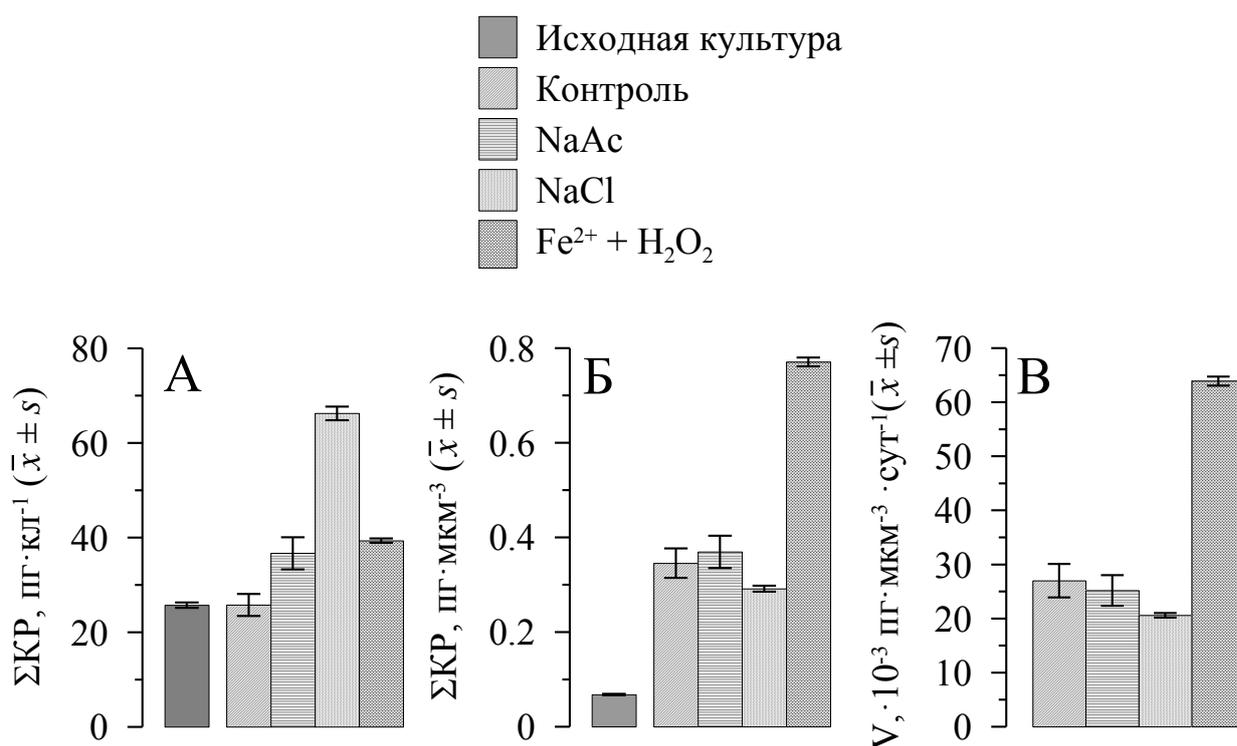


Рис. 3.8 Содержание суммарных каротиноидов в расчёте на клетку (А) и единицу объёма клетки (Б) в начале и конце «красной» стадии и средняя скорость накопления пигментов (В) в зависимости от природы химических стресс-агентов

На самом деле одинаковое количество Σ КР содержалось в клетках, различающихся по объёму в 5 раз. В таких случаях внутриклеточное содержание пигментов более корректно рассчитывать на единицу объёма (мкм^3) клетки. Использование такого способа выражения концентрации показывает, что уровень Σ КР в клетках контроля вырос по отношению к начальному более чем на 400 % и максимальная интенсивность ВКРГ наблюдалась не при повышенной солёности, как это вытекает из рис. 3.8 А, а при включении в стресс-комплекс химических промоторов ПОЛ – смеси Fe^{2+} и H_2O_2 (рис. 3.8 Б, В).

Средняя скорость накопления Σ КР в единице объёма клетки $(63,9 \pm 1,0) \cdot 10^{-3}$ $\text{пг} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$) при действии на них смеси $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ (инициаторов образования активных форм кислорода) была в 2,5 раза выше, чем в контроле. А выход Σ КР из литра исходной культуры, являющийся результирующей скорости роста и скорости биосинтеза пигментов в клетках, в обоих вариантах был сходным и составлял соответственно $8,4 \pm 0,9$ и $9,0 \pm 0,1$ $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ (рис. 3.7 В).

Реакция культур *E. carotinos* на внесение в питательную среду ацетата натрия до конечной концентрации 50 мМ существенно отличалась от ярко выраженной двойственной реакции *H. pluvialis* на аналогичное воздействие. У планктонного вида на фоне 45 % смертности монадных клеток наблюдалось не только существенное ускорение биосинтеза Σ КР в формирующихся апланоспорах, но и достоверное увеличение среднесуточного выхода Σ КР из литра культуры [13]. В культуре эттлии, как уже упоминалось выше, массового отмирания вегетативных клеток не происходило. По сравнению с контролем наблюдалось незначительное увеличение среднего объёма апланоспор. Хотя и в том, и в другом случае модальную группу (30 - 34% от общего числа клеток) составляли мелкие клетки с $V = 20 - 40$ мкм^3 , доля более крупных клеток с $V > 80$ мкм^3 здесь была выше (рис. 3.6). Поэтому более высокий уровень Σ КР в клетках (рис. 3.8 А) отражал не столько интенсификацию ВКРГ ацетатом, сколько особенности размерной структуры популяций. Подтверждением тому являются такие факты как отсутствие различий между сравниваемыми вариантами по скорости накопления Σ КР в единице объёма апланоспор $((27,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$ и $(25,2$

$\pm 2,8) \cdot 10^{-2}$ пг·кл⁻¹·сут⁻¹) и самое низкое из всех вариантов содержание Σ КР в биомассе ($1,3 \pm 0,1$ % СВ), собранной в конце эксперимента (рис. 3.7 Б).

Сходная картина была зарегистрирована и в варианте с внесением в культуры эттлии хлорида натрия до концентрации 200 мМ. И в этом случае усиления биосинтеза ВКР по сравнению с контролем не наблюдалось. Самое высокое среди всех вариантов содержание Σ КР в расчёте на клетку определялось более крупными размерами апланоспор. Скорость накопления Σ КР в единице объёма клетки (рис. 3.8 В), их массовая доля в сухом веществе (рис. 3.7 Б) и среднесуточный выход (рис. 3.7 В) в условиях повышенной солёности были ниже, чем в контроле (по выходу Σ КР этот вариант уступал контрольному в 3 раза).

Такая необычная для продуцентов АСТ реакция водоросли на неоднократно апробированные активаторы ВКРГ [28, 33, 36, 56], по всей вероятности, объясняется постоянным присутствием в вегетативных клетках этого вида (или только данного штамма?) пула кетокаротиноидов [35], удерживающих в момент стресс-воздействия уровень активных форм кислорода от лавинообразного нарастания и в значительной мере нивелирующих действие химических стресс-агентов. Дальнейшее накопление каротиноидов в созревающих апланоспорах способствует стабилизации процессов ПОЛ на уровне, позволяющем вегетативным клеткам сохранить жизнеспособность путём перехода из стадии активной жизнедеятельности в стадию покоя.

При исследовании ВКРГ у Chlorophyceae на примере различных видов микроводорослей было установлено, что состав Σ КР по мере формирования покоящихся стадий клеточного цикла меняется – относительное содержание первичных каротиноидов (ПКР) неуклонно снижается (иногда до следовых концентраций), а доля вторичных каротиноидов повышается до 85-95% от Σ КР. Ключевой составляющей этого процесса, является увеличение относительного содержания эфиров АСТ в Σ КР [13, 22, 28]. От каких внешних и внутренних факторов зависят динамика соотношения разных форм АСТ (свободного, моно- и диацильных эфиров), скорость их накопления, качественный и количественный состав метаболитических предшественников АСТ, а также их функциональная роль

в клетках у видов разной систематической принадлежности и экологии пока остаётся неясным, прежде всего в силу фрагментарности сведений по данному вопросу, имеющих лишь для немногих видов микроводорослей [147, 159, 215]. На рис. 3.9 -3.11 впервые для *E. carotinos* приведены сведения, характеризующие динамику содержания ПКР и ВКР в клетках в условиях экспериментального стресса в зависимости от природы химических активаторов ВКРГ.

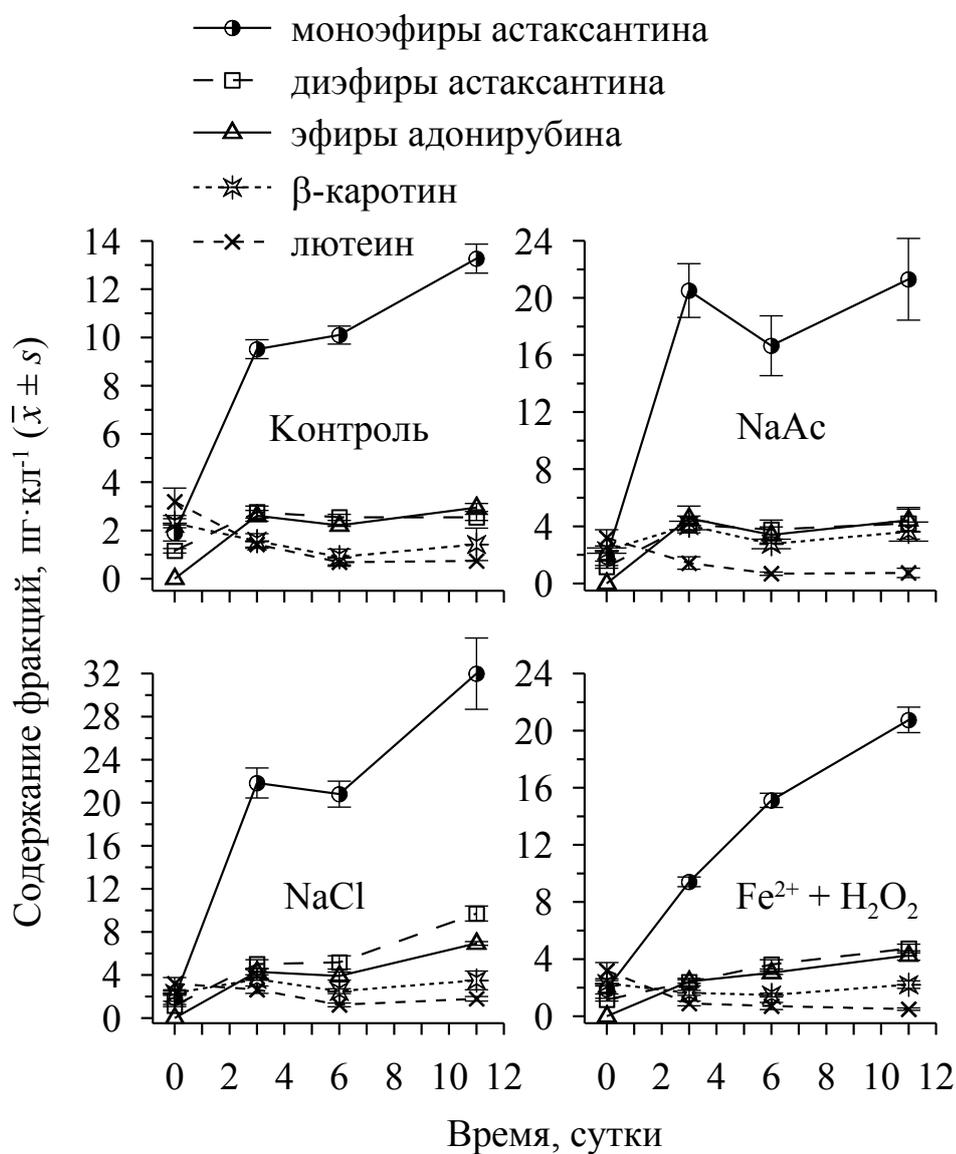


Рис. 3.9 Динамика содержания ключевых фракций каротиноидов в клетках *E. carotinos* при действии различных химических стресс-агентов

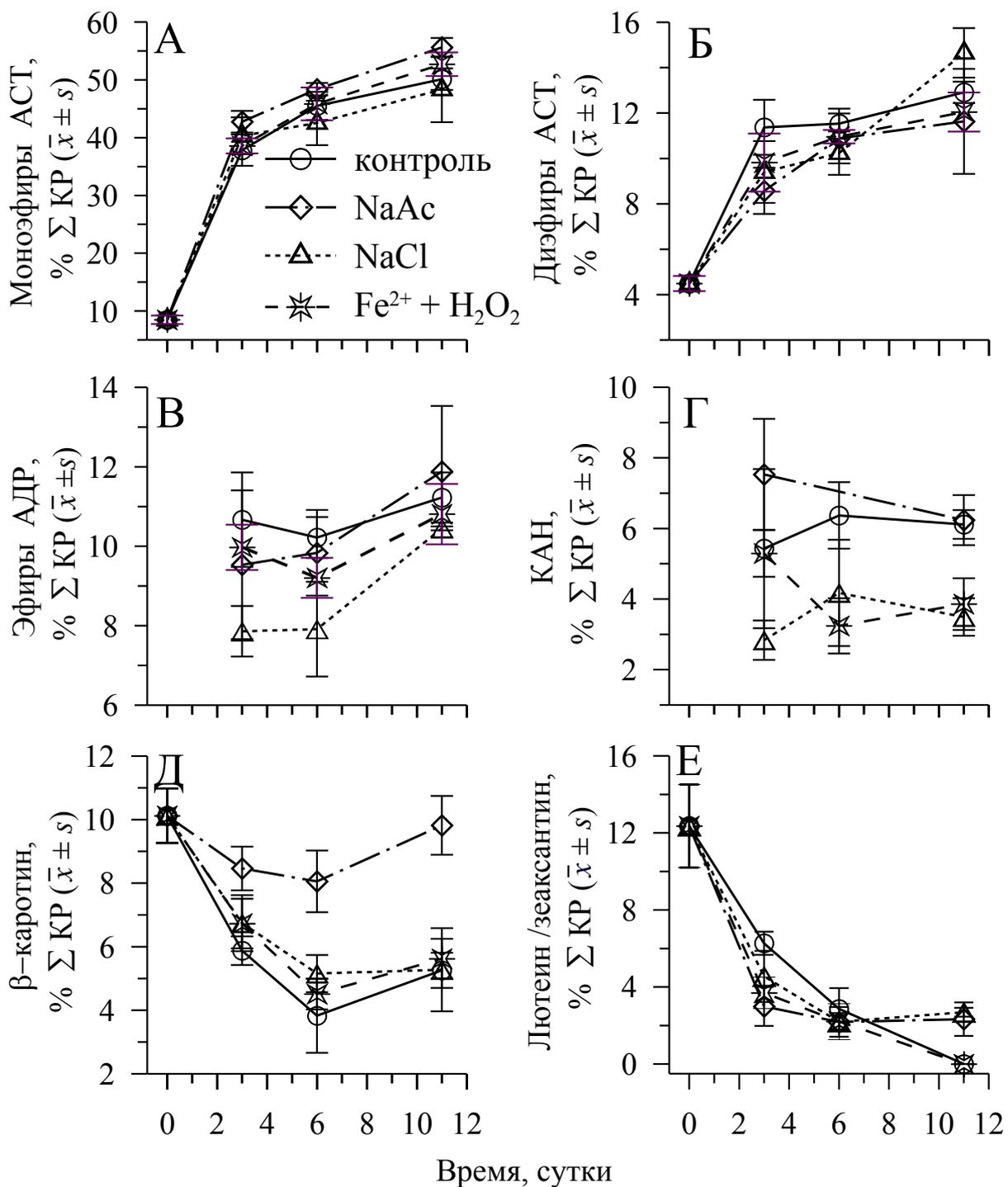


Рис. 3.10 Динамика относительного содержания вторичных (А - Г) и первичных каротиноидов (Д, Е) в клетках *E. carotinoso* в зависимости от природы химических стресс-агентов

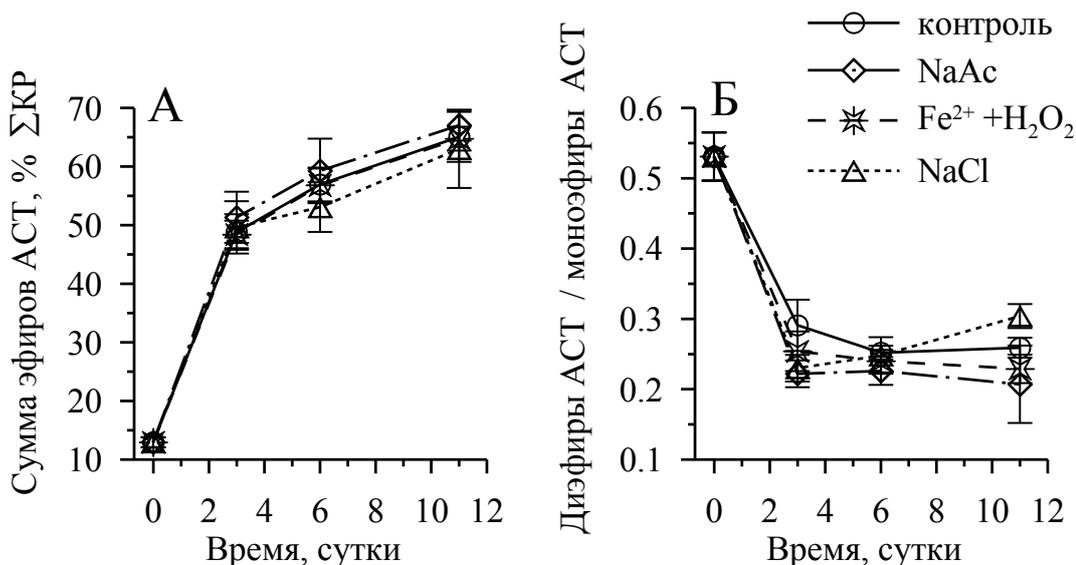


Рис. 3.11 Динамика суммарного содержания моно- и диэфиров астаксантина (А) и их соотношения (Б) в клетках *E. carotinos* при действии различных химических стресс-агентов

Анализ содержания пигментов в расчёте на клетку показал, что в каждом из вариантов эксперимента, независимо от природы химических стресс-агентов, формирование цитоплазматического пула КР в созревающих апланоспорах этлии определяла одна фракция - моноацильные эфиры АСТ (МЭАСТ). Уже за первые трое суток её относительное содержание в Σ КР во всех вариантах выросло в 4,5 - 5,4 раза, а к окончанию эксперимента - в 5,7 - 6,6 раза (рис. 3.10 А).

Доля диацильных эфиров АСТ (ДЭАСТ) также росла, хотя и не так быстро. На 3-и сут она увеличилась по отношению к начальному уровню в 2,3 - 2,5 раза, а за последующие 8 сут всего на 13,5 - 15,9 % (рис. 3.10 Б). В результате к концу эксперимента на фоне повышения суммарной доли эстерифицированного АСТ до 63 - 67 % отношение ДЭАСТ/МЭАСТ во всех случаях уменьшилось \approx в 2 раза (с 0,55 до 0,2 - 0,3) и роль моноэфиров АСТ как ключевой фракции ВКР проявилась ещё чётче (рис. 3.11, табл. 3.3). Связано ли это с недостатком пластических или энергетических ресурсов для полной эстерификации гидроксильных групп в молекулах АСТ, или такая амфифильная форма более предпочтительна для хранения АСТ в цитоплазме, пока остаётся не ясным.

Таблица 3.3

Фракционный состав вторичных каротиноидов *Ettlia carotinos* (% от суммы) в конце «красной» стадии в зависимости от природы химических стресс-агентов

Наименование фракции	Содержание каротиноидов, % суммы КР ($\bar{x} \pm s$)			
	Контроль	NaAc	NaCl	Fe ²⁺ + H ₂ O ₂
β-каротин	4,63±0,49	8,64±0,61	4,64±1,15	4,05±0,55
Диэфиры астаксантина	12,91±0,47	11,63±2,31	14,65±1,09	12,05±0,86
Моноэфиры астаксантина	50,12±1,86	55,61±3,25	48,35±5,66	52,71±2,03
Кантаксантин	6,11±0,47	6,24±0,71	3,49±0,53	3,86±0,73
Эфиры адонирубина	11,23±0,63	11,88±1,65	10,45±0,05	10,81±0,76
Прочие кетокаротиноиды	10,54±2,77	6,79±0,93	10,39±2,43	6,86±1,12
Сумма кетокаротиноидов	90,91±0,21	92,15±0,31	87,33±0,12	86,29±0,04

Характерно, что химические активаторы ВКРГ практически не влияли на относительное содержание эфиров АСТ в ΣКР (рис. 3.10 А, Б). Можно лишь отметить слабо выраженную тенденцию увеличения концентрации МЭАСТ в присутствии ацетата по сравнению с контролем. Данная черта отличает эттлию как от близкородственного планктонного вида *H. pluvialis*, так и от типичного эдафофита *Scotiellipsis rubescens*, у которых NaAc в концентрации 50 мМ вызывал ощутимый прирост доли эфиров АСТ в общем пуле КР. По суммарному содержанию МЭАСТ и ДЭАСТ в зрелых апланоспорах (63 - 67 %) (рис. 3.11. А) эттлия существенно превосходит такие почвенные виды как *Bracteacoccus* spp. [28] и *Scotiellopsis rubescens* (30 - 50 % от ΣКР) [33], но уступает *H. pluvialis* (до 90 % от ΣКР) [13].

Характерной особенностью фракционного состава ВКР *E. carotinosus*, отличающей этот вид от других продуцентов АСТ, является наличие заметного количества адонирубина (АДР) в форме ацильных эфиров (ЭАДР) (10-12 % Σ КР) (рис. 3.10. В, табл. 3.3). Этот факт в сочетании с постоянным присутствием в формирующихся спорах небольших количеств кантаксантина (КАН) (рис. 3.10. Г, табл. 3.3) позволяет предположить что из 8-ми постулируемых для микроводорослей метаболических путей биосинтеза АСТ у эттлии, как и у *H. pluvialis*, доминирует один главный путь, в ходе реализации которого в иононовые циклы β -каротина сначала вводятся кето-группы, и только затем - гидрооксогруппы: β -каротин \rightarrow эхиненон \rightarrow кантаксантин \rightarrow адонирубин \rightarrow астаксантин [147]. Однако, если у *H. pluvialis* при сходных условиях культивирования каждый из интермедиатов синтеза АСТ полностью трансформируется в КР следующего звена, то у эттлии, по неясным пока причинам, часть АДР эстерифицируется и накапливается в липидных глобулах цитоплазмы вместе с эфирами АСТ. Уже на 3-и сут после стресс-воздействия доля ЭАДР, не определявшихся ранее в исходной культуре, возросла до 8 - 10,5 % Σ КР и продолжала нарастать во всех случаях до конца периода наблюдений (до 10 - 12 % Σ КР) (рис. 3.10 В, табл. 3.3).

Относительное содержание КАН в каждом из вариантов эксперимента изменялось по отношению к уровню 3-их сут незначительно (в пределах 1,5 - 2,5 %) (рис. 3.10 Г). Поэтому частичное ингибирование образования АСТ, скорее всего, происходило на стадии гидроксирования β' - иононового цикла АДР. Негативное влияние на относительное содержание обоих предшественников АСТ оказывали хлорид натрия и промоторы ПОЛ ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$).

Аналогичная картина накопления гидроксированных интермедиатов АСТ в форме эфиров была отмечена и у *S. rubescens*. У этого эдафотрофического вида АСТ, по всей вероятности, синтезируется главным образом через 3'-гидрооксиэхиненон по схеме: β -каротин \rightarrow эхиненон \rightarrow 3'-гидрооксиэхиненон \rightarrow адониксантин \rightarrow астаксантин [147]), так как в автоспорах водоросли в заметном количестве (до 15%

от Σ КР) накапливаются моноэфиры адониксантина (АДК) [33]. У отдельных микроводорослей, например у *Chlorococsum* sp., оба прямых предшественника АСТ (АДР и АДК) входят в состав ВКР в равном соотношении (10 - 12 % Σ КР). Такой состав может формироваться при равноценном функционировании двух главных путей биосинтеза АСТ, или при их разветвлении в ключевых точках бифуркации (эхиненон и 3'-гидрооксиэхиненон) [147].

Направленность динамики относительного содержания β -каротина и фракции лютеин/зеаксантин (в использованном варианте метода ТСХ эти КР не разделяются) во всех случаях была типичной для фотосинтетических пигментов в условиях экспериментально индуцированного ВКРГ [22, 33]. Их доля в Σ КР неуклонно снижалась, причём деградация фракции лютеин/зеаксантин была выражена более сильно, чем β -каротина (рис. 3.10 Д, Е). Различия в химической природе активаторов ВКРГ в большинстве случаев не влияли на динамику относительного содержания ПКР (рис. 3.10 Д, Е). Можно лишь указать на более высокую долю β -каротина в Σ КР в присутствии ацетата (50 мМ NaAc) (рис. 3.10 Д).

3.2.3. Динамика содержания сухого вещества и его основных компонентов в культурах, клетках и биомассе *Ettlia carotinos*

Как и у других продуцентов ККР из класса Chlorophyceae [27, 33], накопление ВКР в стрессированных культурах эттлии сопровождалось накоплением сухого вещества. Максимум сухой биомассы в литре культуры ($2,21 \pm 0,06$ мг·л⁻¹) отмечен в варианте с добавлением NaAc, минимум - при повышенной солёности. В последнем случае содержание СВ за 11 сут увеличилось лишь в 2 раза, тогда как в остальных культурах - в 4-5 раз (рис. 3.12 А).

Наличие тесной линейной связи между содержанием СВ и Σ КР в культурах всех 4-х вариантов опытов указывает на возможность применения расчётного метода для оперативного контроля за накоплением КР в культурах *E. carotinos*

при её массовом выращивании (рис. 3.13). При этом следует иметь в виду, что параметры уравнения линейной регрессии могут варьировать в зависимости от особенностей режима культивирования.

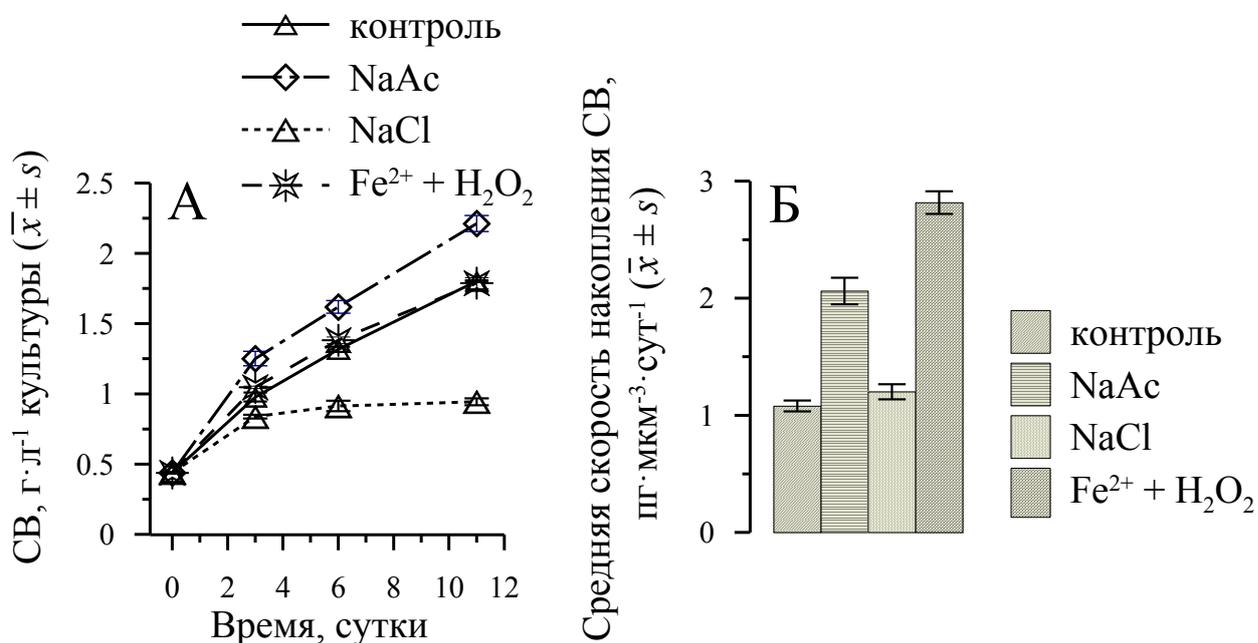


Рис. 3.12 Динамика содержания сухого вещества в культурах (А) и средняя скорость его накопления в единице объёма клетки (Б) *E. carotinosa* при действии различных химических стресс-агентов

В связи с тем, что зрелые апланоспоры в разных вариантах эксперимента существенно различались по размерам, среднюю скорость накопления СВ (рис. 3.12 Б) и содержание его основных компонентов в клетках эттлии (рис. 3.14) в зависимости от характера стресс-воздействия рассчитывали на единицу клеточного объёма (мкм³). Наиболее быстро СВ накапливали клетки, стрессированные при помощи промоторов ПОЛ (Fe²⁺ + H₂O₂) (2,82 ± 0,10 пг·мкм⁻³·сут⁻¹), а также апланоспоры, формирующиеся при внесении в среду органического углерода (50 мМ NaAc) (2,06 ± 0,11 пг·мкм⁻³·сут⁻¹). Контроль и вар. № 3 (200 мМ NaCl) по данному признаку были сходны (рис. 3.12 Б), а существенные различия по содержанию СВ в литре культуры между этими вариантами (рис. 3.12 А) были обусловлены ингибированием деления клеток в

условиях повышенной солёности [35].

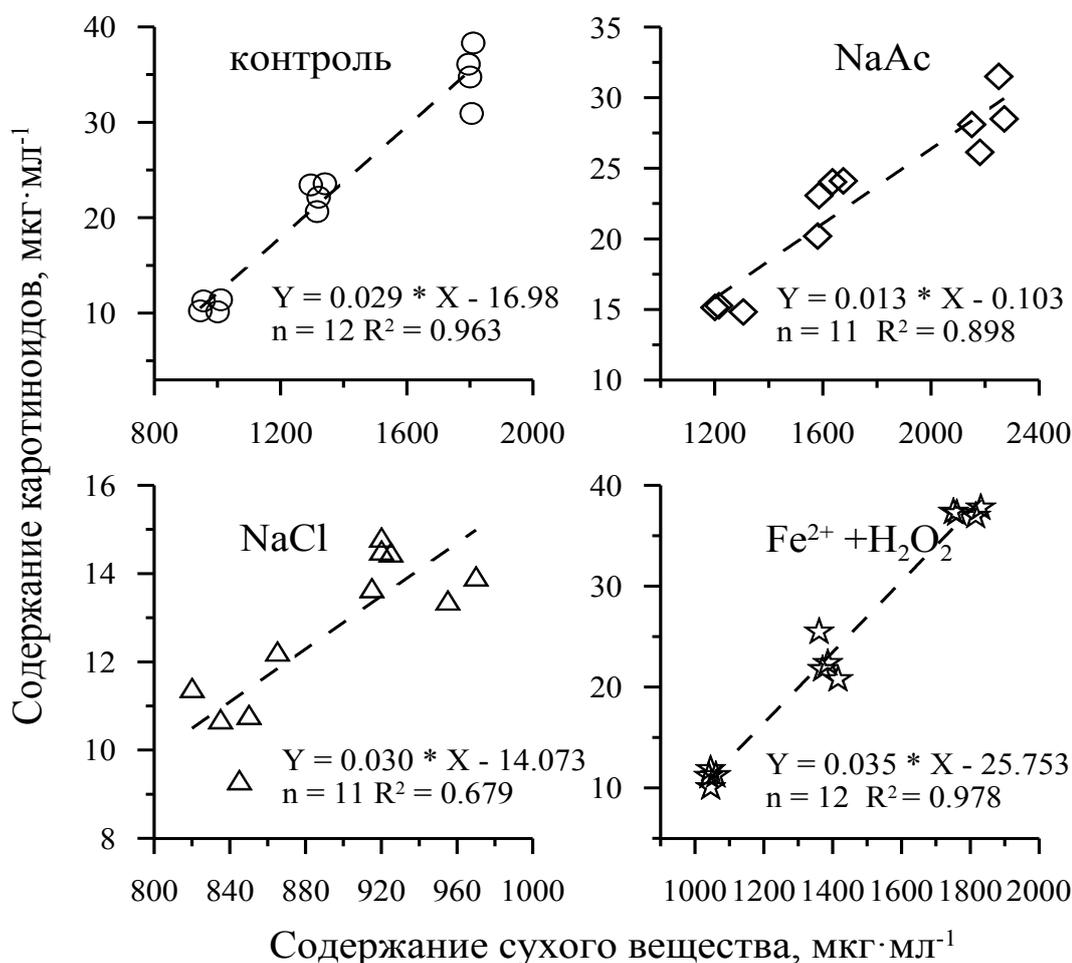


Рис. 3.13 Зависимость между содержанием сухого вещества и суммарных каротиноидов в культурах *E. carotinosa* при различных способах индукции вторичного каротиногенеза

В условиях острого дефицита азота накопление СВ в апланоспорах *E. carotinosa*, как и у *H. pluvialis* [22], происходило главным образом за счёт увеличения содержания углеводов и липидов (рис. 3.14 Г, Д, рис. 3.15 А, Б). За 11 сут запасы углеводов в единице клеточного объёма во всех вариантах выросли по отношению к уровню исходной культуры в 4,7 - 12,6 раза (рис. 3.15 А), а липидов - в 6,3 - 15,9 раза (рис. 3.15 Б). Максимальное увеличение обоих показателей отмечено при действии смеси $Fe^{2+} + H_2O_2$. Размах изменений в содержании белка был существенно ниже, причём в контроле и в присутствии

ацетата его уровень незначительно снизился (в 1,5 - 1,2 раза, соответственно), а в вар. № 3 и 4 - увеличился в 1,3 раза (рис. 3.15 В).

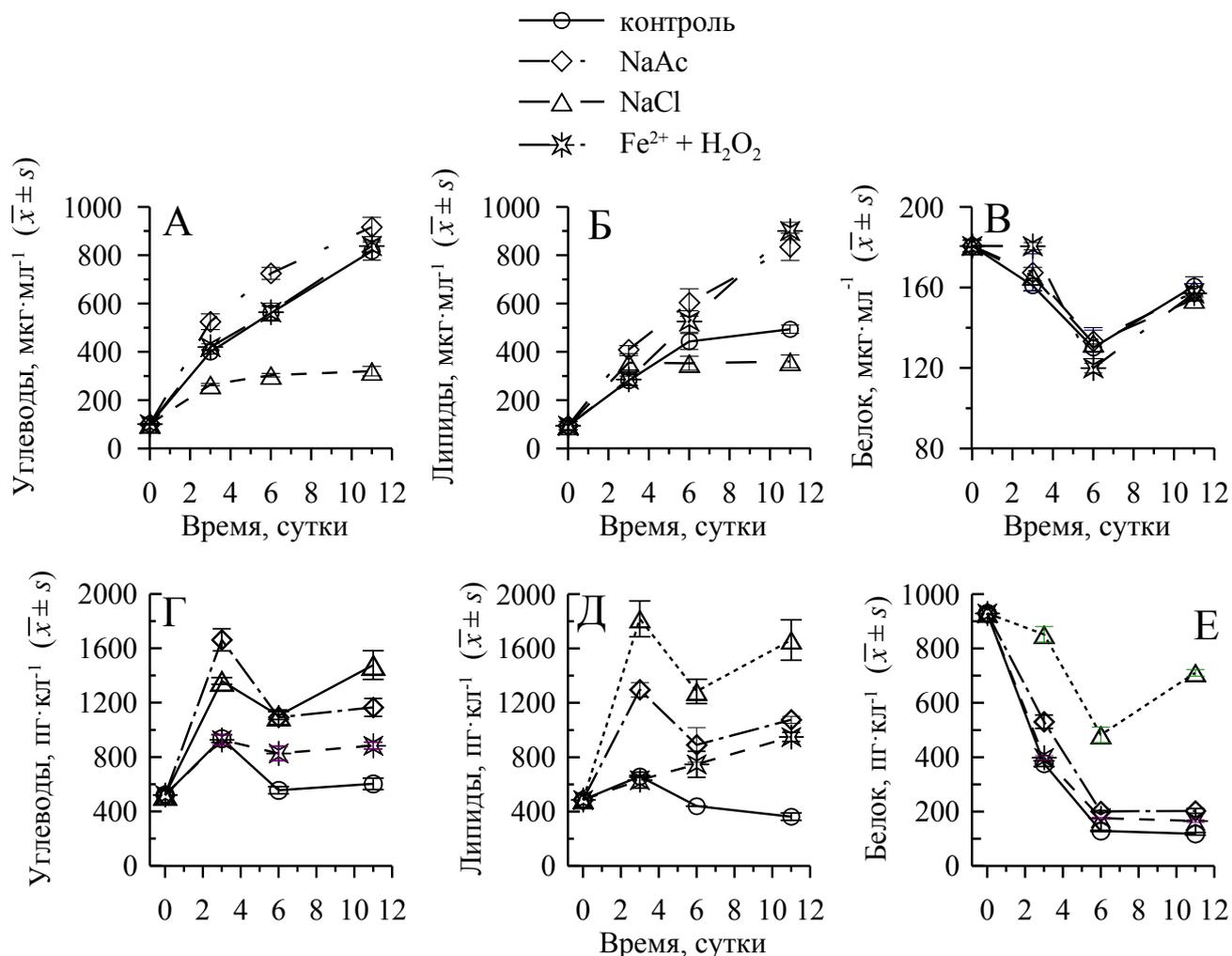


Рис. 3.14 Содержание основных компонентов сухого вещества (углеводов (А), липидов (Б), белка (В)) в культуре и клетках *E. carotinosa* при действии различных химических стресс-агентов

Характер изменения состава сухого вещества в стрессированных клетках эвглены при их переходе из вегетативного состояния в фазу покоя наглядно отражает рис. 3.16. По мере созревания апланоспор относительное содержание углеводов в сухом веществе увеличилось от 23 до 37-47 % (рис. 3.16.А), липидов – от 18 до 28-50 % (рис. 3.16Б), а массовая доля белка снизилась от 40 до 7-16 %

(рис. 3.16В).

На фоне совпадения во всех случаях общей направленности указанных процессов обращает на себя внимание несколько отличное действие хлорида натрия (200 мМ). Скорость накопления СВ в единице клеточного объёма в этом варианте была почти такой же, как и в контроле (рис. 3.12 Б). Однако количественный состав СВ в конечной биомассе существенно отличался от контрольного: массовая доля углеводов здесь была почти в полтора раза ниже, а относительное содержание белка и липидов заметно выше.

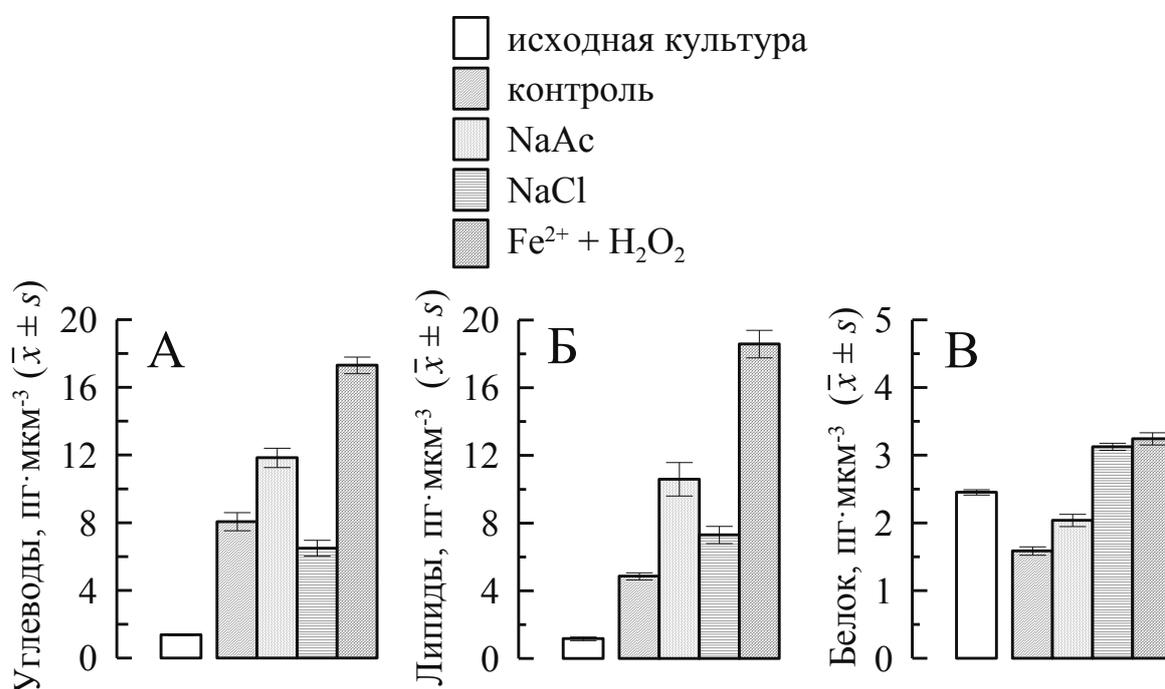


Рис. 3.15 Содержание основных компонентов сухого вещества (углеводов (А), липидов (Б), белка (В)) в единице клеточного объёма *E. carotinosus* при действии различных химических стресс-агентов

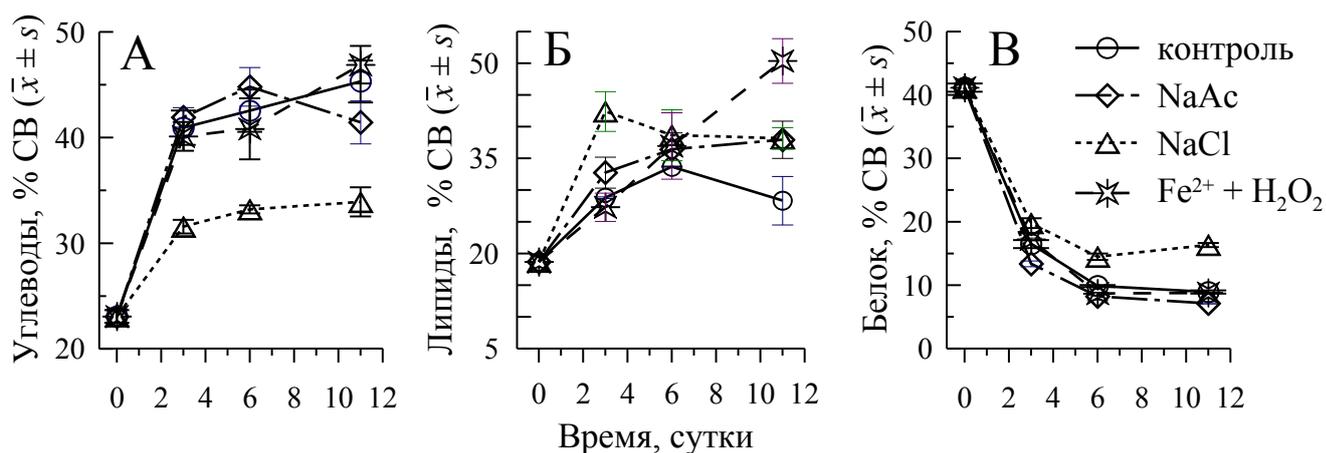


Рис. 3.16 Динамика массовой доли углеводов (А), липидов (Б) и белка (В) в сухой биомассе *E. carotinosus* при действии различных химических стресс-агентов

Анализируя полученные результаты, следует особо остановиться на факте интенсификации биосинтеза липидов у *E. carotinosus* при действии химических активаторов ВКРГ. В присутствии ацетата и генераторов свободных радикалов (ионов Fe²⁺ и H₂O₂) их конечная концентрация (800 - 900 мг·л⁻¹) (рис. 3.14 Б) и среднесуточный выход из литра исходной культуры (≈ 200 мг·л⁻¹·сут⁻¹ с учётом её разведения при переходе на «красную» стадию) (рис. 3.17) превысили уровень контроля как минимум вдвое.

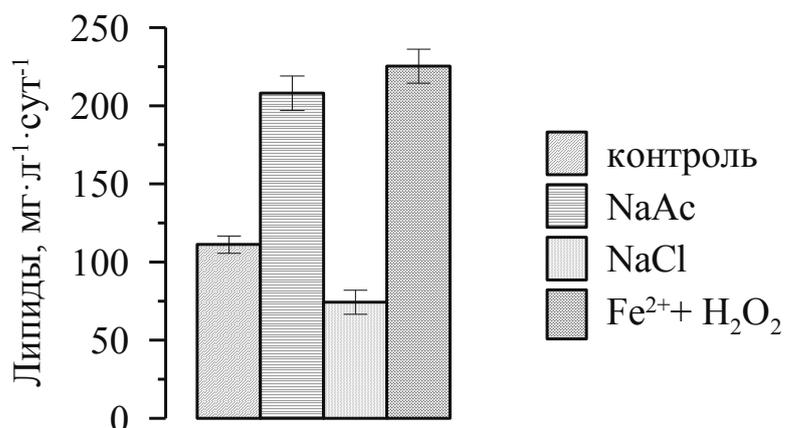


Рис. 3.17 Выход липидов из литра исходной культуры *E. carotinosus* в зависимости от природы химических стресс-агентов

Содержание липидов в «красной» биомассе, собранной по окончании эксперимента в этих вариантах, составило $37,9 \pm 2,9$ и $50,4 \pm 3,5$ % СВ, что было в 2,0 - 2,5 раза выше начального уровня в «зелёной» биомассе (18,7 % СВ) и в 1,4 - 1,8 раза выше, чем в «красной» биомассе, полученной из контроля (рис. 3.16 Б). Примечательно, что по липидным характеристикам *E. carotinos* не уступает зелёным и диатомовым микроводорослям, используемым в настоящее время для получения биотоплива [160, 164]. Известно, что многие представители *Chlorophyceae* и *Bacillariophyceae*, имеющие в жизненном цикле стадию покоя, способны при неблагоприятных условиях удваивать содержание запасных липидов в клетках. Однако лишь некоторые из них (2-3 десятка из нескольких сотен видов, протестированных за последние 15-20 лет) могут рассматриваться как потенциальные объекты массового культивирования [160, 164]. Коммерческая привлекательность микроводорослей для получения липидов различного назначения (технического, пищевого, медицинского) существенно увеличивается при получении дополнительных, востребованных рынком технически или биологически ценных продуктов. В качестве таких продуктов несомненный интерес представляют кетокаротиноиды (и, прежде всего, АСТ), как по своим высоким потребительским свойствам и растущему рынку сбыта, так и по сопряжённости биосинтеза этих пигментов с биосинтезом липидов. Содержание ВКР в культурах продуцентов АСТ, как правило, положительно коррелирует с содержанием липидов (рис. 3.18), поэтому оптимизация условий культивирования водорослей для увеличения выхода одного целевого продукта всегда будет приводить к увеличению выхода сопутствующего компонента.

$$Y(\text{контроль}) = 8.51 * X + 209.42 \quad R^2 = 0.859$$

$$Y(\text{NaAc}) = 28.04 * X - 18.58 \quad R^2 = 0.815$$

$$Y(\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2) = 23.44 * X + 10.88 \quad R^2 = 0.973$$

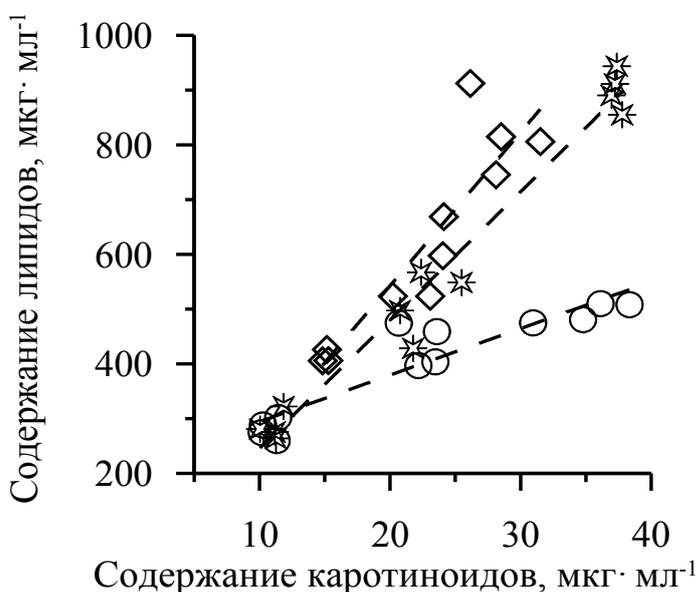


Рис. 3.18 Зависимость между содержанием суммарных каротиноидов и общих липидов в культурах *E. carotinosa* при различных способах индукции вторичного каротиногенеза

Закключение.

Результаты, представленные в настоящем разделе, позволяют сделать ряд выводов.

1. Период адаптации коллекционных штаммов зелёной микроводоросли *E. carotinosa*, длительно хранившихся на агаризованных средах, к росту на жидких средах может достигать 10-12 месяцев,

2. При невысокой освещённости (4000 лк, 15 ч свет: 9 ч темнота) скорость автотрофного роста *E. carotinosa* не зависит от абсолютного содержания и молярного соотношения N и P в питательных средах для зелёных микроводорослей. Для экспериментальных исследований ВКРГ у данного вида методом двухстадийной накопительной культуры для «зелёной» стадии можно рекомендовать такие питательные среды как ОНМ (1,5N-1,5P), CHU-13 (3N-3P), ВВМ (3N), ВГ-11, однако наиболее предпочтительной с точки зрения

экономичности и минимизации агрегации вегетативных клеток в скопления является полуторная среда ОНМ (1,5N-1,5P),

3. Вторичный каротиногенез у *E. carotinos* характеризуется рядом типичных черт, присущих большинству продуцентов ККР из класса Chlorophyceae в условиях абиотического стресса, а также некоторыми специфическими особенностями, отличающими данный вид как от близкородственных планктонных видов Volvocales (линия *Chlamydomonas applanata*), так и сходных по экологии, но филогенетически удалённых водорослей линии *C. lobulata*.

4. К общим для всех продуцентов ККР характеристикам следует отнести:

- индукцию ВКРГ триадой стресс-факторов (дефицит питания, резкий положительный градиент освещённости, инициаторы ПОЛ),
- противоположную направленность динамики содержания первичных (фотосинтетических) и вторичных каротиноидов,
- ведущую роль моноацильных эфиров АСТ в формировании цитоплазматического пула КР при созревании апланоспор.
- тесное сопряжение процессов накопления вторичных каротиноидов, сухого вещества и липидов при переходе клеток из вегетативного состояния в фазу покоя,
- противоположная направленность изменений содержания углеводов и липидов, с одной стороны, и белка, с другой.

5. К специфическим особенностям ВКРГ *E. carotinos* относятся:

- активный спорогенез и существенное уменьшение средних размеров клеток этлии при действии всех использованных химических активаторов ВКРГ (в 1,8 - 6,8 раза),
- постоянное присутствие в вегетативных клетках некоторого количества кетокаротиноидов, определяющее высокую выживаемость клеток при действии ацетата и хлорида натрия при отсутствии стимулирующего эффекта этих соединений на интенсивность ВКРГ,

- необычно высокое относительное содержание эстерифицированного адонирубина (10-12 % Σ КР),
- высокая скорость накопления ВКР в присутствии смеси $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ ($63,9 \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{г} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$),
- высокий выход липидов из литра исходной культуры (208 - 225 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) (38 и 50 % СВ) при использовании в качестве активаторов ВКРГ NaAc и смеси $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$,

РАЗДЕЛ 4

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА У МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПОРЯДКА SCENEDESMALES KOSTIKOV В УСЛОВИЯХ ДВУХСТАДИЙНОЙ НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ

В настоящем разделе представлены данные, характеризующие особенности вторичного каротиногенеза у трёх представителей порядка Scenedesmales Kostikov [8], принадлежащих к разным таксономическим и экологическим группам: планктонной и эдафофильной водорослей семейства Scenedesmaceae – *Scenedesmus rubescens* (P.J.L.Dangeard) E. Kessler et al. 1997 и *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov & Mamkaeva 1974, соответственно – и эдафофильной микроводоросли из семейства Bracteacoccaceae – *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrová 1931. Рассматриваются морфометрические, физиолого-биохимические и продукционные характеристики микроводорослей в условиях лабораторного культивирования методом двухстадийной накопительной культуры. Особое внимание уделяется особенностям адаптации водорослей к условиям экспериментального стресса.

4.1. Верификация таксономического положения видов

Одним из важных условий проведения сравнительных исследований особенностей ВКРГ у зелёных микроводорослей разной систематической принадлежности и экологической специализации является аутентичность объектов исследования. Актуальность этой проблемы связана с широким внедрением в альгологию современных электронно-микроскопических и молекулярно-генетических методов исследования и радикальному пересмотру на этой основе структуры класса Chlorophyceae [8, 169]. В настоящее время общепринятая классификация зелёных микроводорослей отсутствует и одни и те же виды в «классических» (морфолого-онтогенетических) и современных (цитологических и

молекулярных) системах нередко оказываются на различных ветвях филогенетического древа Chlorophyceae и имеют разные названия на уровне вида и даже рода. Еще одним источником противоречий могут служить случайные ошибки персонала крупных коллекций микроводорослей при маркировке штаммов. Именно такая ситуация имела место в нашем случае, когда полученный для выполнения данной работы штамм *Chlamydomonas reinhardtii* (IPPAS D-292) вызвал сомнения в правильности его идентификации. При лабораторном культивировании водоросли было обнаружено, что её морфологические характеристики существенно отличаются от первоописания *C. reinhardtii* Dangeard [81], а также от более поздних описаний А. А. Коршикова [5] и Х. Этгла [94]. С одной стороны, обнаруженное несоответствие могло быть связано с тем, что, по мнению указанных авторов, вид *C. reinhardtii* является сборным и культуры его различных штаммов характеризуются высокой изменчивостью размеров и формы клеток и расположения субклеточных органелл [5, 94]. С другой стороны, нельзя было исключить и тривиальной ошибки в этикетировании штамма во время недавней ревизии и реорганизации коллекции ИФР РАН [<http://collection.cellreg.org/home.ph>].

Необходимость верификации таксономического статуса *P. protococoides* (CALU-221) заключалась в необычной для продуцентов ККР «эксклюзивности» вида, хранящегося исключительно в коллекции Санкт-Петербургского университета, и отсутствие каких бы то ни было упоминаний об этом виде в научных публикациях (за исключением авторского первоописания) [12, 106].

Что касается третьего представителя сценедесмальных микроводорослей – *B. minor* (АСКУ 506-06 = SAG 221-1 = UTEX-66), то правильность его идентификации подтверждена результатами анализа нуклеотидных последовательностей ядерных генов, кодирующих 5s и 26s рРНК (рег. № в NCBI – JF 717 398.1) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF717398.1>].

Таким образом, задачей этого раздела работы было уточнение таксономического положения штаммов CALU - 221 и IPPAS D - 292 в системе

зелёных водорослей молекулярно-генетическими методами, основанными на анализе нуклеотидной последовательности 18S рРНК.

4.1.1. Верификация таксономического статуса *Pseudospongiococcum protococcoides* (CALU-221)

Световая микроскопия культур *P. protococcoides* показала, что его морфотип соответствует первоописанию Б. В. Громова и К. А. Мамкаевой от 1974 г [106]. При культивировании на жидкой среде BBM 3N без воздушной продувки клетки водоросли склеиваются в мелкие агрегаты, легко распадающиеся при перемешивании. Молодые эллипсоидные клетки с возрастом приобретают сферическую форму. Клеточная оболочка толстая, с двойным контуром. Хлоропласт губчатый или сетчатый (в зависимости от размеров и возраста клетки). Большинство клеток имеют один, реже два пиреноида, хорошо заметных в световом микроскопе. Размножение происходит с помощью автоспор, образующихся по 2 или 4 в одной материнской клетке. Длина молодых эллипсоидных клеток варьирует в пределах 6-12 мкм, ширина – 4-8 мкм, диаметр круглых автоспор составляет 12-19 мкм (рис. 4.1).

Анализ результатов определения нуклеотидной последовательности 18S рРНК *P. protococcoides*, проведенный с использованием поискового алгоритма megablast, показал, что сиквенс *P. protococcoides* не совпадает на 100% ни с одним из секвенированных видов зелёных водорослей, зарегистрированных в базе Национального Центра Биотехнологической информации (GenBank, NCBI), однако на 99-99,90 % сходен с 46 штаммами различных Chlorophyceae, представляющих различные молекулярные клады семейства *Scenedesmaceae*, родов *Graesiella* Kalina et Puncochárová и *Scenedesmus* Meyen. На первом месте (99,90 %) сходство с штаммом CCAP 211/8P *G. emersonii* (Shihira et Krauss) Nozaki (код доступа FR865687.1), синоним *Chlotella. emersonii* Shihira et Krauss. На втором месте (99,80 %) располагаются виды *G. vacuolata* (Shihira et Krauss) Kalina et Puncocharova (штамм CCAP 211/8C, код доступа FR865685.1), *C. emersonii* Shihira & Krauss

(штамм ССАР 211 /15, код доступа FR865661.1), *C. emersonii* Shihira & Krauss (штамм ССАР 211/11М, код доступа FR865657.1).

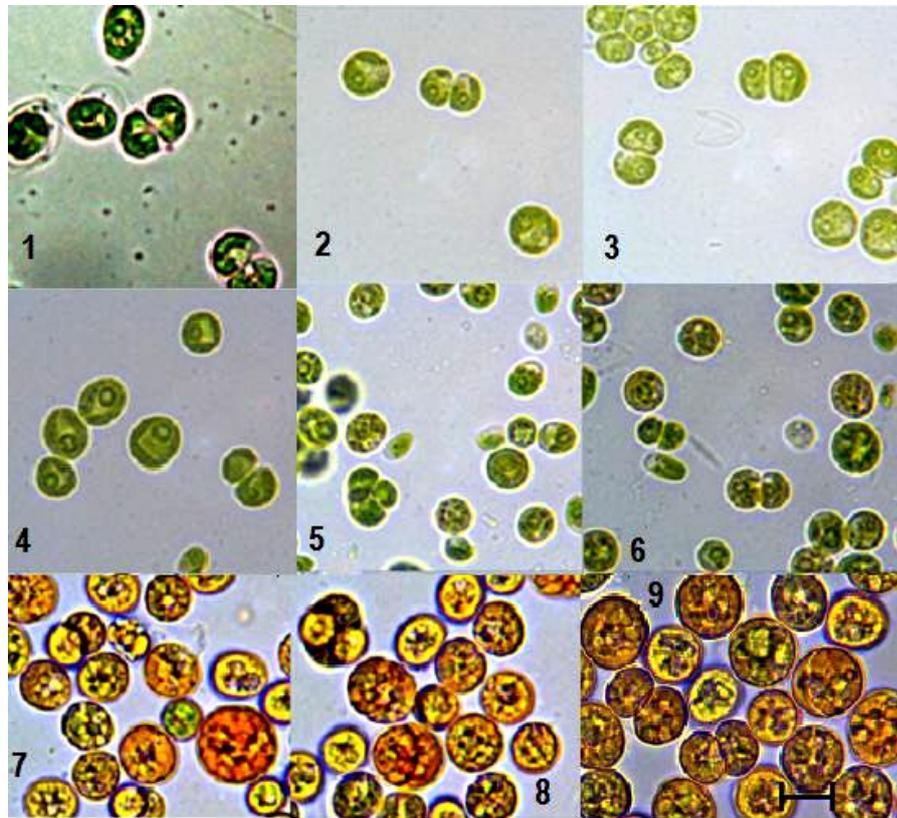


Рис. 4.1 *P. protococcoides* (штамм CALU-221) на жидкой (фото 1-3) и агаризованной (фото 4-6) среде BBM 3N. 1 – вегетативные клетки (возраст культуры 14 сут); 2, 3 – вегетативные клетки, двуспоровые спорангии и пустые оболочки материнских клеток после освобождения апланоспор (возраст культуры 2 месяца; 4-6 – апланоспоры (возраст культуры 12 месяцев). Шкала 10 мкм

Были построены филогенетические деревья с использованием методов максимальной правдоподобности (Maximal Likelihood, ML), ближайших соседей (Neighborhood - Joining, NJ), максимальной парсимонии (Maximum Parsimony, MP) в филогенетической программе PHYLIP 3.69 для матрицы, состоящей из 15 последовательностей, внешней группы и сиквенса штамма *P. protococcoides*. Во всех вариантах филогенетических деревьев штамм CALU-221 попадал в группу близких клад, соответствующих семейству *Scenedesmaceae*, а в её пределах - в

кляду «*Coelastrella*» (рис. 4.2). Эта кляда объединила такие секвенированные по 18S рРНК операционные таксономические единицы как *Graesiella emersonii*, *G. vacuolata*, а также *Scenedesmus vacuolatus*, *Asterarcys quadricellulare* и *C. emersonii* (рис. 4.2), что согласовывается с литературными данными для семейства *Scenedesmaceae* в современной интерпретации [126].

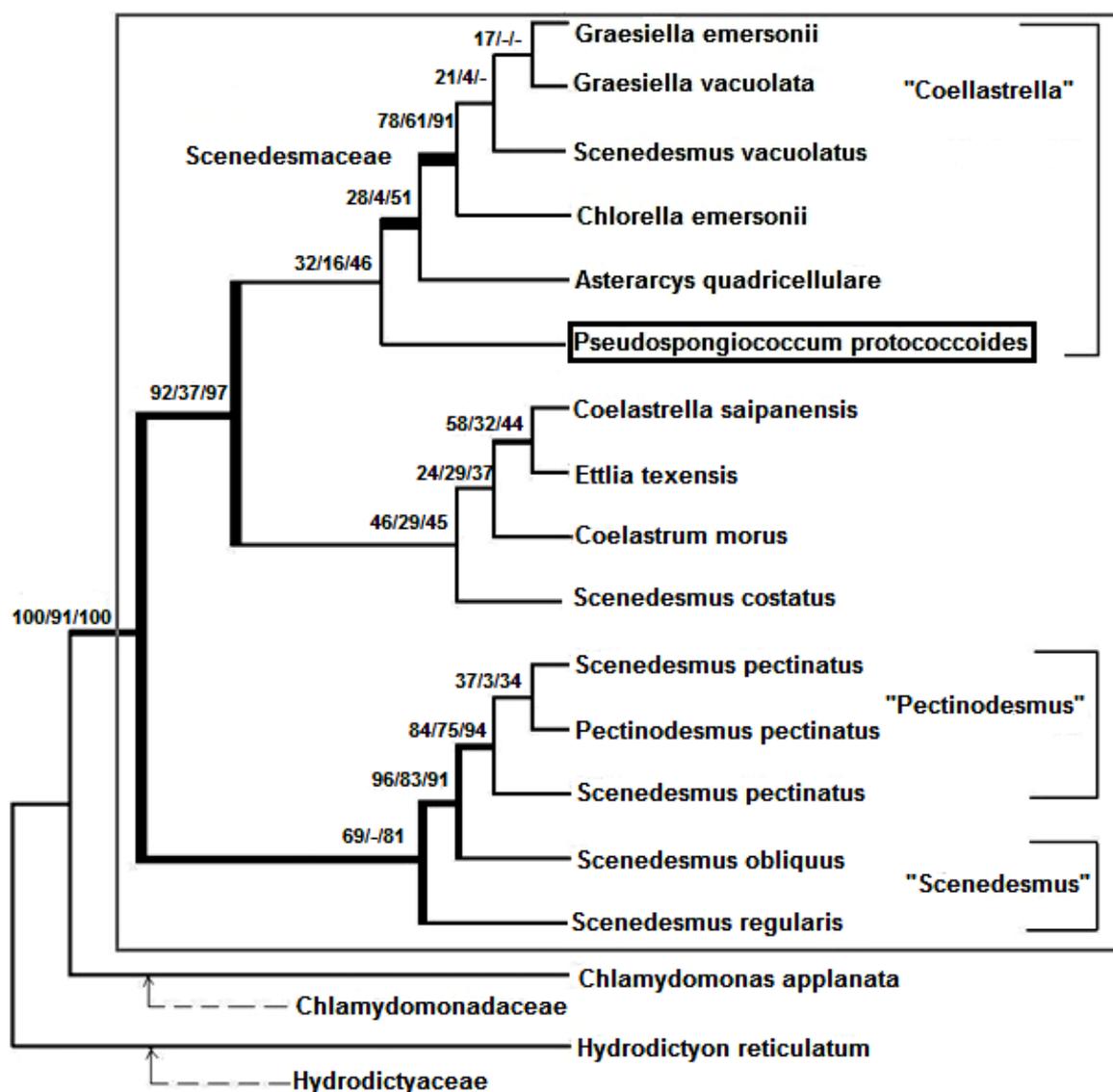


Рис. 4.2 Положение *Pseudospongiococcum protococcoides* (CALU-221) в системе *Scenedesmaceae* по результатам анализа нуклеотидных последовательностей 18S рРНК (филогенетическое дерево, построенное по методу максимальной правдоподобности, на ветвях – значения бутстрепа для ML/MP/NJ деревьев. Ветви, имеющие поддержку хотя бы по одному методу более 50 %, выделены жирными

линиями)

Таким образом, результаты молекулярно-филогенетического анализа показали, что генотип *P. protococcoides* уникален и не является идентичным ни одному из секвенированных видов зелёных водорослей и указали на положение штамма в пределах семейства *Scenedesmaceae*, клады «*Coelastrella*».

4.1.2. Верификация таксономического статуса *Chlamydomonas reinhardtii* (IPPAS D-292)

Сомнения в правильности идентификации штамма IPPAS D-292, выбранного первоначально в качестве объекта исследования для сопоставления с хламидомонадовыми водорослями, было вызвано несоответствием результатов световой микроскопии его культур морфологическому описанию *C. reinhardtii* Dangeard в литературе [5, 81, 94]. При лабораторном культивировании штамма IPPAS D-292 на различных питательных средах в течение нескольких лет его культуры состояли только из неподвижных коккоидных клеток эллипсоидной (длина 5-8 мкм) или сферической формы (диаметр 10-18 мкм). Клетки водоросли имеют гладкие, чаще всего двухслойные стенки с утолщениями на полюсах. Хлоропласт один, рассечённый на лопасти. Пиреноиды находятся в боковом (латеральном) утолщении хлоропласта. Размножение путем образования автоспор (по 2-8 клеток в спорангии), освобождающихся после разрыва материнской оболочки. Жгутиковых стадий и полового размножения не отмечено. На агаризованных питательных средах вегетативные клетки образуют темно-зелёные колонии. Стареющие культуры приобретают оранжевый или кирпично-красный цвет, свидетельствующий накоплении вторичных каротиноидов (рис. 4.3).

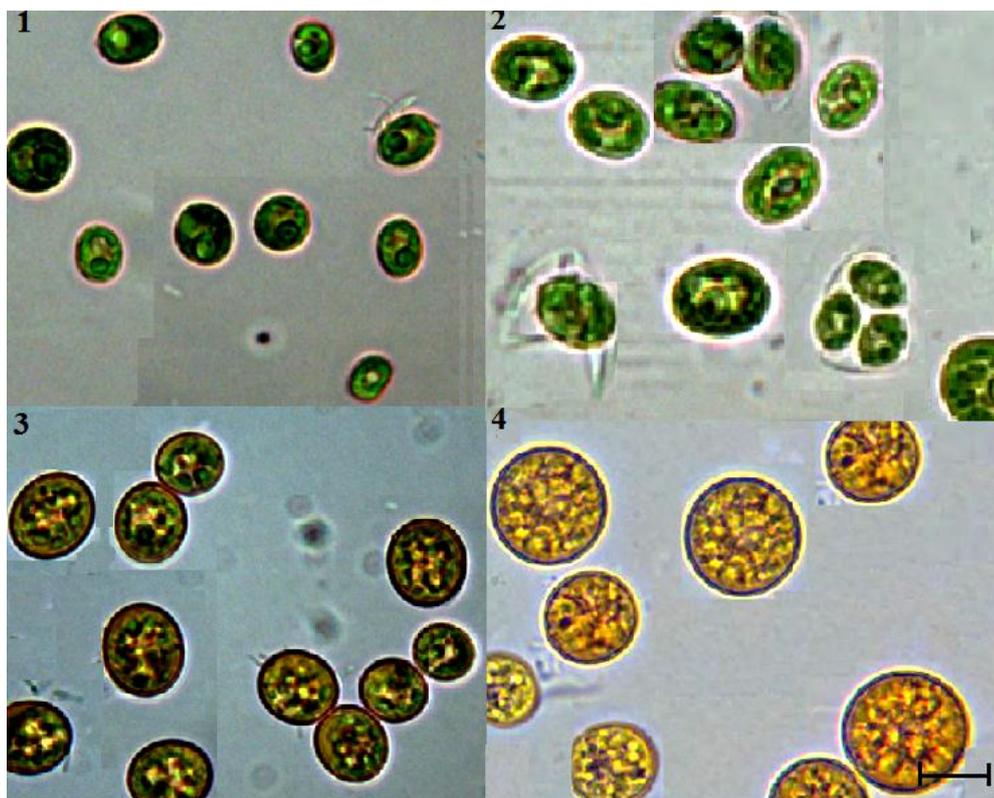


Рис. 4.3 *Scenedesmus rubescens* (штам IPPAS D-292) на жидкой (фото 1-3) и агаризованной (фото 4) питательной среде BBM 3N. 1 – вегетативные клетки (возраст культуры 2 недели); 2 – вегетативные клетки, оболочки материнских клеток после образования апланоспор (возраст культуры 1 месяц); 3-4 – апланоспоры (возраст культуры 3 и 12 месяцев). Шкала 10 мкм

Молекулярно-филогенетический анализ полученной нуклеотидной последовательности 18S рРНК штамма IPPAS D-292 и поиск в NCBI сходных последовательностей зелёных микроводорослей с помощью megablast алгоритма показал, что сиквенс IPPAS D-292 на 100 % совпадает с секвенированным штаммом CCAP 232/ 1 *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek et Huss [180]. Кроме того, полученная последовательность 18S рРНК штамма IPPAS D-292 была на 99.0-99.9% сходна с 25 последовательностями зелёных водорослей, представляющих различные молекулярные клады семейства Scenedesmaceae (рис. 4.4).

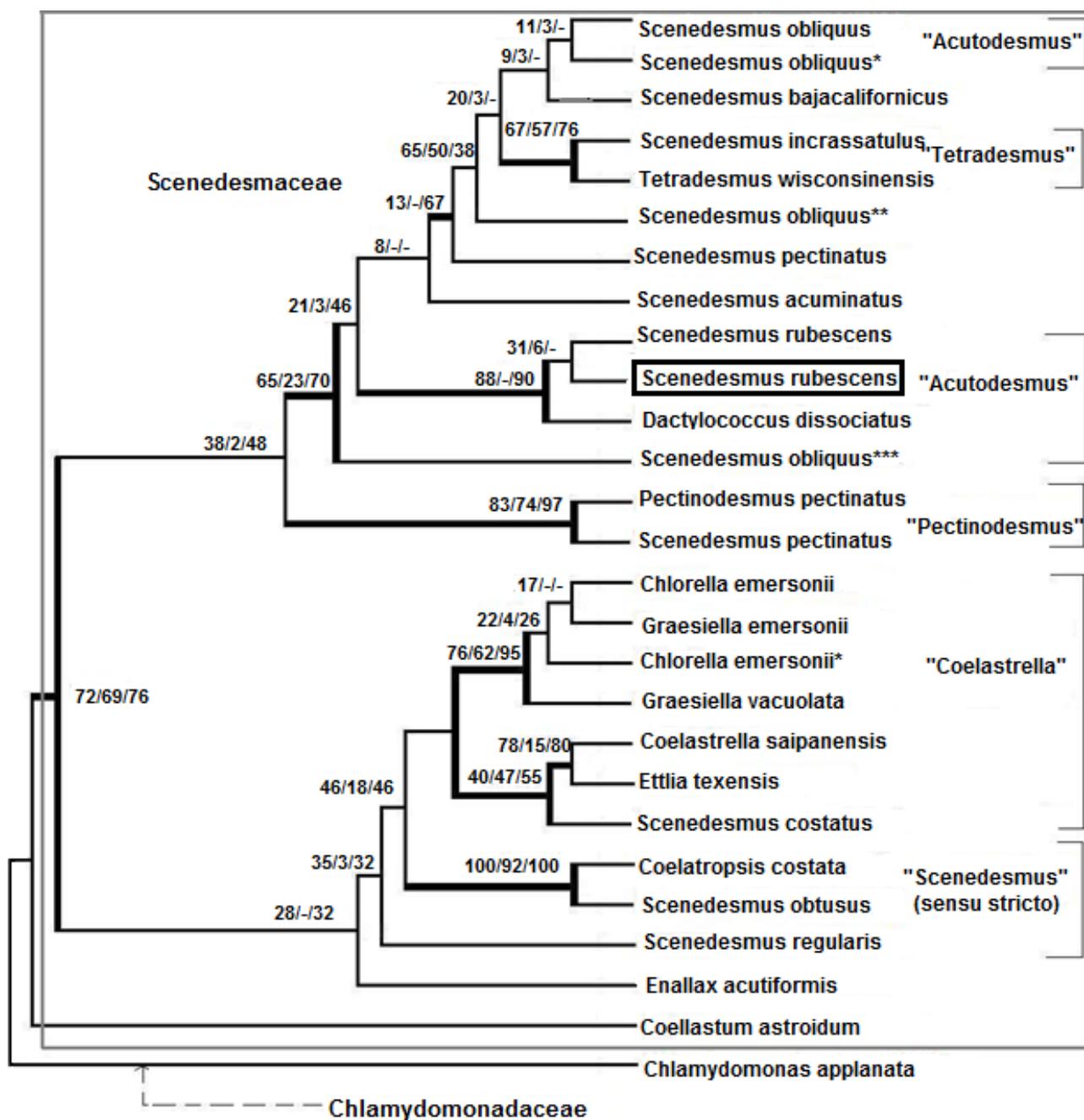


Рис 4.4 Положение штамма *Scenedesmus rubescens* (IPPAS D - 292) в системе *Scenedesmaceae* по результатам анализа нуклеотидных последовательностей 18S рРНК (филогенетическое дерево, построенное по методу максимальной правдоподобности, на ветвях – значения бутстрепа для ML/MP/NJ деревьев. Ветви, имеющие хотя бы по одному методу поддержку более 50 %, выделены жирными линиями)

На 99.90 % сиквенс соответствует неидентифицированному штамму Tow 9/21 P - 1w, приведённому в NCBI как *Scenedesmaceae* sp. (код доступа AY197641.1). На третьем месте (99.80 %) располагается штамм UTEX 1537 *Dactylococcus dissociates* Verses & Trainor (код доступа AB037084.1), попадающий в кладу *Acutodesmus* в современной интерпретации зарубежных авторов [126]. Во всех вариантах филогенетических деревьев, построенными NJ, MP и ML – методами, штамм IPPAS D -292 попадал в группу близких клад, соответствующих семейству *Scenedesmaceae*, а в её пределах - в кладу, объединившую виды *Scenedesmus rubescens* и *Dactylococcus dissociatus*.

Таким образом, анализ нуклеотидных последовательностей 18S рРНК двух видов микроводорослей-продуцентов кетокаротиноидов *S. rubescens* (IPPAS D-292) и *P. protococcoides* (CALU-221) подтвердил принадлежность исследуемых штаммов к семейству *Scenedesmaceae* (по [8]).

4.2 Ростовые характеристики сценедесмальных микроводорослей на «зелёной» стадии культивирования.

Как уже отмечалось в разделе «Объекты и методы исследований», сценедесмальные водоросли выращивали методом двухстадиной накопительной культуры при идентичных физико-химических параметрах культивирования, что позволяет корректно сравнивать как показатели роста периодических культур разных видов на I («зелёной») стадии, так и характер их адаптивного ответа на стресс-индукцию ВКРГ на II («красной»). Выбор минеральной среды для культивирования мало изученных видов (BBM 3N) основывался на её неоднократно подтвержденной универсальности для Chlorophyceae разной экологии в качестве среды для коллекционного хранения и экспериментальных исследований [213]. Утроенное содержание азота (по сравнению с авторской рецептурой) позволило продлить продолжительность наблюдений за характером деления и морфо-физиологических показателей вегетативных клеток до 16 сут. Накопительные кривые и средние за этот

период удельные скорости роста культур, рассчитанные по численности клеток, представлены на рис. 4.5.

Прежде всего следует отметить, что с 1-х по 12-е сут все три вида, не смотря на принадлежность к разным семействам и экологическим группам, росли с одинаковой скоростью. На 9-10-е сутки содержание азота во всех культурах приблизилось к нулю и на 14-е сут как планктонный, так и эдафофильный вид *Scenedesmaceae* прекратили рост. В то же время в культурах *B. minor* численность клеток продолжала увеличиваться ускоренными темпами до 16-х сут (удельная скорость роста с 1-х по 12-е сутки у всех трёх видов была 0,18 - 0,19 сут⁻¹, в то время как для брактеакоккуса данная величина с 13-х по 16-е сутки составила 0,31 сут⁻¹).

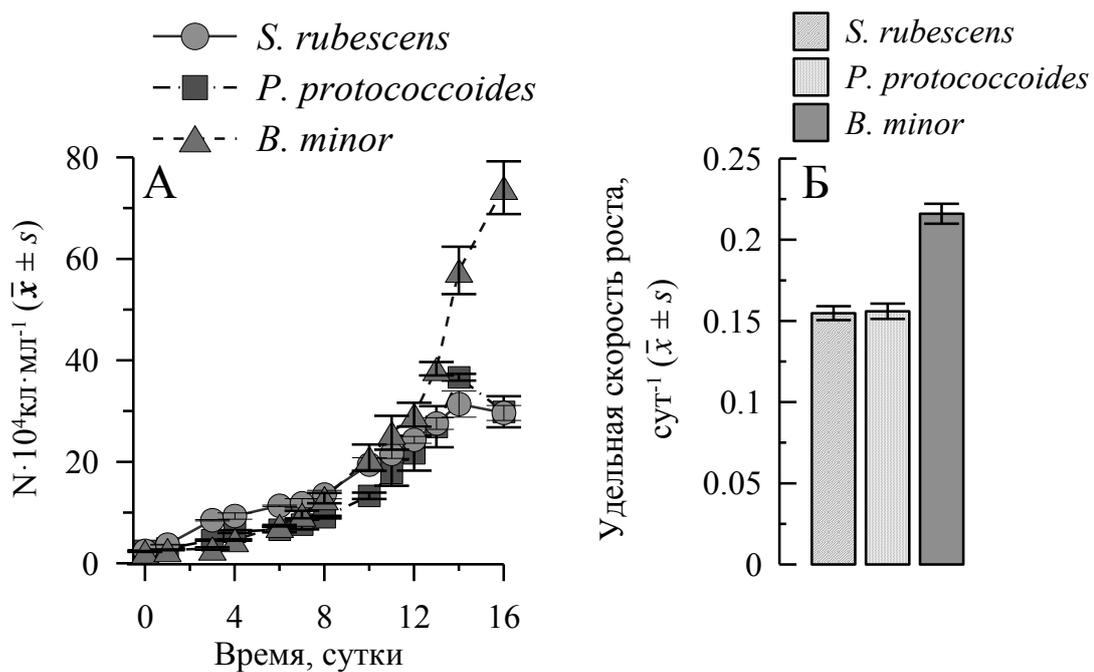


Рис. 4.5 Динамика численности клеток (А) и средняя удельная скорость роста (Б) *S. rubescens*, *P. protococcoides* и *B. minor* на «зелёной» стадии культивирования

Размножение зооспорами, превалирующее у брактеакоккуса на начальной стадии роста культуры, уступило место делению с образованием

апланоспор/автоспор, что, в свою очередь, привело к заметному изменению размерной структуры популяции. Так, на 4-е сут в культуре *B. minor* преобладали недавно осевшие зооспоры ($V=7-40 \text{ мкм}^3$) и молодые вегетативные клетки ($V=50-160 \text{ мкм}^3$), образовавшиеся преимущественно в многочисленных (35 % общего числа) крупных зооспорангиях ($V = 450-1600 \text{ мкм}^3$) в результате деления материнских клеток с образованием зооспор или неподвижных шаровидных клеток (рис. 4.6 б). Постепенное развитие дефицита питания сопровождалось неуклонным снижением числа крупных зооспорангиев вплоть до их полного исчезновения на 16-е сут (рис. 4.6 б). При этом размеры апланоспорангиев уменьшились в 2 - 3 раза и на 16-е сут основу культуры (62 %) составляли мелкие ($V<80 \text{ мкм}^3$), частично агрегированные клетки. Их средний объём уменьшился по отношению к начальному почти в 2 раза (рис. 4.7).



Рис. 4.6 Культура *B. minor* на 4-е (а) и 16-е (б) сут «зелёной» стадии (увеличение 10x40). Шкала 10 мкм

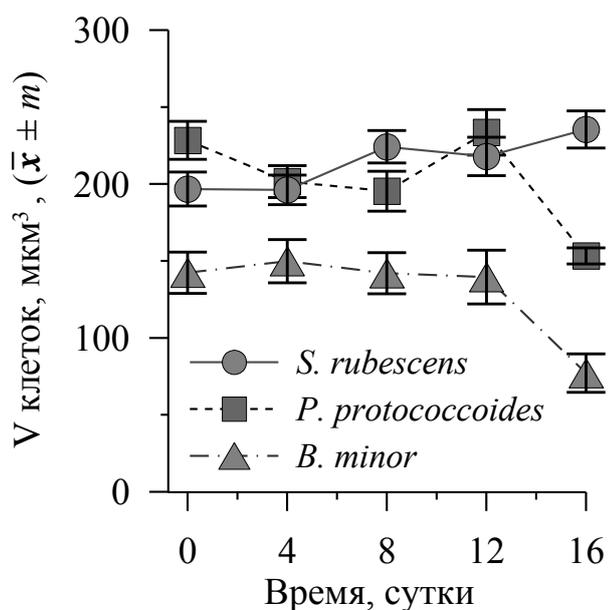


Рис. 4.7 Динамика объёмов клеток водорослей на «зелёной» стадии культивирования

У близкородственных видов *S. rubescens* и *P. protococcoides* на протяжении всей вегетативной стадии преобладало деление с образованием апланоспор. Причем к 16-м сут их средний объём у эдафотильного вида уменьшился в 1,5 раза (рис. 4.7 - 4.8), а у планктонного вида, напротив, даже несколько увеличился (с 197 до 236 мкм³, т.е. \approx в 1,2 раза) (рис.4.7, 4.9).



Рис. 4.8 Культура *P. protococcoides* на 4-е (а) и 16-е сут (б) «зелёной» стадии (увеличение 10x40, 10x63). Шкала 10 мкм

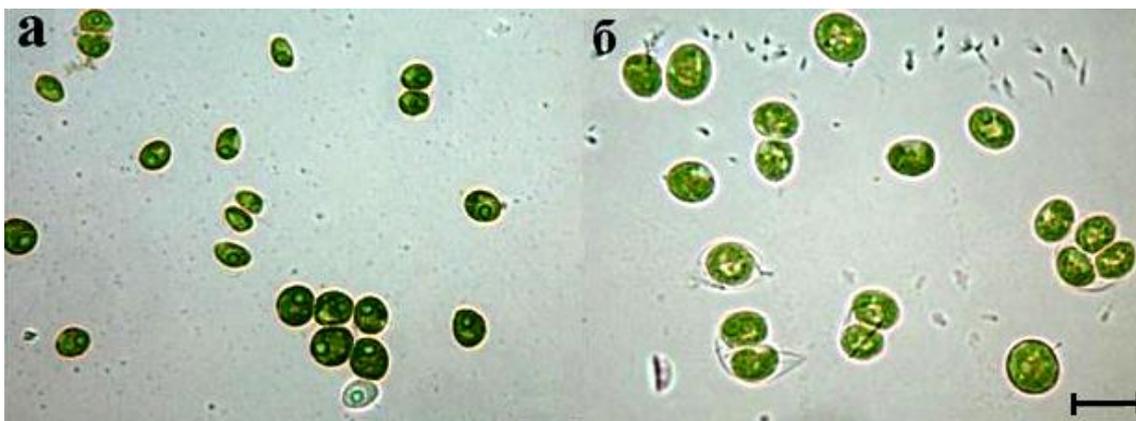


Рис. 4.9 Культура *S. rubescens* на 4-е (а) и 16-е сут (б) «зелёной» стадии (увеличение 10x40, 10x63). Шкала 10 мкм

Рост накопительных культур разных видов, как обычно, сопровождался накоплением в них сухого вещества до $2,5 - 2,9 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$, причём кривые динамики его содержания в расчёте на литр культуры и средняя продуктивность культур по СВ ($P_{\text{ср}} = 0,14 - 0,17 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$) у разных видов были сходны, не смотря на существенные различия в направленности изменений числа и размеров клеток (рис. 4.10 А). В тоже время в расчёте на клетку и единицу объёма клетки, характер динамики содержания СВ у исследованных видов существенно различался. Так, у сценедесмуса среднее содержание СВ в расчёте на клетку и на мкм^3 на протяжении всей стадии менялось так же незначительно, как и размеры самих клеток. Можно лишь отметить незначительное снижение уровня СВ в делящихся клетках по сравнению с клетками инокулята (рис. 4.10 Б, В). В то же время у сильно измельчавшего к концу «зелёной» стадии брактеакоккуса внутриклеточное содержание СВ за период 4-16-е сут снизилось в 3,2 раза (рис. 4.10 Б). Отмеченная динамика, по всей вероятности, была обусловлена как активизацией спорогенеза и связанного с ним уменьшением средних объёмов апланоспор, так и усиленным использованием внутриклеточных резервов на размножение в условиях голодания, на что косвенно указывает снижение среднего содержания СВ в расчёте на мкм^3 объёма клеток (в 1,7 раза) (рис. 4.10 В). В клетках *P. protococcoides* сухое вещество до 8-х сут «зелёной» стадии

интенсивно накапливалось, однако, в дальнейшем, в связи с развитием дефицита элементов питания его содержание упало относительно максимума примерно в 1,8 раза (рис. 4.10 Б, В).

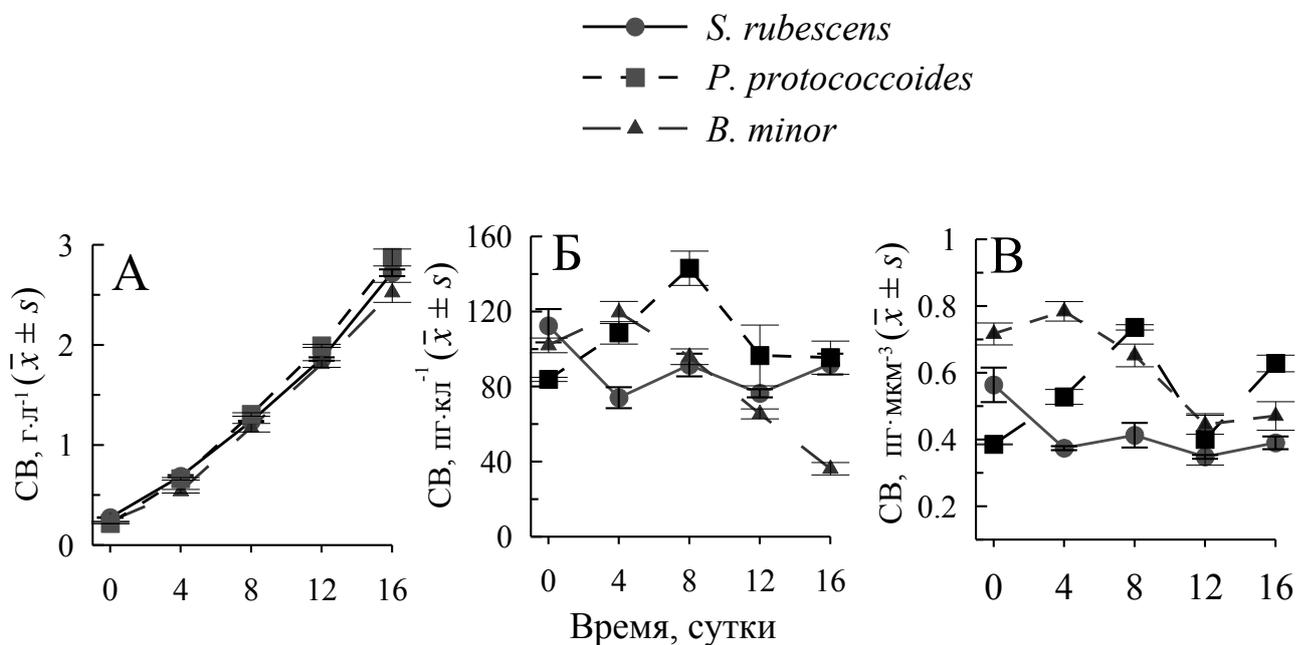


Рис. 4.10 Содержание сухого вещества в культурах (А) и клетках (Б, В) водорослей на «зелёной» стадии культивирования

Характерно, что кривые динамики содержания фотосинтетических пигментов в культурах и клетках у каждого из исследованных видов имели ту же направленность, что и кривые содержания сухого вещества (рис. 4.11, 4.12).

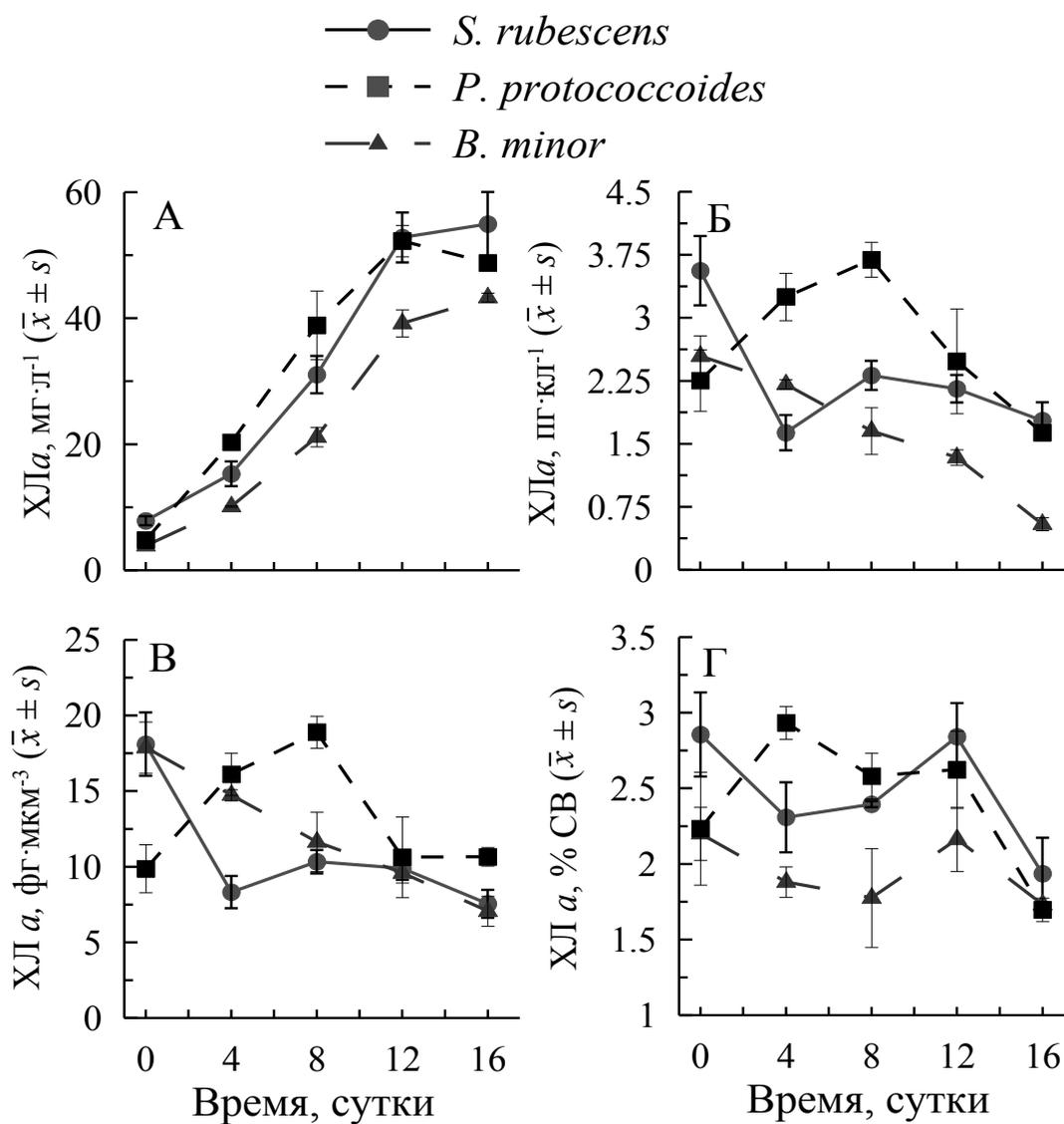


Рис. 4.11 Динамика содержания хлорофилла а в культурах (А), клетках (Б, В) и сухом веществе (Г) микроводорослей на «зелёной» стадии культивирования

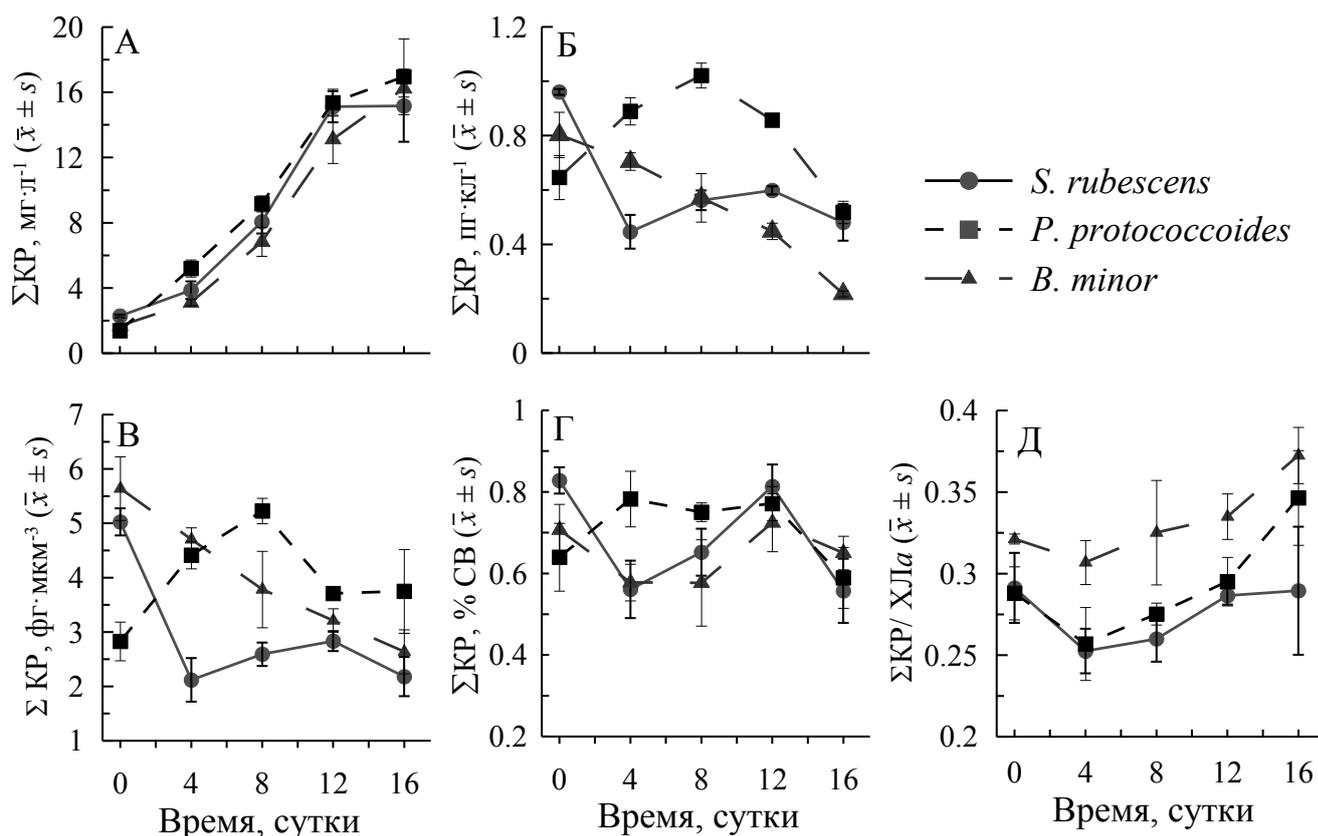


Рис. 4.12 Динамика содержания суммарных каротиноидов (А-Г) и коэффициента $\Sigma\text{КР}/\text{ХЛа}$ (И) в культурах, клетках и сухом веществе микроводорослей на «зелёной» стадии культивирования

На отрезке 1-12-е сут содержание ХЛа и $\Sigma\text{КР}$ в культурах увеличивалось линейно ($R^2 = 0,95-0,99$) (рис. 4.11 А, 4.12 А). Средняя продуктивность по ХЛа в этот период у представителей сем. *Scenedesmaceae* была сходной ($3,7-3,9 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$), в то время как у *B. minor* она была достоверно ниже ($2,9 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$). Средняя продуктивность по $\Sigma\text{КР}$ у всех видов была близкой и составляла $0,95-1,17 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$. В последующие 4 сут в условиях голодания скорость накопления фотосинтетических пигментов во всех культурах снизилась и их содержание в клетках всех водорослей упало до минимума (рис. 4.11 Б, В, 4.12 Б, В). При этом массовая доля ХЛа и $\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ в СВ у всех видов была сходной и сохранялась примерно на одном уровне до 12-х сут, что вовсе не отражало равенство и постоянство физиологического состава клеток, а

являлось следствием однонаправленности векторов изменения СВ и пигментов (рис. 4.11 Г, 4.12 Г).

Особого внимания заслуживают нетипичные для накопительных культур зелёных микроводорослей, но тем не менее чётко выраженные отрицательные тренды содержания ХЛа (рис. 4.11 Б, В) и Σ КР (рис. 4.12. Б, В) в клетках *V. minor*. Такой характер динамики фотосинтетических пигментов на зелёной стадии у продуцентов АСТ отмечен впервые и рассматривается нами на данном этапе исследований водоросли как дискуссионная видоспецифическая характеристика, нуждающаяся в дополнительной экспериментальной проверке и аргументации. Литературные сведения, подтверждающие или опровергающие вероятность такой динамики при лабораторном культивировании видов Chlorophyceae, найти не удалось, за исключением работы испанских исследователей, показавших аналогичное снижение содержания Σ КР в клетках *Chlorella zofingiensis* (\approx в 2 раза) на фоне их массивного накопления в растущей культуре [38]. Авторы выращивали водоросль на модифицированной среде Арнона, в которой концентрация азота (N) и фосфора (P) была выше в 2,3 раза, чем в среде ВВМ 3N. Тем не менее, падение уровня Σ КР в клетках началось уже на 4-е сут, что, как и в нашем случае, не позволяет интерпретировать эти данные в связи с дефицитом питания. Следует отметить, что у *C. zofingiensis* перманентное снижение уровня Σ КР в клетках сопровождалось одновременным накоплением АСТ.

Совсем иной ход изменений внутриклеточного содержания пигментов был отмечен у водорослей семейства *Scenedesmaceae*. У *S. rubescens* к 4-м сут роста культуры содержание пигментов в расчёте на целую клетку и мкм^3 существенно снизилось (в 2 - 2,5 раза) параллельно снижению внутриклеточного содержания СВ, а затем до конца «зелёной» стадии поддерживалось примерно на одном уровне (рис. 4.11 Б, В, 4.12 Б, В). В клетках *P. protococcoides*, в отличие от двух других видов, содержание пигментов на начальной стадии культивирования (до 8-х сут) увеличивалось (\approx в 1,6-1,8 раза по отношению к уровню в инокуляте), а

затем уменьшилось к концу «зелёной» стадии примерно в 2 раза вследствие обострения дефицита биогенов (рис. 4.11Б, В; 4.12Б, В).

Примечательно, что, при такой несогласованности описанных событий, направленность динамики коэффициента $\Sigma\text{КР}/\text{ХЛа}$ (рис. 4.12 Д) у всех трёх водорослей была сходной и характерной для всех продуцентов АСТ в условиях двухстадийной культуры - с 4-х по 16-е сут его величины медленно, но неуклонно увеличивались, указывая на ухудшение условий среды и начавшуюся подготовку клеток к переходу в покоящуюся стадию [6, 22, 33, 56, 140, 159].

4.3. Динамика физиолого-биохимических характеристик у различных видов *Scenedesmales* на «красной» стадии культивирования

4.3.1. Динамика численности и размеров клеток сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования

Одним из ключевых моментов, определяющих конечный результат выращивания продуцентов АСТ методом двухстадийной накопительной культуры, является выживаемость клеток в результате стресс-воздействия, индуцирующего биосинтез ККР. В зависимости от его интенсивности и времени приложения (фазы роста культуры) потери биомассы, полученной в конце «зелёной» стадии, могут достигать 40-50%. Такая высокая смертность характерна, например, для *H. pluvialis* при совместном использовании NaAc и NaCl для активации биосинтеза АСТ [22]. В тоже время, у ряда других каротиногенных наземных микроводорослей (*Scotiellopsis rubescens*, *Chlorococcum granatum*, *Chlorella zofingiensis*, *S. rubescens*) при сходном способе индукции ВКРГ численность клеток на II стадии не снижалась [33], а у *Ettlia carotinos* даже существенно увеличивалась [32].

Результаты, характеризующие влияние ацетата натрия на динамику численности клеток исследуемых водорослей на «красной» стадии

культивирования, представлены на рис. 4.13. Прежде всего, следует отметить общую для всех трёх видов особенность - ни в одной из контрольных или ацетатных культур не было отмечено массового отмирания клеток или стрессовой активизации споруляции, сопровождающейся существенным уменьшением размеров апланоспор. Наиболее устойчивым к ацетату оказался планктонный вид *S. rubescens*, у которого численность клеток, как в контрольном, так и в опытном варианте, сохранялась на исходном уровне на протяжении всего постстрессорного периода (рис. 4.13 А).

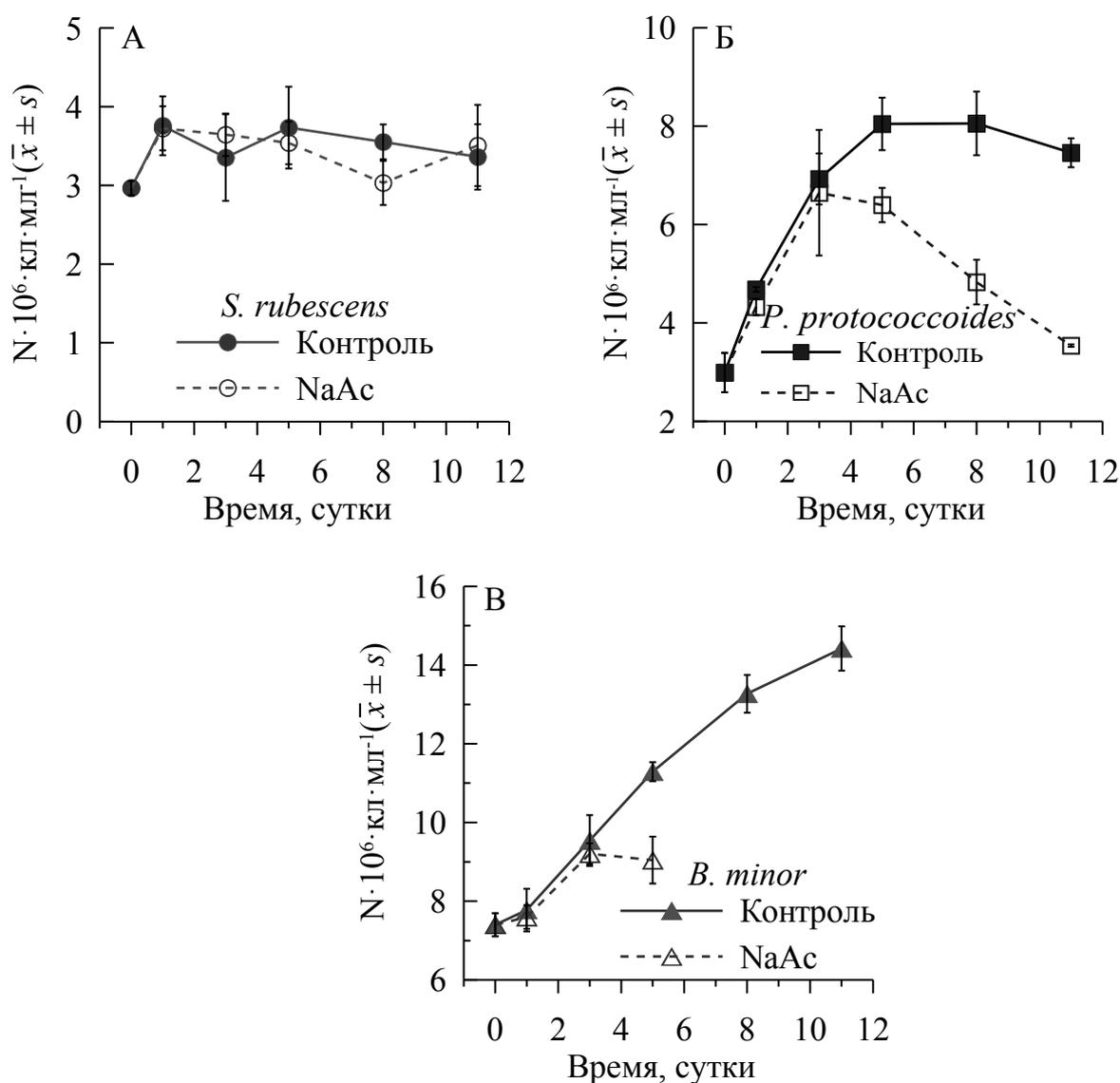


Рис. 4.13 Динамика численности клеток *S. rubescens* (А), *P. protococcoides* (Б), *B. minor* (В) на «красной» стадии культивирования

Совершенно иная картина наблюдалась в культурах близкородственной наземной водоросли *P. protococoides* (рис. 4.13 Б). В ответ на стресс-воздействие часть клеток в обоих вариантах эксперимента поделилась путем схизогонии, в результате чего численность апланоспор в контроле и опыте за первые трое суток увеличилась примерно в 2,2-2,3 раза. В последующие дни активность деления в контроле заметно снижалась, а в культурах, стрессированных ацетатом, существенно увеличивалось число мёртвых клеток. В результате этого к концу «красной» стадии плотность ацетатных культур приблизилась к начальной и была вдвое ниже, чем в контроле.

Третий тип реакции на ацетат был зарегистрирован в культурах *B. minor*. Ранее на этом же штамме было показано, что NaAc (0,05M) в сочетании с NaCl (0,17 M) вызывает массовую смертность в молодых культурах (6 сут) *B. minor* [28]. Исключение из стресс-комплекса NaCl и перенесение сроков индукции ВКРГ с 6-х сут на 16-е сут частично смягчило остроту стресс-воздействия, но не устранило полностью нежелательный побочный эффект ацетата, проявившийся уже на 3-и сут в склеивании клеток в плотные хлопьевидные скопления (рис. 4.14).



Рис. 4.14. Агрегирование клеток *B. minor* в присутствии NaAc на 5-е сут. «красной» стадии культивирования

Агрегированные клетки активно накапливали каротиноиды, однако диспергировать образовавшиеся скопления в пробах, отобранных для анализа, не удавалось даже при помощи продувки суспензий аквариумным воздушным компрессором с производительностью $9 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1}$ (Sera 550R). Это обстоятельство сделало невозможным корректное определение численности клеток в ацетатных культурах *B. minor* как при помощи цитометра, так и в камере Горяева. В связи с этим здесь и далее на рисунках, характеризующих постстрессорные изменения физиолого-биохимических показателей состояния водоросли в расчёте на клетку и мкм^3 , данные для этого варианта представлены фрагментарно. В контроле ни агрегирования, ни массовой смертности клеток на «красной» стадии не наблюдалось. Постепенно краснеющие клетки продолжали делиться, и к окончанию периода наблюдений их численность выросла в 2 раза (рис. 4.13 В).

К характерным последствиям экспериментально индуцированного ВКРГ у всех трёх сценедесмальных микроводорослей следует отнести существенное увеличение средних объёмов клеток при их переходе из вегетативного состояния в стадию покоя (рис. 4.15). Так, в культурах *S. rubescens* на фоне прекращения деления средний объём апланоспор за 11 сут увеличился в контроле с 235 мкм^3 до 621 мкм^3 (в 2,6 раза), а в присутствии ацетата до 887 мкм^3 (в 3,4 раза) (рис. 4.15 А). Аналогичное явление наблюдалось и у *P. protococcoides*, однако после 6-х суток объём образующихся спор в обоих вариантах начал постепенно уменьшаться, хотя в конце «красной» стадии он все же превысил объём спор вегетативных клеток \approx в 2 раза (рис. 4.15 Б). Аналогичный размах варьирования средних объёмов спор зарегистрирован и у мелкоклеточного *B. minor*, хотя по характеру динамики процесса этот вид был более близок к *S. rubescens* (рис. 4.15 В). Следует отметить, что во всех случаях ацетат способствовал образованию более крупных апланоспор.

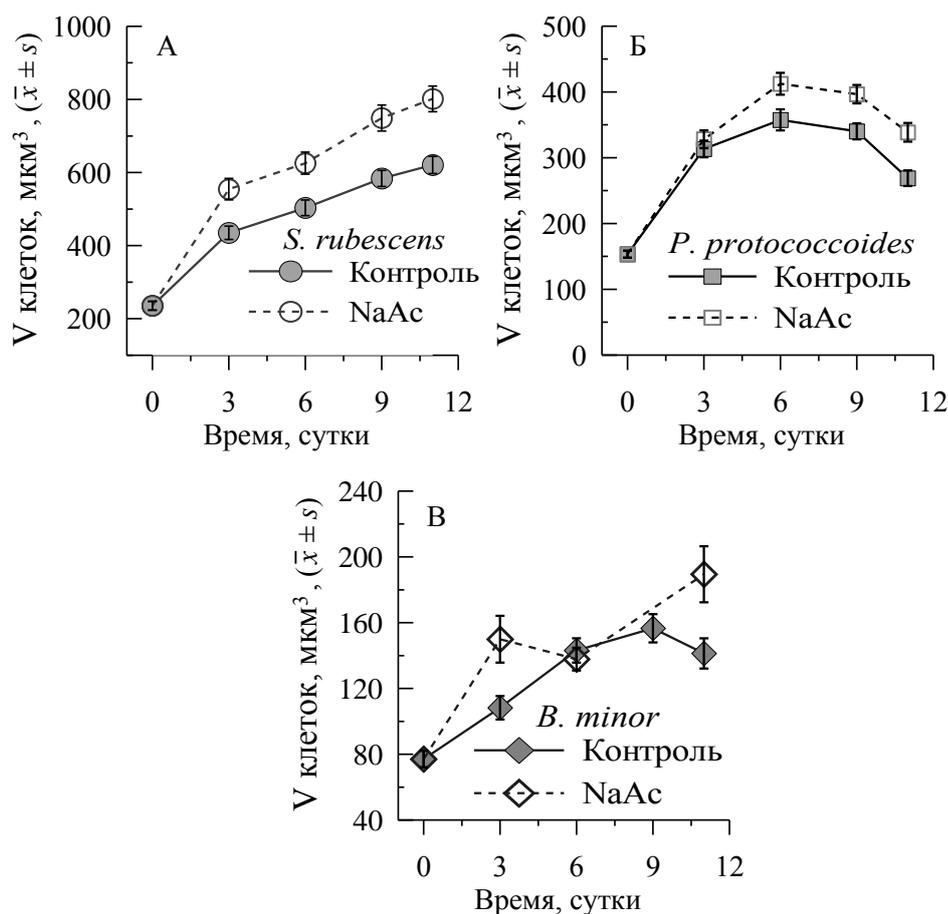


Рис. 4.15 Динамика средних объёмов клеток *S. rubescens* (А), *P. protococcoides* (Б), и *B. minor* (В) на «красной» стадии культивирования

4.3.2. Динамика содержания хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов в культурах, клетках и биомассе сценедесмальных водорослей на «красной» стадии культивирования

Динамика содержания пигментов в клетках всех трёх сценедесмальных водорослей на «красной» стадии была типичной для всех продуцентов АСТ в условиях абиотического стресса [56, 147, 159]. Массивное накопление ВКР происходило на фоне резкого снижения содержания ХЛа в клетках (рис. 4.16). Направленность динамики содержания пигмента у всех видов при всех способах выражения его концентрации была сходной, однако по масштабам деградации хлорофилла безусловно лидировал *P. protococcoides*, у которого

уровень ХЛ a в расчёте на литр культуры снизился в 8 раз, а в расчёте на мкм³ клеточного объёма и массовую долю в % СВ – в 44-45 раз.

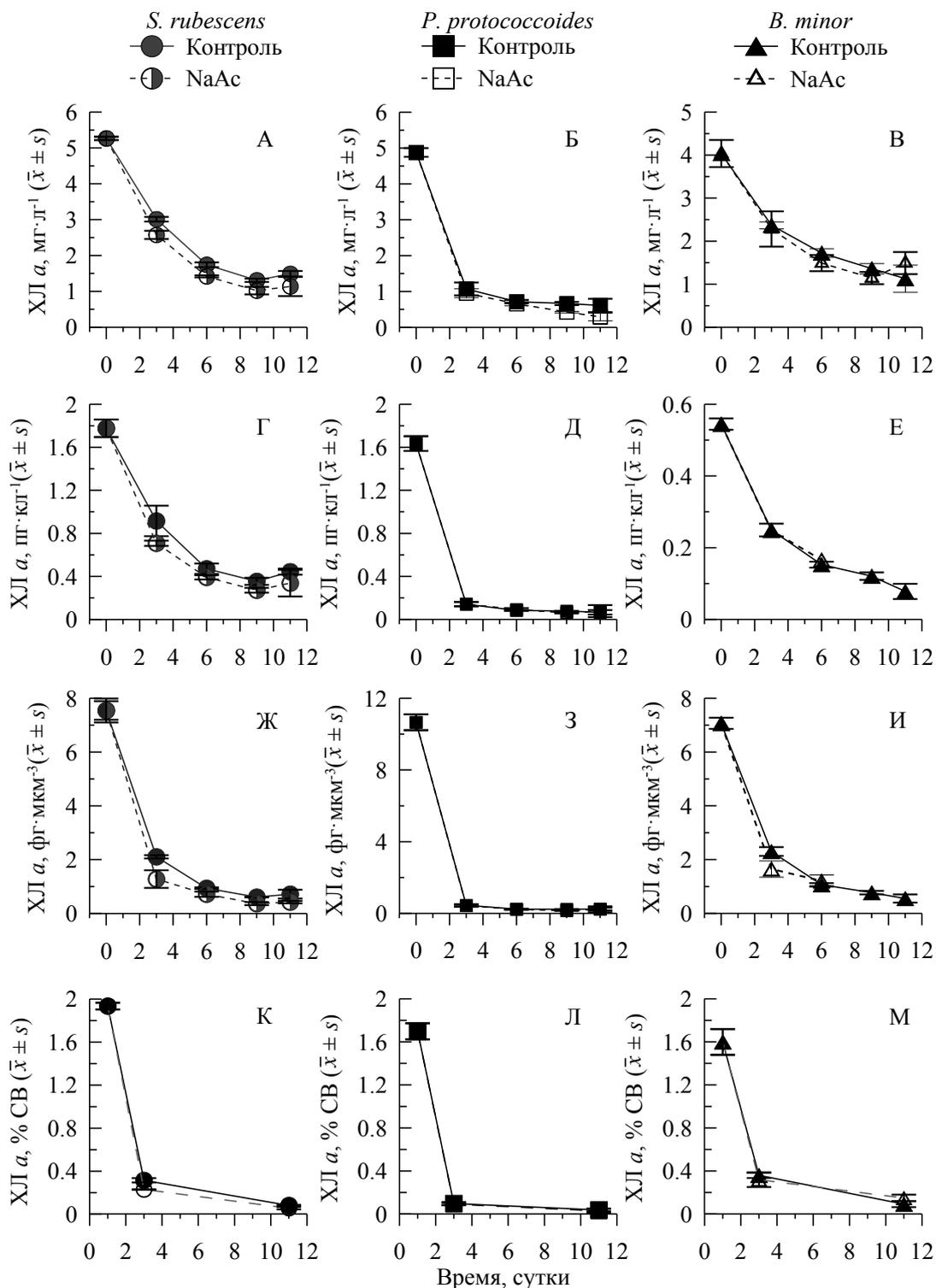


Рис. 4.16 Динамика содержания хлорофилла a у сценедесмальных водорослей на стадии индуцированного вторичного каротиногенеза («красной» стадии)

У *S. rubescens* и *B. minor* аналогичные изменения были менее драматичными – содержание ХЛа в культурах сократилось в 3,5 и 3,6 раза, в единице объёма – в 10,6 и 12,8 раза, а в сухом веществе – в 12,3 и 17,4 раза, соответственно. Анализируя ход динамики содержания ключевого фотосинтетического пигмента в клетках сценедесмальных видов при стресс-индукции ВКРГ, следует отметить две особенности: а) беспрецедентно низкие величины массовой доли ХЛа в СВ в конце «красной» стадии, составлявшие сотые доли процента СВ (0,03-0,09 %) и б) отсутствие выраженного отрицательного влияния NaAc на ход этого процесса, характерного для многих зелёных микроводорослей [22, 32, 33].

Численные значения анализируемых показателей в большинстве параллелей «контроль»-«ацетат» достоверно не различались, хотя у *S. rubescens* все же можно отметить слабо выраженную тенденцию усиления стресс-реакции в присутствии NaAc.

Кривые динамики содержания Σ КР на «красной» стадии в 10-кратно разбавленных культурах водорослей, являющиеся результирующими процессов деградации фотосинтетических КР в хлоропластах и накопления ВКР в цитоплазме клеток в постстрессорный период, представлены на рис. 4.17 А.

И в этом случае *P. protococcoides* существенно отличался от двух других представителей порядка Scenedesmales Kostikov. Среднесуточная продуктивность (P_{cp}) по Σ КР (0,06-0,07 мг·л⁻¹·сут⁻¹) здесь была ниже, чем у близкородственного, лидирующего по данному признаку *S. rubescens* (0,43-0,48 мг·л⁻¹·сут⁻¹) в 5,8 раз (в контроле) и 7,4 раза (в варианте «ацетат»). При этом второй наземный вид – *B. minor* – лишь немногим уступал по этому показателю планктонному лидеру. Его P_{cp} по Σ КР составляла $0,35 \pm 0,001$ мг·л⁻¹·сут⁻¹ (контроль) и $0,32 \pm 0,05$ мг·л⁻¹·сут⁻¹ (ацетат) (рис. 4.18).

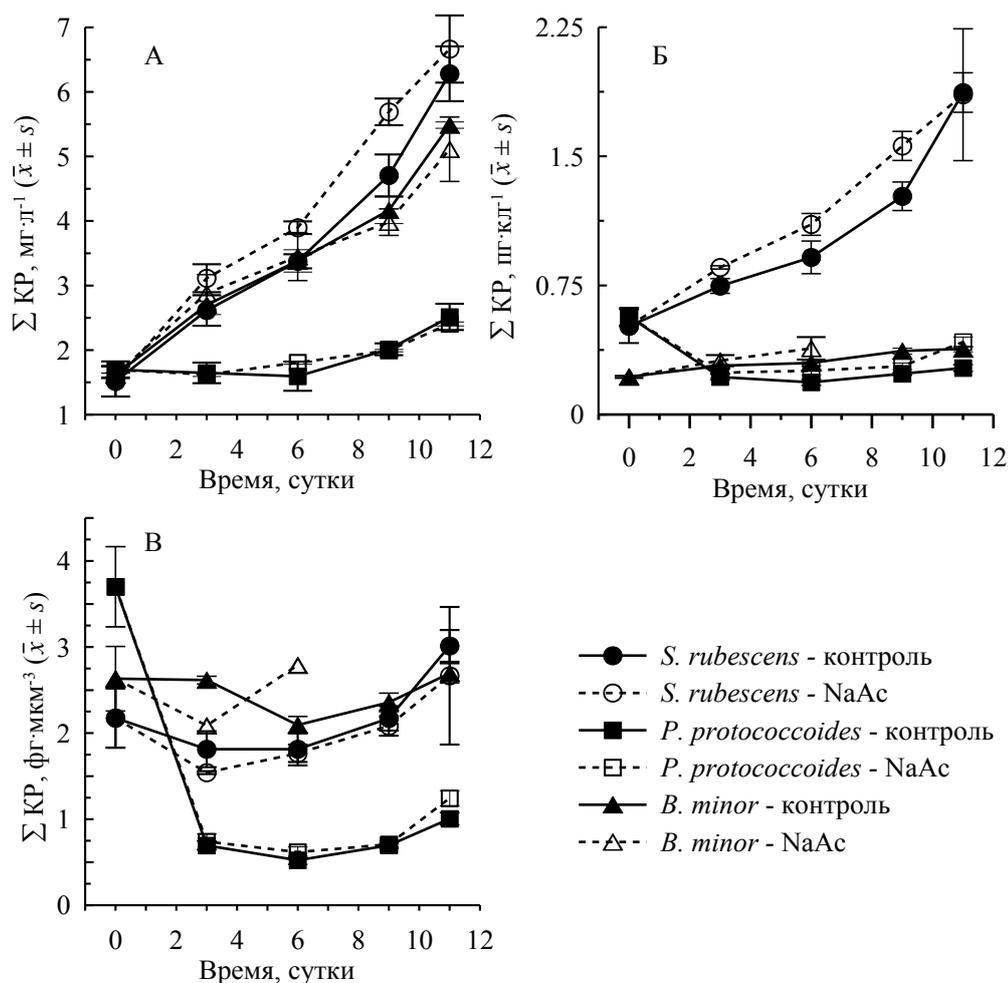


Рис. 4.17 Динамика содержания суммарных каротиноидов в культурах (А), клетках (Б) и $\mu\text{м}^3$ клеточного объёма (В) у *S. rubescens*, *P. protococcoides* и *B. minor* на «красной» стадии культивирования

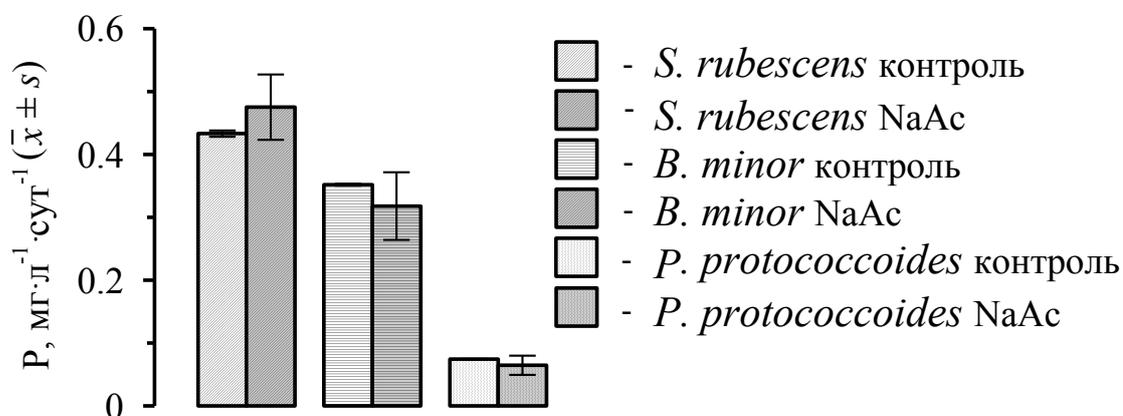


Рис. 4.18 Средняя продуктивность культур сценедесмальных микроводорослей по суммарным каротиноидам на «красной» стадии культивирования

Анализ динамики содержания Σ КР в расчёте на клетку (рис. 4.17 Б) и мкм^3 клеточного объёма (рис. 4.17 В) ещё раз подтверждает наблюдение, сделанное нами ранее при исследовании ВКРГ у *E. carotinos*. Распространённый способ сопоставления интенсивности этого процесса у разных видов по скорости накопления пигментов Σ КР в расчёте на целую клетку может привести к ошибочным результатам вследствие существенного варьирования размеров клеток как у разных видов, так и у одного и того же вида на разных стадиях стресс-реакции. В таких случаях полезно использовать для сравнения такой дополнительный параметр как скорость накопления ВКР в мкм^3 . Так, сопоставление данных по динамике содержания Σ КР у *Scenedesmales*, полученных с применением трёх вариантов выражения их концентрации, с данными по динамике численности и размеров клеток на «красной» стадии, позволяет сделать следующие заключения. В культурах *S. rubescens* пул Σ КР формировался, главным образом, за счёт 3-4-х кратного увеличения размеров апланоспор, так как их количество на стадии ВКРГ практически не менялось и содержание Σ КР в единице объёма клетки заметно увеличилось лишь на заключительном отрезке культивирования (9-11-е сут).

В культурах *B. minor* (в варианте контроль) объёмное содержание пигментов (в расчёте на мкм^3) также изменялось незначительно и конечное содержание Σ КР определялось, в основном, 2-х кратным увеличением числа и объёмов клеток. Наименее выраженная картина ВКРГ – всего лишь полуторное возрастание уровня Σ КР в культурах *P. protococcoides* – была, по всей вероятности, опосредована существенно более низкой, чем у других видов, скоростью биосинтеза ВКР. На это указывает резкое падение в стрессированных клетках содержания Σ КР в мкм^3 в 1-3-и сут и достоверно более низкий уровень каротиноидов (в 2,6 - 4 раза) протяжении всей «красной» стадии. В результате, не смотря на значительный прирост числа и объёмов клеток, конечное содержание пигментов в литре культуры здесь было самым низким (в 3,0 и 2,7 раза ниже, чем у *S. rubescens* и *B. minor*, соответственно).

В то же время по характеру динамики отношения $\Sigma\text{КР}/\text{ХЛ}a$ в контрольных культурах низкопродуктивный по $\Sigma\text{КР}$ *P. protococcoides* не отличался от более продуктивных видов (рис. 4.19). Численное значение коэффициента, в данном случае, больше, чем у других видов, зависело от скорости деградации ХЛa. У *P. protococcoides* она была примерно в полтора раза выше – $0,95 \pm 0,04$ фг·мкм³·сут⁻¹ против $0,59 \pm 0,02$ фг·мкм³·сут⁻¹ у *B. minor* и $0,62 \pm 0,03$ фг·мкм³·сут⁻¹ у *S. rubescens* (рис. 4.17).

Не отражал этот коэффициент и интенсивность ВКРГ в вариантах, стрессированных ацетатом. Кривая динамики его численных значений в культурах *B. minor* лежит существенно ниже кривой *P. protococcoides*, хотя среднесуточная скорость накопления $\Sigma\text{КР}$ у брактеакококкуса была в 4,9 раза выше (рис. 4.18). Эти сопоставления ставят под сомнение универсальность коэффициента $\Sigma\text{КР}/\text{ХЛ}a$.

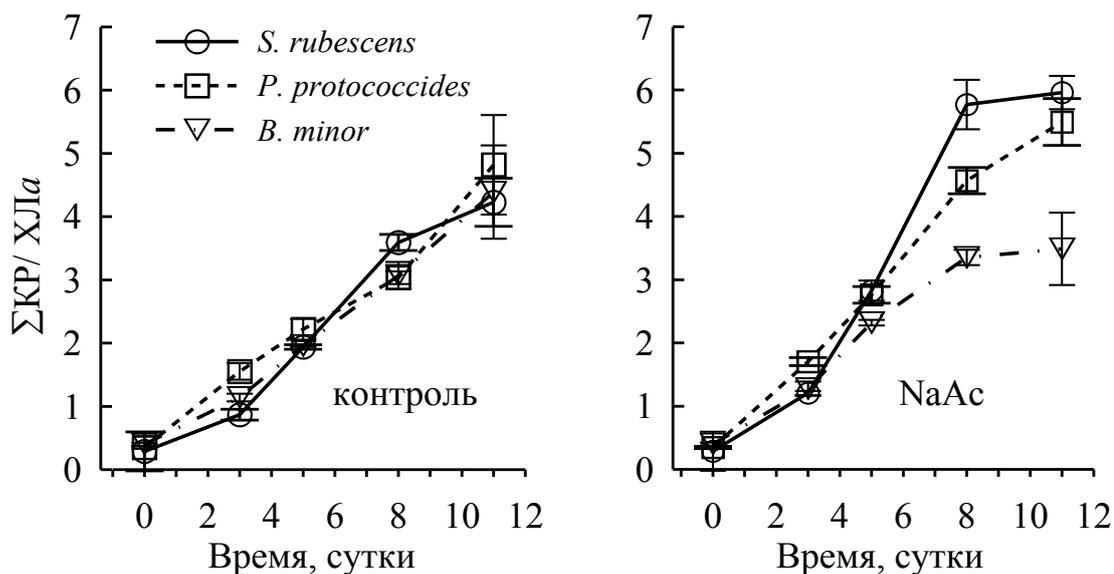


Рис. 4.19 Динамика отношения $\Sigma\text{КР}/\text{ХЛ}a$ у сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования

Еще одна особенность сценедесмальных видов, отличающая их от микроводорослей порядка Volvocales *E. carotinos* (рис. 3.7) и *H. pluvialis* [31], состоит в существенном снижении массовой доли $\Sigma\text{КР}$ в СВ, опосредованном,

по всей вероятности, превышением скорости деградации первичных каротиноидов над скоростью накопления вторичных каротиноидов (рис. 4.20). При этом наиболее высокое содержание Σ КР в СВ отмечено в конце «красной» стадии и Σ КР на заключительной стадии.

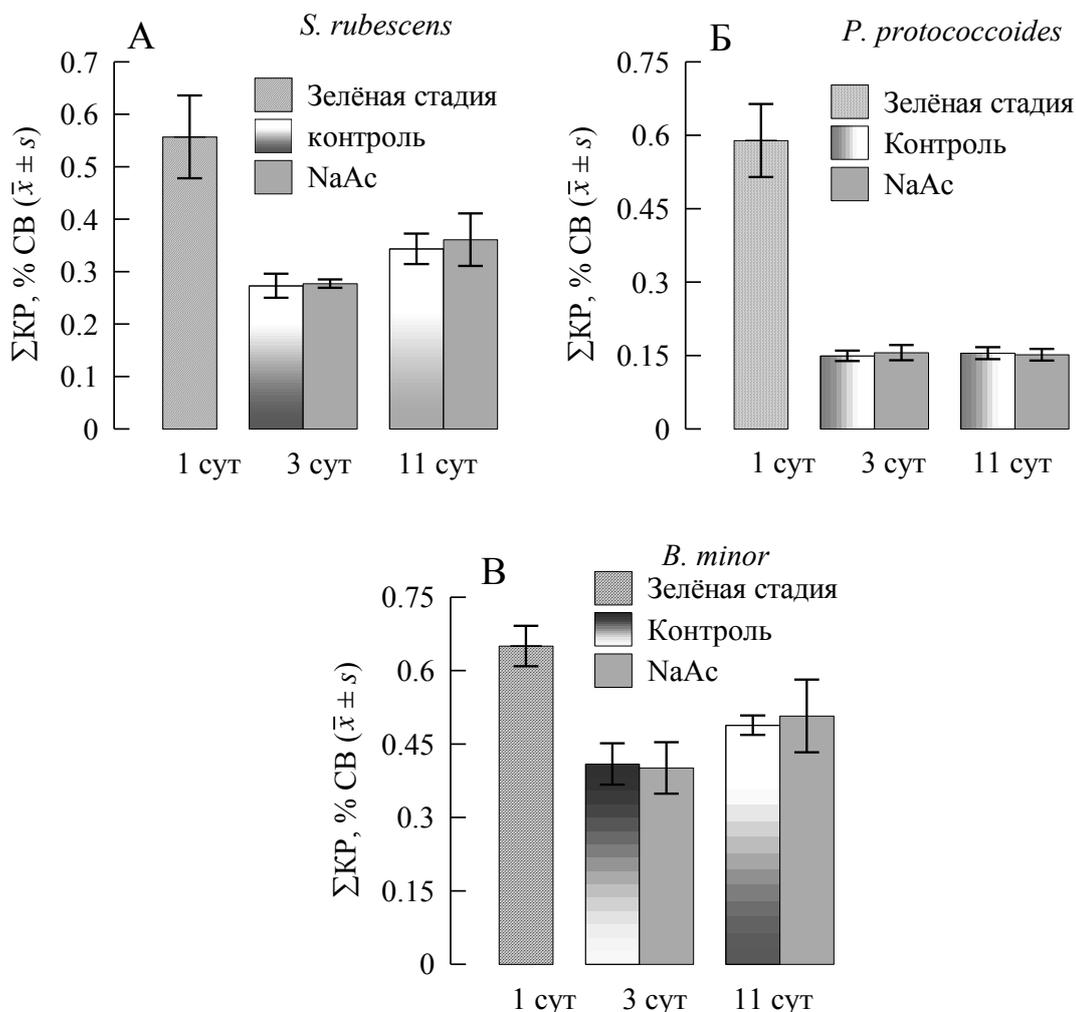


Рис. 4.20 Содержание суммарных каротиноидов в сухой биомассе *S. rubescens*, *P. protococcoides* и *B. minor* в конце «зелёной» и «красной» стадий культивирования

Теоретический выход Σ КР из литра исходной культуры с начальной численностью клеток $2,0-2,2 \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹ у *S. rubescens* составил $1,76 \pm 0,02$ в контроле и $1,93 \pm 0,21$ мг·л⁻¹·сут⁻¹ в присутствии NaAc, у *B. minor* $1,43 \pm 0,01$ и $1,29 \pm 0,21$ мг·л⁻¹·сут⁻¹ (рис. 4.21), соответственно, что сопоставимо с

эдафобильными водорослями порядка Scenedesmales *B. giganteus* [28] и *Scotiellopsis rubescens* [36]. Выход суммарных каротиноидов у *P. protococcoides* составили $0,31 \pm 0,01$ и $0,26 \pm 0,06$ мг·л⁻¹·сут⁻¹. Однако, такое серьёзное преимущество *S. rubescens*, как выход Σ КР, частично нивелируется при анализе их фракционного состава в конечной биомассе водорослей.

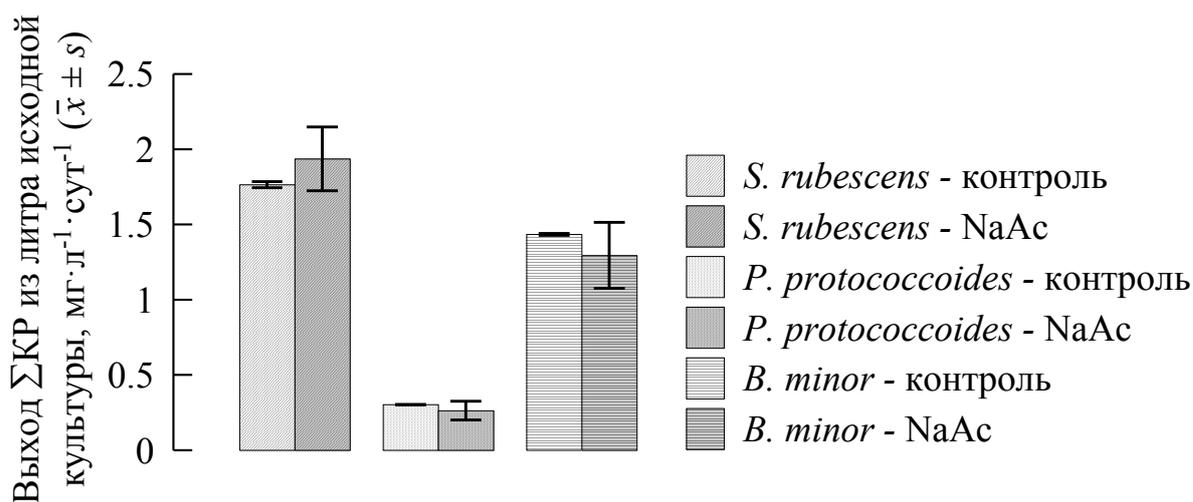


Рис. 4.21 Теоретический выход суммарных каротиноидов из литра исходной культуры у *S. rubescens*, *P. protococcoides* и *B. minor*

4.3.3. Особенности фракционного состава вторичных каротиноидов у сценедесмальных микроводорослей

Наиболее характерной чертой фракционного состава ВКР у всех исследованных сценедесмальных микроводорослей, отличающей их от представителей порядка Vocales *H. pluviialis* и *E. carotinos*, является более полный набор интермедиатов биосинтеза АСТ из β-каротина. По многочисленным литературным данным, у *H. pluviialis* каротиноиды красных апланоспор на 95-99 % представлены моно- и диацильными эфирами АСТ, а промежуточные продукты биосинтеза АСТ обнаруживаются лишь в следовых и, реже, минорных количествах [13, 22, 23, 55, 56, 111, 141, 174, 210 и др.]. В составе ВКР *E. carotinos*, также как и у *H. pluviialis*, доминируют моноэфиры АСТ (табл. 3.2), однако их доля в Σ КР не

столь значительна (63-67 %), так как в смеси ВКР в заметных количествах присутствуют другие интермедиаты, из которых наиболее весомыми являются КАН ($\approx 6\%$ от Σ КР) и АДР (в форме эфиров) (11-12 % от Σ КР). У исследованных в данной работе сценедемальных микроводорослей состав ВКР оказался намного сложнее, чем у этлии – помимо вышеупомянутых предшественников АСТ, у них количественно регистрируются моноэфиры адониксантина (АДК), эхиненон (ЭХ), свободный адонирубин, адониксантин и астаксантин. Два последних КР в использованных системах растворителей, имеют близкие R_f , что затрудняет индивидуальный анализ этих фракций. Поэтому в табл. 4.1 приведено их суммарное содержание. В отдельных случаях для предварительной оценки суммарной доли всех форм АСТ в общих КР у разных видов и выхода АСТ из литра исходной культуры использовали основанное на визуальных оценках допущение, согласно которому АСТ и АДК содержались в смеси в соотношении 1:1 (рис. 4.22).

Анализируя результаты определения фракционного состава КР в конце «красной» стадии культивирования у представителей разных семейств Scenedesmales (табл. 4.1), следует, прежде всего, отметить одну общую для всех трёх видов особенность – наличие заметного количества адониксантина (АДК), отсутствующего у *E. carotinosus*. Причём и у *S. rubescens*, и у *P. protococcoides* АДК присутствовал, главным образом, в свободной форме в смеси со свободным АСТ. Их суммарное относительное содержание достигало необычно высоких величин – 23,6-31,8 % от Σ КР – и достоверно увеличивалось в присутствии ацетата. Необходимо еще раз отметить, что свободные гидроксированные кетокаротиноиды (АСТ, АДК и АДР) у водорослей обычно регистрируют в минорных или следовых количествах. Основной формой их запасания являются моно- и реже диэфиры жирных кислот [13, 14, 28, 33], что вполне соответствует известным представлениям о том, что вещества липидной природы со свободными реакционными группами не могут накапливаться в живых клетках в больших количествах без негативных последствий для структурной организации клеточных мембран и поэтому запасаются в составе эфиров или белково-углеводных

комплексов [16, 20, 147]. Тем не менее, описанный выше факт преимущественного накопления АСТ в свободном виде не является единичным, и был отмечен в еще более яркой форме у аэрофильной водоросли *Chlorococcum* sp., у которой в присутствии H_2O_2 его содержание достигало 81 % от суммы всех форм АСТ [157]. Объяснить такие результаты можно лишь способностью микроводорослей связывать гидроксильные группы КР в составе гликозидов или каротинпротеиновых комплексов [203].

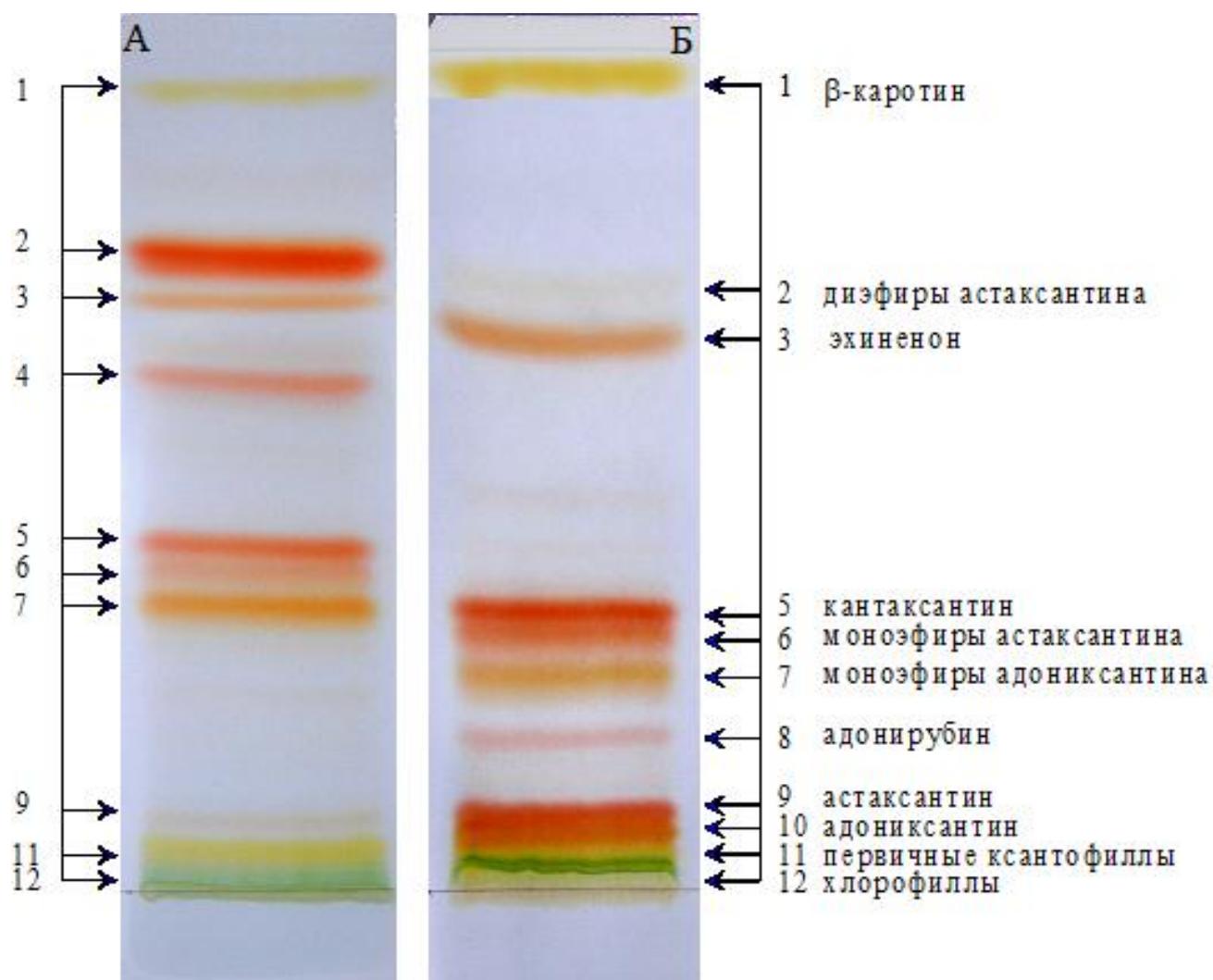


Рис. 4.22 Тонкослойная хроматограмма *B. minor* (А) и *S. rubescens* (Б) на пластинках «TLC Silica gel 60» (Merck, Германия) в двух системах растворителей. I - гексан-ацетон 9 : 1, II - гексан-бензол-ацетон 5 : 3,75 : 0,8 [24].

Таблица 4.1

Фракционный состав каротиноидов в клетках микроводорослей в конце «красной» стадии двухстадийной накопительной культуры (% от Σ КР, ($\bar{x} \pm s$))

Фракция	<i>S. rubescens</i>		<i>P. protococcoides</i>		<i>B. minor</i>	
	Контроль	NaAc	Контроль	NaAc	Контроль	NaAc
1	2	3	4	5	6	7
Моноэфиры астаксантина	10,42 ± 0,35	7,89 ± 0,67	32,61 ± 3,36	30,58 ± 2,70	5,17 ± 1,38	9,16 ± 1,20
Диэфиры астаксантина	следы	следы	7,00 ± 2,25	4,02 ± 0,38	42,34 ± 2,81	38,74 ± 3,85
Моноэфиры адониксантина	8,53 ± 1,02	4,99 ± 0,24	2,48 ± 0,96	0,72 ± 0,16	15,81 ± 1,17	17,51 ± 0,90
Эфиры адонирубина	следы	следы	следы	следы	5,28 ± 1,53	6,7 ± 0,36
Сумма свободного астаксантина и адониксантина	23,62 ± 2,32	31,81 ± 0,84	25,50 ± 4,43	23,57 ± 2,35	следы	следы
Кантаксантин	14,22 ± 1,13	8,99 ± 1,04	12,60 ± 1,04	17,08 ± 2,46	13,15 ± 0,66	11,51 ± 0,98
Эхиненон	8,86 ± 1,35	7,46 ± 1,19	следы	следы	9,19 ± 1,06	5,38 ± 0,83

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6	7
Адолирубин	2,27 ± 0,26	2,01 ± 0,80	следы	следы	следы	следы
Сумма минорных н/идент. КР	5,53 ± 1,10	6,75 ± 1,44	следы	следы	5,43	10,14 ± 2,27
β- каротин	30,57 ± 0,64	34,00 ± 1,44	2,68 ± 0,50	2,37 ± 0,41	3,98 ± 0,64	3,57 ± 0,58
Сумма первичных ксантофиллов	следы	следы	17,16 ± 3,41	21,66 ± 1,39	следы	следы
ККР, % от суммы	64,51 ± 5,65	62,27 ± 3,37	79,37 ± 5,55	75,96 ± 1,57	93,31 ± 4,68	91,10 ± 1,97
Сумма всех форм астаксантина*	22,23 ± 0,50	22,90 ± 2,23	52,36 ± 5,47	46,55 ± 2,62	46,22 ± 0,80	47,90 ± 3,18

Примечание. *- предварительная оценка, основанная на допущении о равноценном содержании АСТ и АДК в объединённой фракции

Ещё одной общей чертой фракционного состава ВКР *Scenedesmales* является присутствие у всех трёх видов значительного количества дикетокaroteина кантаксантина (β,β -каротин-4,4'-дион) (КАН) (11,5-17,1 % от Σ КР), указывающее на активное функционирование начальной стадии метаболического пути биосинтеза АСТ через эхиненон (β -каротин \rightarrow эхиненон \rightarrow кантаксантин \rightarrow адонирубин \rightarrow атаксантин) [102, 123, 147]. При этом у *S. rubescens* и *P. protococcoides* дальнейшая трансформация КАН в АСТ была, вероятно, ингибирована, так как следующее звено этой цепи – АДР – обнаруживалось лишь в следовых или минорных количествах. Относительно высокое содержание эфиров АДР у *B. minor* могло определяться оксигенацией 3- и 3'-гидрооксиэхиненона, катализируемой неспецифическими 4,4'- β -каротинкетозазами (CRTO).

Отдельного обсуждения заслуживает специфическая особенность ВКРГ у *S. rubescens*, отличающая его от всех других объектов исследования, а именно - аномально высокое относительное содержание бета-каротина (БК) в КР (30,6 - 34 %) на фоне самого низкого уровня АСТ (табл. 4.1). У большинства видов *Chlorophyceae*, исследованных в рамках скрининга потенциальных продуцентов ККР, проводимого в ИнБЮМ [27], БК определялся в «красной» биомассе или как минорный компонент (<3 % Σ КР [13]), или в концентрациях, не превышающих 8-12 % Σ КР [14, 33]. Следует отметить, что хотя динамику содержания фракций на стадии ВКРГ в данном исследовании мы не определяли, судить о том, что БК действительно накапливался в клетках *S. rubescens* можно по результатам предварительного эксперимента, показавшего в сходных условиях постепенное 2-х кратное увеличение доли БК в Σ КР на «красной» стадии с 10,1 до 21,0 % (рис. 4.23).

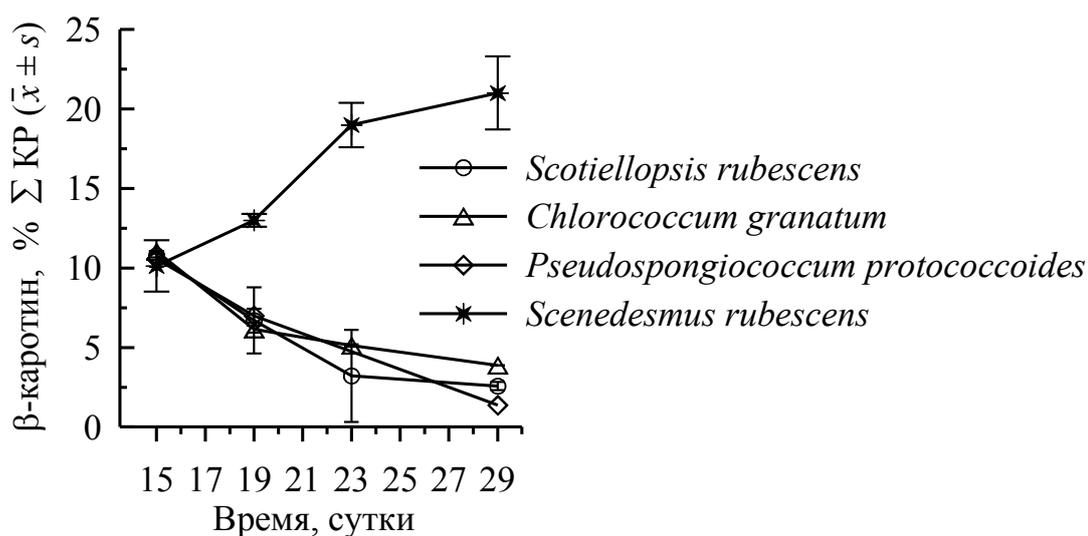


Рис. 4.23 Динамика относительного содержания β -каротина у сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии при индукции ВКРГ ацетатом (50 мМ) и хлоридом натрия (17 мМ)

Высокое относительное содержание β -каротина плохо согласуется с современными представлениями о синтезе АСТ у микроводорослей, в котором БК играет роль ключевого субстрата. Считается доказанным, что БК, образующийся при стрессе в хлоропластах *de novo*, транспортируется в цитоплазму, где под действием неспецифических 4,4'-кетолаз (CRTO) и 3,3'-гидроксилаз (CRTR-b) окисляется через ряд интермедиатов до АСТ [147]. Из этого правила известны исключения, например *Dunaliella salina* и *Trentepohlia aurea*, у которых не обнаружены ядерные гены, кодирующие CRTO и CRTR-b, и которые в качестве ВКР аккумулируют только β - и α -каротины [53, 147]. Исходя из этих сведений, логично предположить, что причиной накопления БК при стрессе у видов, наделённых генами CRTO и CRTR-b (т.е. краснеющих в условиях абиотического стресса), является более низкая, по сравнению с другими видами, концентрация/активность ферментов, участвующих в его оксигенации и гидроксилировании, вызванное индивидуальной реакцией водоросли на негативное воздействие.

Наименее продуктивный по Σ КР *P. protococcoides* отличался от других видов высокой долей первичных ксантофиллов (фракция, образованная полярными КР жёлтого цвета с $R_f < 0,01$), что у продуцентов АСТ обычно регистрируется лишь на ранних стадиях ВКРГ [22, 33]. Однако, относительное содержание всех форм АСТ ($\approx 47-52\%$) и доля ККР в Σ КР (76-79 %) у этой водоросли были слишком высокими, чтобы предположить слабую эффективность использованного способа индукции ВКРГ для данного вида. Пролить свет на это противоречие в будущем, возможно, поможет исследование природы фракции «первичные ксантофиллы»). Не исключено, что она образована не лютеином (ключевым первичным каротиноидом у Chlorophyceae), а его изомером зеаксантином – одним из возможных интермедиатов синтеза АСТ у зелёных микроводорослей, имеющим, такой же R_f в данной системе растворителей, как и лютеин [102, 123, 147]. Зеаксантин образуется путём гидроксирования β -криптоксантина и является прямым предшественником АДК, обнаруженного у этой водоросли как в свободной, так и эстерифицированной форме.

В качестве характерных черт ВКРГ у *B. minor* следует отметить запасание АСТ преимущественно в виде диацильных эфиров (у всех остальных видов доминирующей формой АСТ являлись моноэфиры), а также наличие наряду с АДК заметного количества второго прямого предшественника АСТ – АДР, практически не выраженного у *Scenedesmaceae*. Сумма всех ККР здесь была самой высокой (в 1,2-1,5 раза выше, чем у других сценедесмальных), в то время как БК и первичные ксантофиллы регистрировались как минорные и следовые фракции. Хотя по продуктивности культур по Σ КР на «красной» стадии *B. minor* несколько уступал *S. rubescens* (\approx на 21%), теоретический выход АСТ из литра его исходной культуры с такой же, как и сценедесмуса, начальной численностью клеток ($(2,3-2,4) \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹), был в почти в полтора раза выше, вследствие более высокой доли всех форм АСТ в Σ КР (рис. 4.24, табл. 4.1).

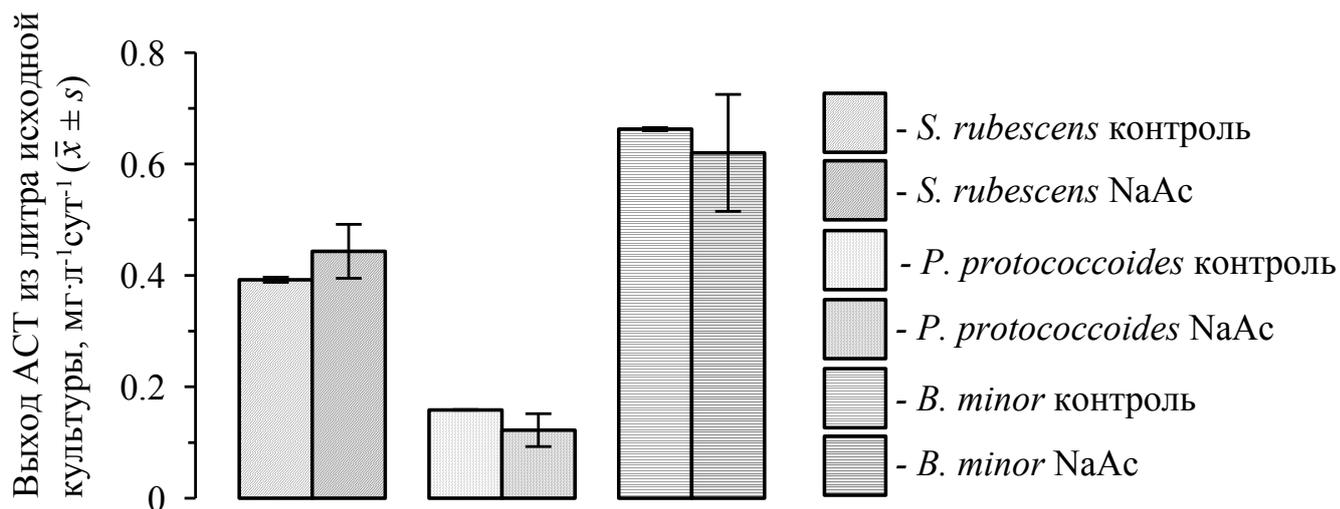


Рис. 4.24 Теоретический выход астаксантина из литра исходной культуры у сценедесмальных микроводорослей

4.3.4. Динамика содержания сухого вещества и его основных компонентов у сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования

Вторичный каротиногенез у сценедесмальных микроводорослей, как и у других продуцентов АСТ [22, 56, 89, 174], тесно сопряжён с накоплением запасных веществ в клетках при их переходе из вегетативного состояния в стадию покоя. Линейная зависимость между содержанием СВ и \sum КР в культурах имеет высокий коэффициент корреляции и может быть использована для косвенной оценки содержания каротиноидов (рис. 4.25).

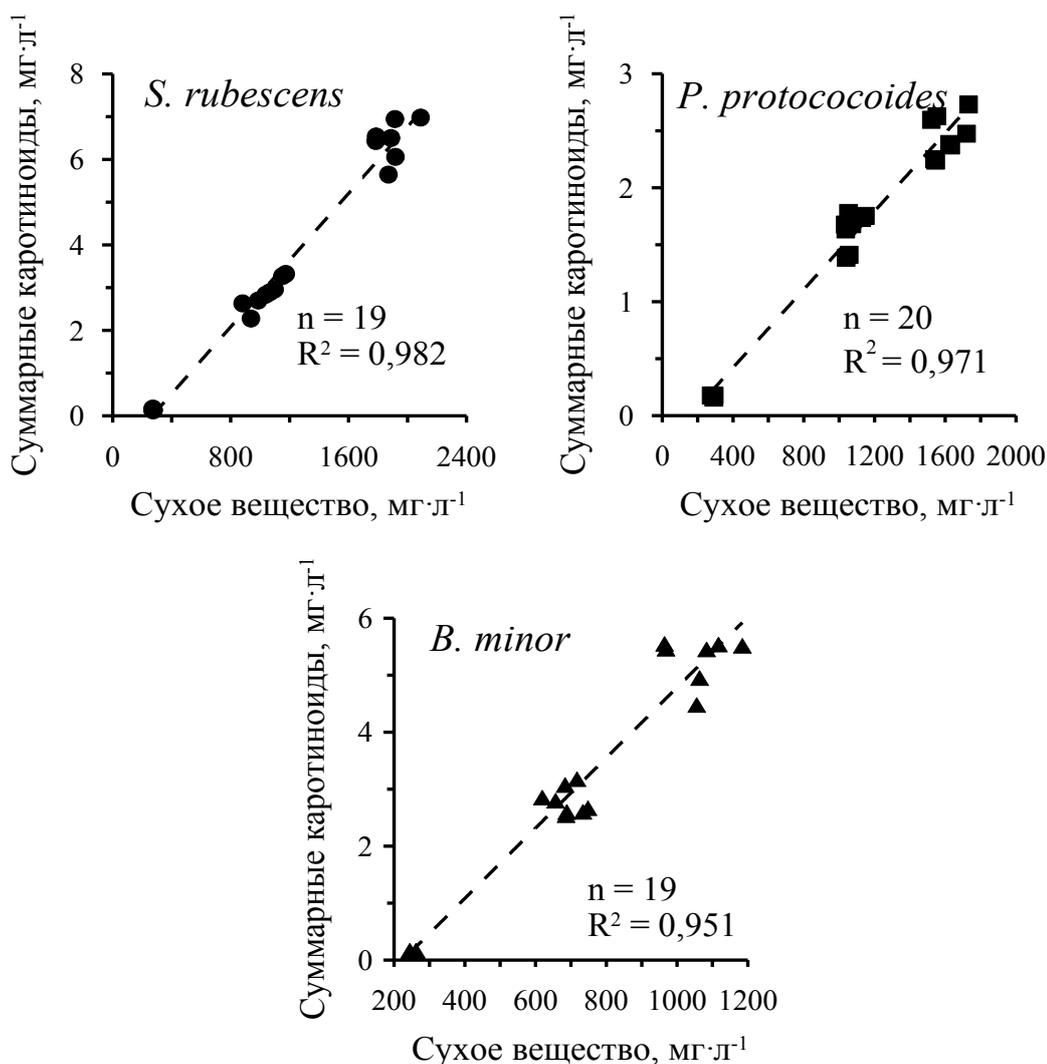


Рис. 4.25 Зависимость между содержанием сухого вещества и суммарных каротиноидов в культурах сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования

Содержание СВ в 10-кратно разбавленных при стресс-индукции ВКРГ культурах водорослей за 11 сут выросло \approx в 4-7 раз (рис. 4.26 А-В). Наиболее высокая скорость накопления СВ отмечена в культурах *S. rubescens*, отличавшихся от культур других водорослей постоянством числа клеток на протяжении всей «красной» стадии и самым существенным увеличением их размеров. Продуктивность этого вида по СВ была на 14,1-25,3 % выше, чем у близкого по размерам *P. protococcoides* и на 43,8-56,3 % выше, чем у мелкоклеточного *B. minor*. Причём, у сценедесмальных водорослей, в отличие от

E. carotinos, ацетат не оказывал стимулирующего влияния на скорость накопления СВ в культурах (рис. 4.27 А, Б). Вместе с тем, при анализе динамики содержания СВ в расчёте на клетку и мкм^3 клеточного объёма такой положительный эффект ацетата был отмечен у *P. protococcoides* (рис. 4.26 Д, 3).

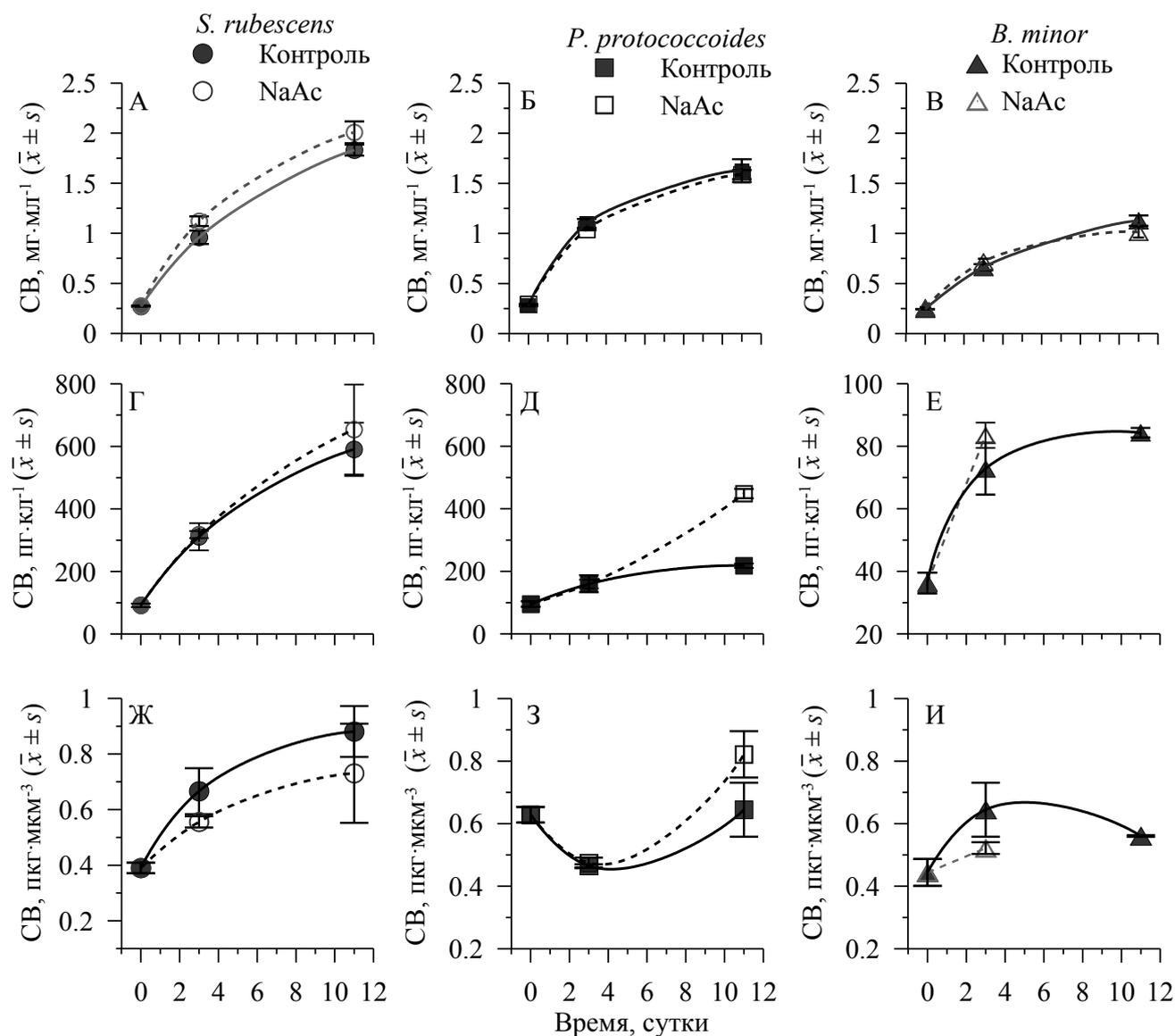


Рис. 4.26 Динамика содержания сухого вещества у трёх сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования в расчёте на литр культуры (А-В), клетку (Г-Е) и мкм^3 клеточного объёма (Ж-И)

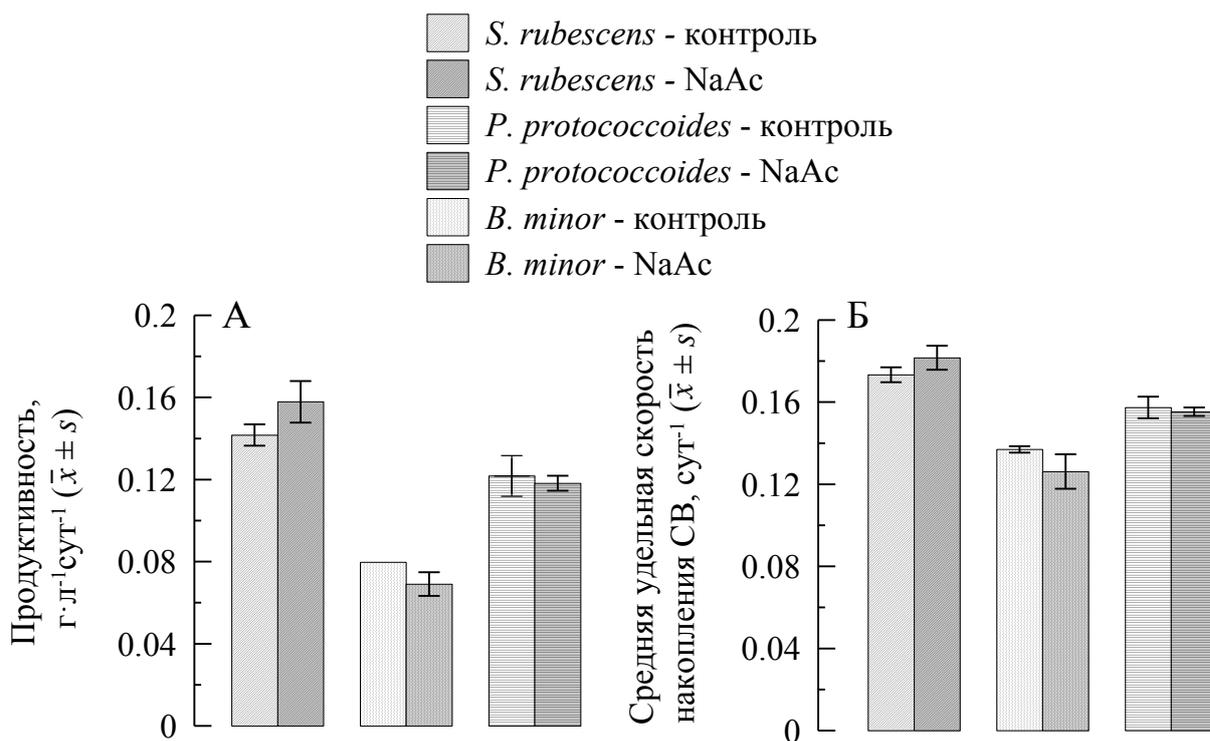


Рис. 4.27 Продуктивность по сухому веществу (А) и средняя удельная скорость накопления сухого вещества в культурах *S. rubescens*, *P. protococcoides*, *B. minor* на «красной» стадии культивирования

Динамика основных компонентов СВ была типичной для всех известных продуцентов АСТ [13, 14, 22, 28, 32, 33, 147, 118]. Накопление сухого вещества в культурах и отдельных клетках водорослей шло за счёт увеличения содержания липидов и углеводов, в то время как содержание белка к окончанию красной стадии у всех видов существенно снижалось (рис. 4.28, 4.29, 4.30).

Наиболее интенсивно липогенез протекал в клетках *S. rubescens*. Скорость накопления липидов в мкм³ клеточного объёма ($22,81-21,41 \text{ фг} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$) в контрольных культурах этого вида была вдвое выше, чем у *B. minor* ($11,48 \pm 0,18 \text{ фг} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$) и в 3,3 раза выше, чем у близкородственного *P. protococcoides* (рис. 4.27 Б), причём ацетат стимулировал этот процесс только в клетках *P. protococcoides*.

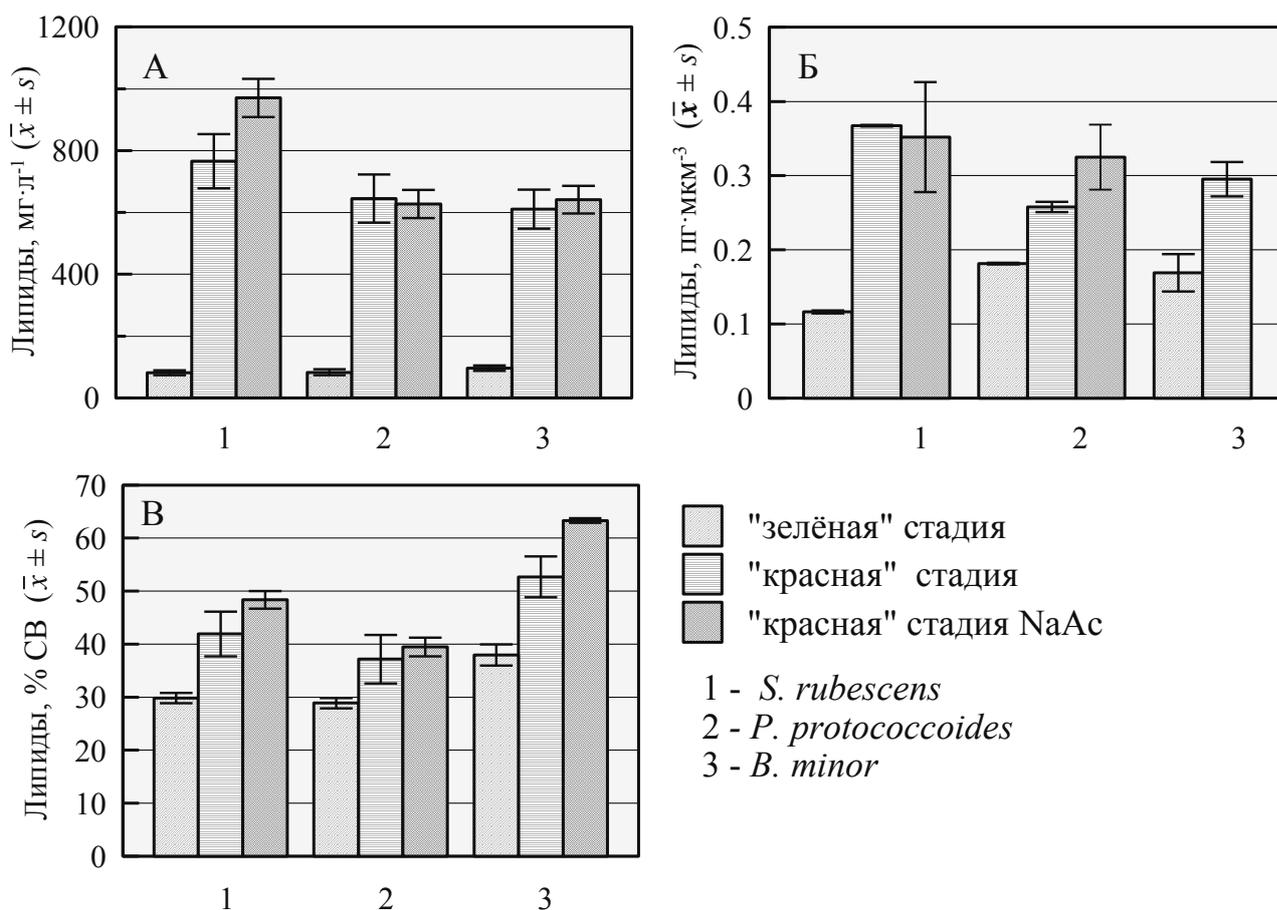


Рис. 4.28 Содержание липидов в культурах, клетках и биомассе сценедесмальных микроводорослей в конце «зелёной и «красной» стадий культивирования

В культурах *S. rubescens*, стрессированных с добавлением в среду NaAc, содержание липидов в литре «красной» культуры (рис. 4.27 А) и их среднесуточный выход (рис. 4.31), существенно зависящие от численности и размеров клеток, были самыми высокими. Следует отметить, что по выходу липидов зелёные пресноводные и наземные микроводоросли, способные к ВКРГ, вполне могут составить конкуренцию морским видам, рекомендуемыми специалистами для производства биотоплива и технических масел [71, 164]. Теоретический выход липидов из литра исходной суспензии клеток с начальной численностью $(2,3-2,4) \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹, с учётом 10-ти кратного разведения «зелёной» культуры при переходе на «красную» стадию, составил у

S. rubescens 253-329 мг·л⁻¹·сут⁻¹, у *P. protococcoides* – 208-201 мг·л⁻¹·сут⁻¹ и у *B. minor* – 187-202 мг·л⁻¹·сут⁻¹.

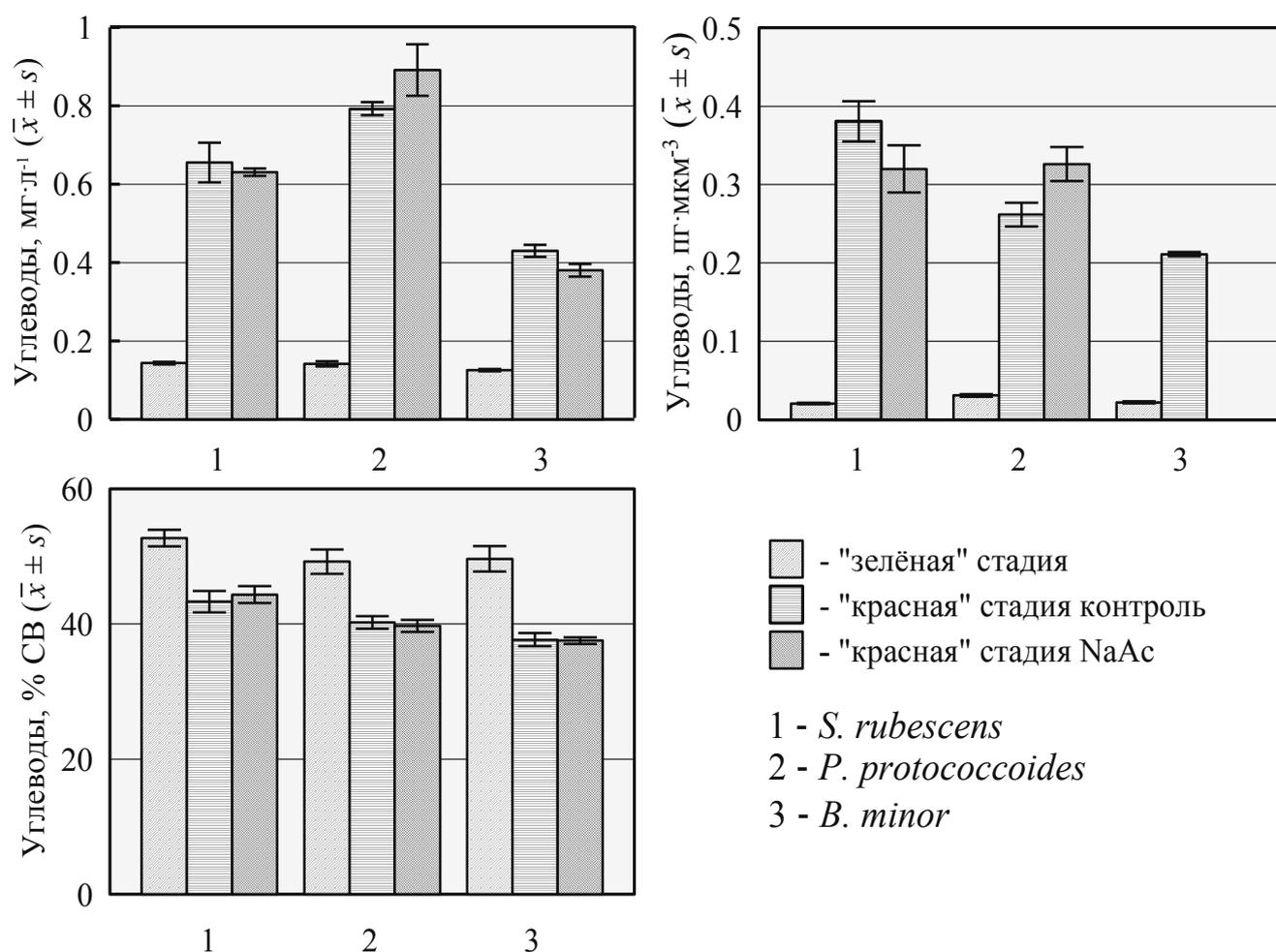


Рис. 4.29 Содержание углеводов в культурах, клетках и биомассе сценедесмальных микроводорослей в конце «зелёной» и «красной» стадий культивирования

Эти данные указывают на перспективность дальнейших исследований сценедесмальных микроводорослей как сырья для получения биотоплива и растительных масел, обогащённых высокоценными ККР. Примечательно, что по процентному содержанию липидов в биомассе наименее продуктивный вид *B. minor* существенно превосходил наиболее продуктивный *S. rubescens* (4.28

В), что объясняется меньшей скоростью накопления СВ в клетках брактеекоккуса.

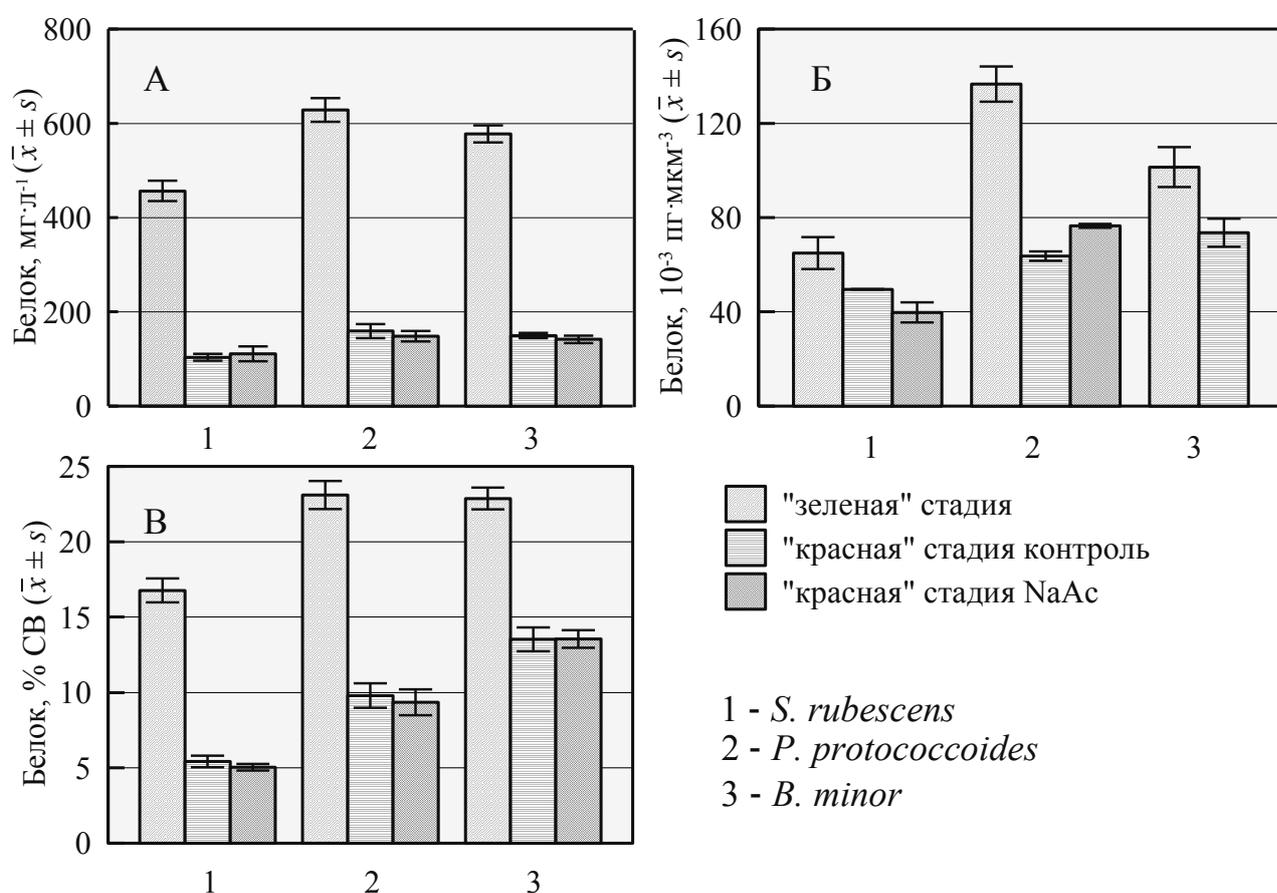


Рис. 4.30 Содержание белка в культурах (А), клетках (Б) и биомассе (В) сценедесмальных микроводорослей в конце «зелёной и «красной» стадий

Так, например, в варианте «ацетат» массовая доля липидов у *B. minor* (64.45 ± 4.12 % СВ) была достоверно выше (на 25,7 %), чем у *S. rubescens* (47.91 ± 1.35 % СВ). Это обстоятельство следует учитывать при анализе литературных данных о перспективности различного рода растительного сырья для получения биотоплива. Многократный прирост уровня углеводов в культурах и клетках водорослей (рис. 4.28), по всей вероятности, связан не только с запасанием энергетических резервов (логичнее эту роль приписывать более энергоёмким липидам), но и с утолщением клеточной оболочки и образованием вокруг стрессированных клеток слизистых обёрток [1]. На правомерность такого

предположения указывают результаты ультраструктурного исследования клеток *H. pluvialis*, показавшие сокращение числа крахмальных зёрен в красных апланоспорах по сравнению с зелёными пальмеллами [208].

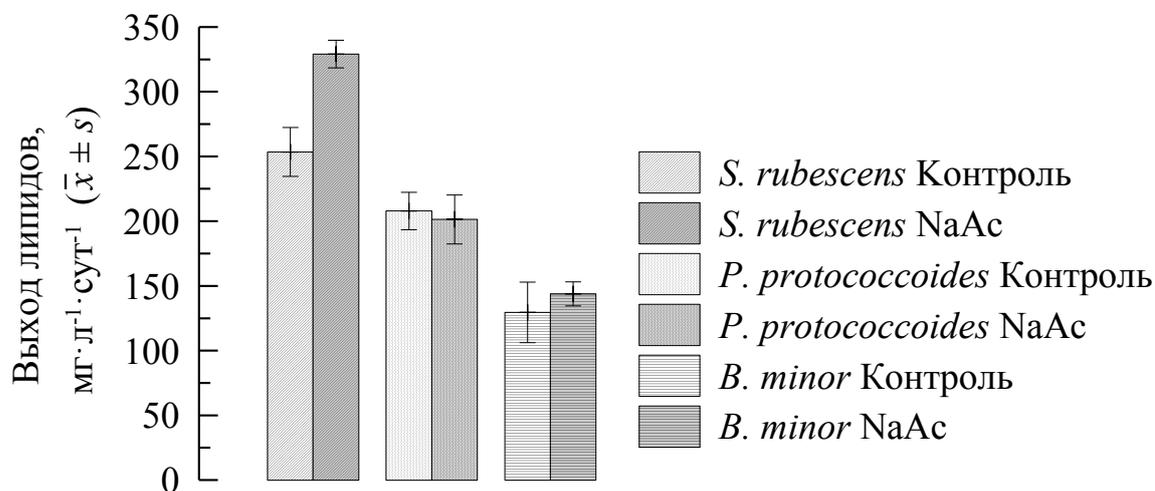


Рис. 4.31 Выход липидов из литра исходной культуры у различных видов сценедесмальных микроводорослей

Содержание белка в культурах всех трёх сценедесмальных водорослей к концу «красной» стадии уменьшилось, по сравнению с концом «зелёной» стадии примерно в 4 раза (рис. 4.30 А), массовая доля в СВ сократилась с 17-23 до 5 - 13 % (т.е. в 1,7 - 3,4 раза) (рис. 4.30 В). В то же время в расчёте на единицу клеточного объёма масштаб потерь был заметно ниже (рис. 4.30 Б). Эти величины уменьшились в 1,3 - 2,1 раза. Такая отрицательная динамика белка является типичной реакцией продуцентов АСТ на стресс, индуцирующий ВКРГ (рис. 4.30 А) [22, 56, 159, 215 и др.]. Рост клеток прекратился и направленность метаболизма в формирующихся спорах изменилась в сторону накопления энергетических и пластических резервов, обеспечивающих сохранение жизнеспособности клеток в неблагоприятных условиях и возможность возврата их в вегетативное состояние при улучшении среды обитания.

Заключение.

Результаты, представленные в настоящем разделе, позволяют сделать ряд обобщений. Все исследованные представители порядка Scenedesmales характеризуются значительной устойчивостью к использованной модели экспериментального абиотического стресса, индуцирующего ВКРГ, проявляющейся в сохранении и увеличении численности клеток в постстрессорный период. Характерной особенностью стресс-реакции сценедесмальных микроводорослей является существенное увеличение объёмов вегетативных клеток при переходе в стадию покоя (в 2-3,5 раза), наиболее выраженное в присутствии ацетата натрия. К специфическим чертам исследованных видов Scenedesmales, отличающей их от представителей порядка Volvocales, является более широкий спектр ВКР, включающий в себя полный набор возможных интермедиатов биосинтеза АСТ. Суммарное относительное содержание промежуточных продуктов синтеза АСТ в «красных» спорах Scenedesmales может достигать 50-75 % от содержания общих КР, из которых от 9 до 17 % приходится на дикетокаротиноид кантаксантин (β , β -каротин-4,4'-дион). В заданных экспериментальных условиях качественный состав ВКР у всех трёх микроводорослей идентичен, однако доля отдельных фракций в сумме КР существенно различается, даже у представителей одного и того же семейства. Единственной общей особенностью водорослей семейства *Scenedesmaceae*, отличающей их от *B. minor* (*Bracteacoccaceae*), является неординарно высокое относительное содержание свободного астаксантина и адониксантина (23,6-31,8 % от суммы), достоверно увеличивающееся в присутствии ацетата. В количественном отношении фракционный состав КР в конце «красной» стадии у каждого из видов характеризовался одним или несколькими специфическими признаками, несвойственными другим объектам исследования. Так, *S. rubescens* от других водорослей отличало неожиданно высокое для продуцентов АСТ содержание β -каротина (30,6-34,0 % Σ КР). *P. protococcoides* характеризовался высоким содержанием полярных ксантофиллов (17,2-21,6 % Σ КР), *B. minor* –

преимущественным запасанием АСТ в форме диацильных эфиров. На «красной» стадии культивирования продуктивность *Scenedesmales* по суммарным КР не связана напрямую с относительным содержанием АСТ в общем пуле накопленных КР. У наиболее продуктивного по Σ КР *S. rubescens* доля всех форм АСТ в Σ КР была почти в два раза ниже, чем у наименее продуктивного *P. protococcoides*. Максимальный среди трёх видов выход АСТ из литра исходной культуры с начальной численностью клеток $(2,3-2,4) \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹, отмеченный у *B. minor* составил $0,64 \pm 0,06$ мг·л⁻¹·сут⁻¹. Вторичный каротиногенез у сценедесмальных, как и у других продуцентов АСТ, тесно сопряжен с существенным увеличением содержания СВ в клетках при их переходе из вегетативного состояния в стадию покоя. Линейная зависимость между содержанием СВ и Σ КР в культурах имеет высокий коэффициент корреляции и может быть использована для косвенной оценки содержания суммарных каротиноидов на «красной» стадии. В условиях экспериментальной индукции ВКРГ состав СВ у *Scenedesmales* претерпевает типичные для продуцентов АСТ изменения. Содержание липидов и углеводов в культурах, клетках и сухом веществе существенно увеличивается, в то время как содержание белка снижается. По выходу липидов все три исследованных вида *Scenedesmales* могут составить конкуренцию морским микроводорослям, рекомендуемым для производства биотоплива и технических масел. Теоретический выход липидов из литра исходной суспензии клеток с начальной численностью $(2,3 - 2,4) \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹, с учётом 10-ти кратного разведения «зелёной» культуры при переходе на «красную» стадию, составил у *S. rubescens* 253 - 329 мг·л⁻¹·сут⁻¹, у *P. protococcoides* – 208 - 201 мг·л⁻¹·сут⁻¹ и у *B. minor* – 187 - 202 мг·л⁻¹·сут⁻¹. Эти данные указывают на целесообразность дальнейших исследований сценедесмальных микроводорослей как сырья для получения биотоплива и растительных масел, обогащённых высокоценными ККР.

ВЫВОДЫ

Результаты работы дополняют современные представления об особенностях вторичного каротиногенеза у зелёных микроводорослей сведениями о 4-х ранее не исследовавшихся в данном аспекте видах, представляющих два массовых, эволюционно удаленных порядка Chlorophyceae – Volvocales и Scenedesmales.

1. Впервые определена последовательность нуклеотидов в маркерном ядерном гене 18s рРНК у двух видов микроводорослей, на основании чего изменён таксономический статус штамма IPPAS D-292 с *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard 1988 на *Scenedesmus rubescens* Kessler et al. 1997 и на молекулярно-генетическом уровне подтверждён статус *Pseudosporangiococcum protococcoides* (штамм CALU-221).

2. К общим эколого-физиологическим характеристикам исследованных видов в условиях экспериментально индуцированного ВКРГ следует отнести:

- высокую устойчивость к использованным моделям абиотического стресса;

- противоположную направленность динамики содержания фотосинтетических пигментов и вторичных каротиноидов в формирующихся спорах;

- тесное сопряжение процессов накопления вторичных каротиноидов и сухого вещества и характерные изменения его состава – увеличение массовой доли общих липидов и углеводов на фоне снижения содержания белка;

- технологически значимый выход липидов из литра исходной культуры (187-329 мг·л⁻¹·сут⁻¹).

3. Видовые особенности ВКРГ у *E. carotinosus* (Volvocales) опосредованы высокой фенотипической и функциональной гетерогенностью вегетативных клеток и постоянным присутствием в них некоторого количества кетокаротиноидов. К специфическим чертам адаптивного ответа водоросли на стресс-индукцию ВКРГ относятся:

- максимально быстрая из всех исследованных видов метаболическая реакция на стресс, наиболее выраженная при действии смеси FeSO₄+H₂O₂;

- активный спорогенез на протяжении всей «красной» стадии, приводящий к уменьшению средних объёмов клеток в 1,8-6,8 раза;

- определяющая роль моноэфиров АСТ в формировании общего пула ВКР;

- наличие в составе ВКР эфиров адонирубина (10-12 % от суммы КР);

4. Характерными чертами стресс-реакции водорослей порядка Scenedesmales являются:

- существенное увеличение объёмов клеток (в 2-3,5 раза), наиболее выраженное в присутствии ацетата натрия;

- полный набор интермедиатов биосинтеза астаксантина, в сумме составляющих 50-75 % от \sum КР, из которых от 9 до 17 % приходится на кантаксантин;

- наличие у каждого вида специфических черт ВКРГ, не свойственных другим объектам исследования: необычно высокое для продуцентов АСТ содержание β -каротина у *S. rubescens* (30,6-34,0 % от \sum КР); высокая доля полярных ксантофиллов у *P. protococcoides* (17,2-21,6 % от \sum КР); преимущественное запасание АСТ в форме диацильных эфиров у *B. minor* (38,7-42,3% \sum КР); аномально высокое содержание (23,6-31,8 % от суммы) свободных форм АСТ и АДК у водорослей семейства Scenedesmaceae.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Андреева, В. М. Почвенные и аэрофильные зелёные водоросли / В. М. Андреева. - Спб. : Наука, 1998.- 351 с.
2. Арбузова, Л. Л. Водоросли : учеб. пособие для вузов / Л. Л. Арбузова, И. Р. Левенец , Дальневост. гос. техн. рыбохоз. ун-т, Ин-т биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН. - Владивосток : Дальрыбвтуз, 2011. - 207 с.
3. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов : пер. с англ. / Г. Бриттон. – М. : Мир, 1986. - 422 с.
4. Брянцева, Ю. В. Расчет объемов клеток микроводорослей и планктонных инфузорий Черного моря / Ю. В. Брянцева, А. В. Курилов. - Севастополь, 2003. - 20 с. - (Препринт / НАН Украины, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского).
5. Визначник прісноводних водоростей УРСР. – К. : Вид-во АН УРСР, 1938. - Вип. 4 : Коршіков О. А. Volvocineae. - 184 с.
6. Влияние освещенности на физиолого-биохимические характеристики зеленой микроводоросли *Naematococcus pluvialis* (Chlamydomonadales) / Н. В. Терентьева, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова // Экология моря. - 2008. - Вып. 75. - С. 82 - 88
7. Водоросли : справочник / АН УССР, Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного. - К. : Наук. думка, 1989. - 604 с.
8. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори) / І. Ю. Костіков, П. О. Романенко, Е. М. Демченко, Т. М. Дарієнко, Т. І. Михайлюк, О. В. Рибчинський, А. М. Солоненко. - К. : Фітосоціоцентр, 2001. - 300 с.
9. Высокотемпературный штамм *Chlamydoaonae reinhardii* Dang. в условиях культуры / Б. В. Громов, Л. Д. Кондратьева, К. А. Мамкаева, Сидоренко Л. А. // Ботан. журн. - 1973. - Т. 58, № 1. - С.127-132.
10. Гапочка, Л. Д. Об адаптации водорослей / Л. Д. Гапочка. - М. : Изд-во МГУ, 1981. - 80 с.
11. Гродзинский, Д. М. Надежность растительных систем / Д. М. Гродзинский. - К. : Наук. думка, 1983. - 365 с.

12. Громов, Б. В. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета (CALU) / Б. В. Громов, Н. Н. Титова // Коллекции микроводорослей в СССР : (список культур) : [сб.] / АН СССР, Науч. центр биол. исслед., Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева, [отв. ред. В. Е. Семененко]. - Пушино, 1988. - С. 52-91.
13. Данцюк, Н. В. Влияние ацетата натрия на интенсивность вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* / Н. В. Данцюк // Экология моря. - 2010. - Вып. 80. - С. 44-50.
14. Динамика химического состава *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) при экспериментальной индукции вторичного каротиногенеза / Э. С. Челебиева, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова // Морск. экол. журн. - 2013. - Т. XII. № 3. - С. 75–87.
15. Зенова, Г. М. Почвенные водоросли : учеб. пособие для студентов биол.-почв. фак. и фак. почвоведения ун-тов / МГУ им. М. В. Ломоносова, Фак. почвоведения. - М. : Изд-во МГУ, 1990. - 78 с.
16. Кейтс М. Техника липидологии: Выделение, анализ и идентификация липидов. / М. Кейтс // М. : Мир - 1975. - 322 с.
17. Коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР / М. Г. Владимирова, Е. Д. Барцевич, И.А. Жолдаков [и др.] // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР : каталог / Рос. АН, Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева, [отв. ред. В. Е. Семененко]. - М., 1991. - С. 19.
18. Костиков, И. Ю. Коллекция культур водорослей Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008 г.) / И. Ю. Костиков, Э. Н. Демченко, М. А. Березовская // Чорномор. ботан. журн. - 2009. - Т. 5, № 1. - С. 37-79.
19. Красное „цветение” *Euglena* в родниковом водоеме (Крым, Украина) / Н. В. Терентьева, И. Н. Чубчикова, И. В. Дробецкая, Г. С. Минюк, Н. В. Шадрин // Актуальні проблеми ботаніки, екології та біотехнології : матеріали міжнар. конф. молодих вчених-ботаніків (Київ, 27-30 верес. 2006 р.) : тез. доп. - К., 2006. - С. 172.

20. Кучеренко Н. Е. Липиды / Н. Е. Кучеренко, Васильев А.Н. - Киев : Вища шк., 1985. – 248 с.
21. Ладыгин, В. Г. Современные представления о функциональной роли каротиноидов в хлоропластах эукариот / В. Г. Ладыгин, Г. Н. Ширшикова // Журн. общ. биологии. - 2006. - Т. 67, № 3. - С. 163-190.
22. Минюк, Г. С. Сравнительная характеристика морфологических и физиолого-биохимических признаков трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyta, Chlamydomonadales) / Г. С. Минюк, Н. В. Терентьева, И. В. Дробецкая // Альгология. - 2007. - Т. 17, № 2. - С.148-159.
23. Одностадийное культивирование зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* (Chlamydomonadales) для получения астаксантина / Н. В. Терентьева, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова // Экология моря. - 2008. - Вып. 76. - С. 72-80.
24. Определение содержания астаксантина и кантаксантина у зелёных микроводорослей методом тонкослойной хроматографии / И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, А. Б. Боровков, Г. С. Минюк // Экология моря. - 2010. - Вып 79. - С. 50-56.
25. Поляков, Н. Э. Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексообразование / Н. Э. Поляков, Т. В. Лешина // Успехи химии. - 2006. - Т. 75, № 12. - С. 1175-1192.
26. Семененко, В. Е. К разработке метода непрерывного культивирования хлореллы с направленным изменением химического состава / В. Е. Семененко, Л. Н. Цоглин // Мат. VI Всесоюзн. совещ. По вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. – 1969.
27. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований / Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, Н. В. Данцюк, Э. С. Челебиева // Экология моря. - 2010. - Вып. 80. - С. 67-78.
28. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у

- представителей рода *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) / И. Н. Чубчикова, И. В. Дробецкая, Г. С. Минюк, Н. В. Данцюк, Э. С. Челебиева // Морск. экол. журн. - 2011. - Т. 10, № 1. - С. 91-97.
29. Соловченко, А. Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах / А. Е. Соловченко // Физиология растений. - 2012. - Т. 59, № 2. - С. 192-202.
30. Соловченко, А. Е. Физиология и адаптивное значение вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей / А. Е. Соловченко // Физиология растений. - 2013. - Т. 60, № 1. - С. 3-16.
31. Физиолого - биохимические и биофизические характеристики одноклеточной водоросли *Haematococcus pluvialis* - перспективного источника природного астаксантина / Г. С. Минюк, В. Е. Ерохин, А. П. Гордиенко, Н. В. Терентьева, И. Н. Чубчикова, И. В. Дробецкая // Микроводоросли Чёрного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования. / под ред. Ю. Н. Токарева, З. З. Финенко, Н. В. Шадрин - Севастополь: ЭКОСИ - Гидрофизика, 2008. - С. 353 - 378.
32. Физиолого-биохимические характеристики *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) в условиях экспериментального стресса / Э. С. Челебиева, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова // Морск. экол. журн. - 2013. - Т. 12, № 2. - С. 78-87.
33. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов / И. Н. Чубчикова, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, В. Н. Данцюк // Экология моря. - 2009. - Вып. 77. - С. 77-83.
34. Цоглин, Л. Н. Биотехнология микроводорослей / Л. Н. Цоглин, Н. А. Пронина. - М. : Науч. мир, 2012. - 184 с.
35. Челебиева, Э. С. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 3. Введение в лабораторную культуру и первичная оценка биотехнологического потенциала *Ettlia carotinos* / Э. С. Челебиева // Морск. экол. журн. - 2011. - Отд. вып. № 2. - С. 96 - 112.

36. Чубчикова, И. Н. Вторичный каротиногенез у зелёной микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. в условиях природной освещённости и температуры / И. Н. Чубчикова, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая // Экология моря. - 2010. - Вып. 81. - С. 77-81.
37. Abe, K. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrrella striolata* var. *multistriata* / K. Abe, H. Hattori, M. Hirano // Food Chem. - 2007. - Vol. 100, no. 2. - P. 656-661.
38. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) / A. Del Campo, H. Rodrigues, J. Moreno, M. A. Vargas, J. Rivas, M. G. Guerrero // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2004. - Vol. 64, iss. 6. - P. 848-854.
39. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters / M. Zhekisheva, S. Boussiba, I. Khozin-Goldberg, A. Zarka, Z. Cohen // J. Phycol. - 2002. - Vol. 38, iss. 2. - P. 325-331.
40. Accumulation of Secondary Carotenoids in *Chlorella zofingiensis* / M. Rise, E. Cohen, M. Vishkautsan, M. Cojocar, H. E. Gottlieb, S. Arad // J. Plant Physiol. - 1994. - Vol. 144, iss. 3. - P. 287-292.
41. Ahlgren, G. Lipid analysis of freshwater microalgae: a method study / G. Ahlgren, L. Merino // Arch. Hydrobiol. - 1991. - Vol. 121, no. 3. - P. 295-306.
42. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor // PCR protocols : a guide to methods and applications / Eds: M. A. Innis, D. H. Geifand, J. J. Snisky, T. J. White. - San Diego (CA), 1990. - P. 315-322.
43. Analysis of total astaxanthin in algae meal prepared from *Haematococcus pluvialis* : Aquasearch Technical report 1002.001 [Electronical resource]. - Mode of Access : http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/00/jun00/061900/rpt0065_tab8.pdf
44. Andrewes, A. G. Carotenoids of *Phafia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast / A. G. Andrewes, H. J. Pha, M. P. Starr // Phytochemistry. - 1976. - Vol. 15, iss. 6. - P. 1003-1007.

45. Antia, N. J. The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae / N. J. Antia, J. Y. Cheng // *Brit. Phycol. J.* - 1982. - Vol. 17, iss. 1. - P. 39-50.
46. Armstrong, G. A. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis / G. A. Armstrong, J. E. Hearst // *FASEB J.* - 1996. - Vol. 10, no. 2. - P. 228-237.
47. Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions / K. Asada // *Plant Physiol.* - 2006. - Vol. 141, no. 2. - P. 391-396.
48. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids / B. Schoefs, N. E. Rmiki, J. Rachidi, Y. Lemoine // *FEBS Letters.* - 2001. - Vol. 500, iss. 3. - P. 125-128.
49. Astaxanthin improves the proliferative capacity as well as the osteogenic and adipogenic differentiation potential in neural stem cells / J. H. Kim, S. W. Nam, B. W. Kim, W.-J. Kim, Y. H. Choi // *Food Chem. Toxicol.* - 2010. - Vol. 48, iss. 6. - P. 1741-1745.
50. Astaxanthin restricts weight gain, promotes insulin sensitivity and curtails fatty liver disease in mice fed a obesity-promoting diet / S. Bhuvaneshwari, E. Arunkumar, P. Viswanathan, C. Venkatraman Anuranda // *Process Biochem.* - 2010. - Vol. 45, iss. 8. - P. 1406-1414.
51. Astaxanthin secured apoptotic death of PC12 cells induced by b-amyloid peptide 25-35: its molecular action targets / C. H. Chang, C. Y. Chen, J. Y. Chiou, R. Y. Peng, C-H Peng // *J. Med. Food.* - 2010. - Vol. 13, iss. 3 - P. 548-556.
52. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition / G. Hussein, U. Sankawa, H. Goto, K. Matsumoto, H. Watanabe // *J. Nat. Prod.* - 2006. - Vol. 69, iss. 3. - P. 443-449.
53. 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 Physiol.* - 1989. - Vol. 91, no. 3. - P. 1040-1043.

54. Birkeland, S. Extractabilities of astaxanthin and protein from muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmon salar*) as affected by brine concentration and pH / S. Birkeland, B. Bjerkgeng // Food Chem. - 2004. - Vol. 85, iss. 4. - P. 559-568.
55. Boussiba, S. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* / S. Boussiba, A. Vonshak // Plant Cell Physiol. - 1991. - Vol. 32, iss. 7. - P. 1077-1082.
56. Boussiba, S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response / S. Boussiba // Physiol. Plantarum. - 2000. - Vol. 108, iss. 2. - P. 111-117.
57. Britton, G. Worked examples of isolation and analysis carotenoids / G. Britton // Carotenoids. Vol. 1 A : Isolation and Analysis / Eds.: G. Britton, S. Liaasen-Jensen, H. Pfander. - Basel, 1995 - P. 199-225.
58. Brody, J. R. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis / J. R. Brody, S. E. Kern // Anal. Biochem. - 2004. - Vol. 333, iss. 1. - P. 1-13.
59. Burczyk, J. Cell wall carotenoids in green algae which form sporopollenins / J. Burczyk // Phytochemistry. - 1986. - Vol. 26, iss. 1. - P. 121-128.
60. Burton, G. W. Antioxidant action of carotenoids / G. W. Burton // J. Nutrition. - 1989. - Vol. 119, iss. 1. - P. 109-111.
61. Carotenoids in Health and Disease / Eds.: N. I. Krinsky, S. T. Mayne, H. Sies. - N. Y. : Marcel Dekker Inc., 2004. - 425 p.
62. Carotenoids in photosynthesis / Eds.: A. Young, G. Britton. - London : Chapman and Hall, 1993. - 498 p.
63. Carotenoids. - Handbook / Eds.: G. Britton, S. Liaasen-Jensen, H. Pfander. - Basel : Birkhäuser Verlag, 2004. - 672 p.
64. Carotenoids. - Vol. 1B : Spectroscopy / Eds.: G. Britton, S. Liaasen-Jensen, H. Pfander. - Basel : Birkhäuser Verlag, 1995. - 360 p.
65. Carotenogenesis in *Haematococcus lacustris*: role of protein tyrosine phosphatases / J-K. Park, P. N. Tran, J-D. Kim, S. J. Hong, C. G. Lee // J. Microbiol. Biotechnol. - 2009. - Vol. 19, iss. 9. - P. 918-921.

66. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth / M. Orosa, D. Franqueira, A. Cid, J. Abalde // *Biotechnol. Lett.* - 2001. - Vol. 23 iss. 5. - P. 373-378.
67. Carotenoid composition in green microalga *Chlorococcum* / J-P. Yuan, F. Chen, X. Liu, X-Z. Li // *Food Chem.* - 2002. -Vol. 76, no. 3 - P. 319-325.
68. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta) / J. A. Del Campo, J. Moreno, H. Rodríguez, M. A. Vargas, J. Rivas, M. G. Guerrero // *J. Biotechnol.* - 2000. - Vol. 76 iss. 1. - P. 51-59.
69. Carotenoids and related compounds. Part XXXII. Synthesis of astaxanthin, phoenicoxanthin, hydroxyechinenone, and the corresponding diosphenols / R. D. G. Cooper, J. B. Davis, A. P. Leftwick, C. Price, B. C. L. Weedon // *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1.* - 1975. - Iss. 21. - P. 2195-2204.
70. Chang, S. H. Studies on the carotenoid pigment in the abdominal skin of *Bombina orientalis* (III). Occurrence of 3-hydroxy-cantaxanthin in the abdominal skin of *Bombina orientalis* / S. H. Chang, U. C. Chong, I. Choi // *J. Korean Chem. Soc.* - 1975. - Vol. 19, iss. 1. - P. 34-37.
71. Characterization of a newly isolated green microalga *Scenedesmus* sp. as a potential source of biodiesel / J. Peng, K. Yin, J.-P. Yuan, G.-X. Cao, M. Xue, C.-F. Wu, J.-H. Wang // *African J. Biotechnol.* - 2012. - Vol. 11. – Iss. 94. - P. 16083-16094.
72. Chew, B. P. Carotenoid action on the immune response / B. P. Chew, J. S. Park // *J. Nutr.* - 2004. - Vol. 134, iss. 1. - P. 257S-261S.
73. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions / M. Orosa, J. F. Valero C. Herrero, J. Abalde // *Biotechnol. Lett.* - 2001. - Vol. 23, iss. 13. - P. 1079-1085.
74. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp / D. H. Zhang, Y. K. Lee, M. L. Ng, S. M. Phang // *J. Appl. Phycol.* - 1997. - Vol. 9, iss. 2. - P. 147-155.
75. Conn, P. F. The singlet oxygen and carotenoid interaction / P. F. Conn, W. Schalch, T. G. Truscott // *J. Photoch. Photobiol. B.* - 1991. - Vol. 11, iss. 1. - P. 41-47.

76. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) / Y. Li, M. Sommerfeld, F. Chen, Q. Hu // J. Plant Physiol. - 2008. - Vol. 165, iss. 17. - P. 1783-1797.
77. Cunningham, Jr. F. X. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants / Jr. F. X. Cunningham, E. Gantt // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. - 1998. - Vol. 49. - P. 557-583.
78. Czygan, F. C. Blood-rain and blood-snow: nitrogen-deficient cells of *Haematococcus pluvialis* and *Chlamydomonas nivalis* / F. C. Czygan // Arch. Mikrobiol. - 1970. - Vol. 74, no. 1. - P. 69-76.
79. Czygan, F. C. Demonstration of 3-oxi-4,4'-dioxo-beta-carotene in the green algae *Chlorococcum wimmeri* and *Haematococcus* spec. / F. C. Czygan, E. Kessler // Z. Naturforsch. B. - 1967. - Vol. 22, no. 10. - P. 1085-1086.
80. Czygan, F. C. Primäre und sekundäre Carotinoide in chlorokokkalen Algen / F. C. Czygan // Arch. Hydrobiol. - 1982. - Suppl. 29. - P. 470-488.
81. Dangeard, P. A. Recherches sur les algues inférieures / P. A. Dangeard // Ann. Sci. Nat. Bot. - 1888. - T. 7. - P. 105-175.
82. Daubrawa, F W. Astaxanthin diminishes gap junctional intercellular communication in primary human fibroblasts / F. Daubrawa, H. Sies, W. Stahl // J. Nutr. - 2005. - Vol. 135, iss. 11. - P. 2507-2511.
83. Davies, B. H. The mechanism of the conversion of beta-carotene into canthaxanthin by the brine shrimp *Artemia salina* L. (Crustacea: Branchiopoda) / B. H. Davies, W. J. Hsu, C. O. Chichester // Comp. Biochem. Physiol. - 1970. - Vol. 33, iss. 3. - P. 601-615.
84. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714 / A. Disch, J. Schwender, C. Müller, H. K. Lichtenthaler, M. Rohmer // Biochem. J. - 1998. - Vol. 333, Pt. 2. - P. 381-388.
85. Does astaxanthin protect *Haematococcus* against light damage? / L. Fan, A. Vonshak, A. Zarka, S. Boussiba // Z. Naturforsch. C. - 1997. - Vol. 53, no. 1-2. - P. 93-100.
86. Droop, M. R. Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* / M. R. Droop // Nature. - 1955. - Vol. 175. - P. 42-43.

87. Droop, M. R. Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow / M. R. Droop // Arch. Mikrobiol. - 1954. - Vol. 20, no. 4. - P. 391-397.
88. Dufossé, L. Microbial and Microalgal Carotenoids as Colourants and Supplements / L. Dufossé // Carotenoids. - Vol. 5: Nutrition and Health / Eds.: G. Britton, S. Liaasens-Jensen, H. Pfander. - Basel, 2009. - P. 67-82.
89. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* / M. Kobayashi, T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai // J. Ferment. Bioeng. - 1992. - Vol. 74, iss. 1. - P. 61-63.
90. Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture / E. Del Rio, F. G. Acien, M. C. Garcia-Malea, J. Rivas, E. Molina-Grima, M. G. Guerrero // Biotechnol. Bioeng. - 2005. - Vol. 91, iss. 7. - P. 808-815.
91. Egeland, E. S. Data sheets aiding identification of phytoplankton carotenoids and chlorophylls / E. S. Egeland, J. L. Garrido, L. Clementson // Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography. - Cambridge, 2011. - Part VII. - P. 665-674.
92. Elliot, A. M. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis* / A. M. Elliot // Arch. Protistenk. - 1934. - Vol. 82. - P. 250-272.
93. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater / M. K. Kim, J. W. Park, C. S. Park, S. J. Kim, K. H. Jeune, M. U. Chang, J. Acreman // Bioresour. Technol. - 2007. - Vol. 98, iss. 11. - P. 2220-2228.
94. Ettl, H. Beitrag zur Kenntnis der Morphologie der Gattung *Chlamydomonas* Ehrenberg. / H. Ettl // Arch. Protistenk. - 1965. - Vol. 108. - P. 271-420.
95. Evidence a photoprotective for secondary carotenoids of snow algae / R. Bidigare, M. E. Ondrusek, M. C. Kennicutt II, R. Iturriaga, H. R. Harvey, R. W. Hoham, S. A. Macko // J. Phycol. - 1993. - T. 29, iss. 4. - P. 427-434.

96. Fan, L. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) / L. Fan, A. Vonshak, S. Boussiba // *J. Phycol.* - 1994. - Vol. 30, iss. 5. - P. 829-833.
97. Fan, L. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine / L. Fan, A. Vonshak, R. Gabbay // *Plant Cell Physiol.* - 1995. - Vol. 36, iss. 8. - P. 1519-1524.
98. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // Evolution.* - 1985. - Vol. 39, no. 4. - P. 783-791.
99. Felsenstein, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach / J. Felsenstein // *J. Mol. Evol.* - 1981. - Vol. 17, iss. 6. - P. 368-376.
100. Femtosecond pump-supercontinuum probe and transient lens spectroscopy of adonixanthin / T. Lenzer, S. Schubert, F. Ehlers, P. W. Lohse, M. Scholz, K. Oum // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2009. - Vol. 483, iss. 2. - P. 213-218.
101. Foppen, F. H. Tables for the identification of carotenoid pigments / F. H. Foppen // *Chromatogr. Rev.* - 1971. - Vol. 14, iss. 3. - P. 133-298.
102. Fraser, P. D. Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay / P. D. Fraser, H. Shimada, N. Misawa // *Eur. J. Biochem.* - 1998. - Vol. 252, iss. 2. - P. 229-236.
103. Fraser, P. D. In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes / P. D. Fraser, Y. Miura, N. Misawa // *J. Biol. Chem.* - 1997. - Vol. 272, iss. 10. - P. 6128-6135.
104. Gerber, S. Effect of enhanced UV-B irradiation on the red colored freshwater flagellate *Euglena sanguinea* / S. Gerber, D-P. Häder // *FEMS Microbiol. Ecol.* - 1994. - Vol. 13, iss. 3. - P. 177-184.
105. Glucose sensing and the mitochondrial alternative pathway are involved in the regulation of astaxanthin biosynthesis in the dark-grown *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae) / Y. Li, J. Huang, G. Sandmann, F. Chen // *Planta.* - 2008. - Vol. 228, no. 5. - P. 735-743.
106. Gromov, B. M. Morphology and ultrastructure of some chlorococcal algae from the collection of algae strain in Leningrad University. I. *Pseudospongiococcum*

protococcooides gen. nov, sp. nov. / B. M. Gromov, Mamkaeva K. A. // *Algol. Stud.* / *Arch. Hydrobiol.* - 1974. - Suppl. 46, no. 10. - P. 1-9.

107. Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions / M. Kobayashi, T. Kakizono, K. Yamaguchi, N. Nishio, S. Nagai // *J. Ferment. Bioeng.* - 1992. - Vol. 74, iss. 1. - P. 17-20.

108. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells / P. Palozza, C. Torelli, A. Boninsegna, R. Simone, A. Catalano, M. C. Mele, N. Picci // *Cancer Lett.* - 2009. - Vol. 283, iss. 1. - P. 108-117.

109. Grünewald, K. Ketocarotenoid Biosynthesis Outside of Plastids in the Unicellular Green Alga *Haematococcus pluvialis* / K. Grunewald, J. Hirschberg, C. Hagen // *J. Biol. Chem.* - 2001. - Vol. 276, no. 8. - P. 6023-6029.

110. Grünewald, K. Secondary carotenoid accumulation in flagellates of the green alga *Haematococcus lacustris* / K. Grünewald, C. Hagen, W. Braune // *Eur. J. Phycol.* - 1997. - Vol. 32, iss. 4. - P. 387-392.

111. Grung, M. Algal carotenoids 51. Secondary Carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3' S)-astaxanthin esters / Grung M., D'Souza F. M. L., Borowitzka M. // *J. App. Phycol.* - 1992. - Vol. 4, iss. 2. - P. 165-171.

112. Grung, M. Primary and secondary carotenoids in two races of the green alga *Botryococcus braunii* / M. Grung, P. Metzger, S. Liaaen-Jensen // *Biochem. Syst. Ecol.* - 1989. - Vol. 17, iss. 4. - P. 263-269.

113. Guerin, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition / M. Guerin, M. E. Huntley, M. Olaizola // *Trends Biotechnol.* - 2003. - Vol. 21, iss. 5. - P. 210-216.

114. Guiry, M. D. AlgaeBase. World-wide electronic publication / M. D. Guiry, G. M. Guiry, National University of Ireland. - Galway, 2012. - Mode of Access : <http://www.algaebase.org>

115. Hagen, C. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Volvocales). III. Action as a “sunshade” / C. Hagen, W. Braune, L. O. Björn // *J. Phycol.* - 1994. - Vol. 30, iss. 2. - P. 241-248.

116. Hagen, C. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales) IV. Protection from photodynamic damage / C. Hagen, W. Braune, F. Greulich // J. Photochem. Photobiol. B. - 1993. - Vol. 20, iss. 2-3. - P. 153-160.
117. Hager, A. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen / A. Hager, H. Stransky // Arch. Mikrobiol. - 1970. - Vol. 72, no. 2. - P. 68-83.
118. Han, D. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications / D. Han, Y. Li, Q. Hu // Algae. - 2013. - Vol. 28, no. 2. - P. 131-147.
119. Hanagata, N. Bark-Inhabiting Green Algae in Japan (1). *Scenedesmus komarekii* and *Coelastrella multistriata* var. *multistriata* (Scotielloccystoideae, Chlorellaceae, Chlorophyceae) / N. Hanagata, I. Karube, M. Chihara // J. Jpn. Bot. - 1996. - Vol. 71, no. 1. - P. 87-97.
120. Hanagata, N. Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* (Chlorophyceae, Chlorophyta) / N. Hanagata, Z. Dubinsky // J. Phycol. - 1999. - Vol. 35, iss. 5. - P. 960-966.
121. Harker, M. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor / M. Harker, A. J. Tsavalos, A. J. Young // J. Ferment. Bioeng. - 1996. - Vol. 82, iss. 2. - P. 113-118.
122. Higuera-Ciapara, I. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications / I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela, F. M. Coycoolea // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. - 2006. - Vol. 46, iss. 2. - P. 185-196.
123. Hirschberg, J. Molecular biology of carotenoid biosynthesis / J. Hirschberg // Carotenoids. - Vol 3 : Biosynthesis and Metabolism / Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. - Basel, 1998. - P. 149-194.
124. Hiyama, T. Determination of carotenes by thin-layer chromatography / T. Hiyama, M. Nishimura, B. Chance // Anal. Biochem. - 1969. - T. 29, iss. 2. - P. 339-342.
125. Holt, T. K. A carotenoid-protein from cyanobacteria / T. K. Holt, D. W. Krogmann // BBA-Bioenergetics. - 1981. - Vol. 637, iss. 3. - P. 408-414.

126. *Hylodesmus singaporensis* gen. et sp. nov., a new autosporic subaerial green alga (*Scenedesmaceae*, Chlorophyta) from Singapore / M. Eliás, Y. Nemcova, P. Skaloud, J. Neustupa, V. Kaufnerova, L. Sejnohova // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* - 2010. - Vol. 60, no. 5. - P. 1224-1235.
127. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures / A. E. Tjahjono, Y. Hayama, T. Kakizono, V. Terada, N. Nishio, S. S. Ngai // *Biotechnol. Lett.* - 1994. - Vol. 16, no. 2. - P. 133-138.
128. Induced β -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil* / S. Rabbani, P. Beyer, J. V. Linthing, P. Hugueney, H. Kleinig // *Plant Physiol.* - 1998. - Vol. 116, no. 4. - P. 1239-1248.
129. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* / A. R. Dominguez-Bocanegra, I. G. Legarreta, F. M. Jeronimo, A. T. Campocosio // *Bioresource Technol.* - 2004. - T. 92, iss. 2. - C. 209-214.
130. Ip, P. F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark / P. F. Ip, F. Chen // *Process Biochem.* - 2005. - Vol. 40, iss. 2. - P. 733-738.
131. Ip, P.-F. Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture / P.-F. Ip, F. Chen // *Process Biochem.* - 2005. - Vol. 40, iss. 11. - P. 3491-3496.
132. Ip, P.-F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture / P.-F. Ip, K. H. Wong, F. Chen // *Process Biochem.* - 2004. - Vol. 39, iss. 11. - P. 1761-1766.
133. Isolation and characterization of a carotenoid oxygenase gene from *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) / J. C. Huang, Y. Wang, G. Sandmann, F. Chen // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2006. - Vol. 71, iss. 4. - P. 473-479.
134. Isolation of non fastidious microalgae with astaxanthin-accumulation property and its potential for application to aquaculture / K. Fujii, E. Imazato, H. Nakashima, O. Ooi, A. Saeki // *Aquaculture.* - 2006. - Vol. 261, iss. 1. - P. 285-293.
135. Jeffery, S. W. Phytoplankton pigments in oceanography / S. W. Jeffrey, R. F. C. Mantoura, S. W. Wright // *Monographs on oceanographic methods* / UNESCO. - Paris, 1997. - 661 p.

136. Johnson, E. A. Astaxanthin from microbial sources / E. A. Johnson, G. H. An // Crit. Rev. Biotechnol. - 1991. - Vol. 11, no. 4. - P. 297-326.
137. Kang, C. D. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* / C. D. Kang, J. S. Lee, T. H. Park // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2005. - Vol. 68, iss. 2. - P. 237-241.
138. Katayama, T. The Biosynthesis of Astaxanthin-V : Interconversion of the algal carotenoids *Stigeoclonium* sp. into fish carotenoids fancy red carps / T. Katayama, H. Tsuchiya, C. O. Chichester // Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. - 1971. - Vol. 20, no. 1. - P. 173-184.
139. Kidd, P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential / P. Kidd // Altern. Med. Rev. - 2011. - Vol. 16, no. 4. - P. 355-364.
140. Kobayashi, M. Astaxanthin production by a green alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media / M. Kobayashi, T. Kakizono, S. Nagai // J. Ferment. Bioeng. - 1991. - Vol. 71, iss. 5. - P. 335-339.
141. Kobayashi, M. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis* / M. Kobayashi, T. Kakizono, S. Nagai // Appl. Environ. Microbiol. - 1993. - Vol. 59, iss. 3. - P. 867-873.
142. Kobayashi, M. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis* / M. Kobayashi, Y. Sakamoto // Biotechnol. Lett. - 1999. - Vol. 21, no. 4. - P. 265-269.
143. Komárek, R. Polynuclearity of vegetative cells in coccal green algae from the family *Neochloridaceae* / R. Komárek // Arch. Protistenk. - 1989. - Vol. 137, iss. 3. - P. 255-273.
144. Krishna, K. B. Secondary carotenoid production in green algae / K. B. Krishna, P. Mohanty // J. Sci. Ind. Res. India. - 1998. - Vol. 57, no. 2. - P. 51-63.
145. Laatsch, H. Identification and quantification of carotenoids and carotenoid esters from the foraminif-eran *Allogromia laticollaris* Arnold / H. Laatsch, D. Schwab // J. Foramin. Res. - 1984. - Vol. 14, no. 1. - P. 36-49.
146. Lang, N. J. Electron microscopic studies of extraplastidic astaxanthin in *Haematococcus* / N. J. Lang // J. Phycol. -1968. - Vol. 4, iss. 1. - P. 12-19.

147. Lemoine, Y. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress / Y. Lemoine, B. Schoefs // *Photosynth. Res.* - 2010. - Vol. 106, iss. 1-2. - P. 155-177.
148. Lers, A. Co-regulation of a gene homologous to early light-induced genes in higher plants and beta-carotene biosynthesis in the alga *Dunaliella bardawil* / A. Lers, H. Levy, A. Zamir // *J. Biol. Chem.* - 1991. - Vol. 266, no. 21. - P. 13698-13705.
149. Liaaen-Jensen, S. Basic Carotenoid Chemistry / S. Liaaen-Jensen // *Carotenoids in Health and Disease* / Eds.: N. I. Krinsky, S. T. Mayne, H. Sies. - CRC Press, 2004. - Ch. 1. - P. 1-30.
150. Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes / H. K. Lichtenthaler // *Method. Enzymol.* - 1987. - Vol. 148. - P. 350-382.
151. Lichtenthaler, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants / H. K. Lichtenthaler // *Annu. Rev. Plant Phys.* - 1999. - Vol. 50. - P. 47-65.
152. Linden, H. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation / H. Linden // *BBA-Gene Struct. Expr.* - 1999. - Vol. 1446, iss. 3. - P. 203-212.
153. Liu, B. H. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp / B. H. Liu, Y. K. Lee // *J. Appl. Phycol.* - 2000. - Vol. 12, iss. 3-5. - P. 301-307.
154. Lorenz, R. T. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin / R. T. Lorenz, G. R. Cysewski // *Tibtech. Appl.* - 2000. - Vol. 18. - P. 160-167.
155. Lorquin, J. Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic bradyrhizobium strains / J. Lorquin, F. Molouba, B. L. Dreyfus // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1997. - Vol. 63, no. 3. - P. 1151-1154.
156. Lotan, T. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Gene Encoding β -C-4-Oxygenase, That Converts β -Carotene to the Ketocarotenoid Canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis* / T. Lotan, J. Hirschberg // *FEBS Lett.* - 1995. - Vol. 364, iss. 2. - P. 125-128.

157. Ma, R. Y-N. Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp / R. Y-N. Ma, F. Chen // *Biotechnol. Lett.* - 2001. - Vol. 23, iss. 7. - P. 519-523.
158. Malis, S. A. Accumulation of canthaxanthin in *Chlorella emersonii* / S. A. Malis, E. Cohen, A. Ben Amotz // *Physiol. Plantarum.* - 1993. - Vol. 87, iss. 2. - P. 232-236.
159. Margalith, P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae / P. Z. Margalith // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1999. - Vol. 51, iss. 4. - P. 431-438.
160. Mata, T. M. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review / T. M. Mata, A. A. Martins, N. S. Caetano // *Renew. Sust. Energ. Rev.* - 2010. - Vol. 14, iss. 1. - P. 217-232.
161. Matsuno, T. Comparative biochemical studies of carotenoids in fish—XXVII. Carotenoids in the eggs of three species of cyprinidae / T. Matsuno, T. Maoka, Y. Ikuno // *Comp. Biochem. Phys. B.* - 1986. - Vol. 83, iss. 2. - P. 335-337.
162. McNulty, H. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions / H. McNulty, R. F. Jacob, R. P. Mason // *Am. J. Cardiol.* - 2008. - Vol. 101, iss. 10 (Suppl.). - P. S20-S29.
163. Method of retarding and ameliorating central nervous system and eye damage, US Patent # 5527533 / M. O. Tso, T. T. Lam. - Board of trustees of the University of Illinois, United States of America. - 1996.
164. Micro- and macro-algae: Utility for industrial applications : Outputs from EPOBIO project / A. S. Carlsson, J. B. van Beilen, R. Moller, D. Clayton. - Chippenham : CPL Press, 2007. - 86 p.
165. Microalgae as a source for secondary carotenoid production: a screening study / J. Kopecký, B. Schoefs, K. Loest, D. Stys, O. Pulz // *Arch. Hydrobiol.* - 2000. - Vol. 133. - P. 153-168.
166. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis* / M. Kobayashi, Y. Kurimura, T. Kakizono, N. Nishino, Y. Tsuji // *J. Ferment. Bioeng.* - 1997. - Vol. 84, iss. 1. - P. 94-97.

167. Moulin, P. Modifications of the carotenoid metabolism in plastids: a response to stress conditions / P. Moulin, Y. Lemoine, B. Schoefs // Handbook of plant and crop stress / Ed. M. Pessarakli. - CRC Press, 2010. - P. 407-433.
168. Naguib, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids / Y. M. A. Naguib // J. Agric. Food. Chem. - 2000. - Vol. 48, no. 4. - P. 1150-1154.
169. Nakada, T. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses / T. Nakada, K. Misawa, H. Nozaki // Mol. Phylogenet. Evol. - 2008. - Vol. 48, iss. 1. - P. 281-291.
170. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments / L. M. Lubian, O. Montero, I. Moreno-Garrido, I. E. Huertas, C. Sobrino, M. G.-del Valle, G. Pares // J. Appl. Phycol. - 2000. - Vol. 12, iss. 3-5. - P. 249-255.
171. Negro, J. J. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks *Ciconia ciconia* feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarkii*) / J. J. Negro, J. Garrido-Fernandez // Comp. Biochem. Phys. B. - 2000. - Vol. 126, iss. 3. - P. 347-352.
172. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for PSY and PDS steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress / S. N. Coesel, A. C. Baumgartner, L. M. Teles, A. A. Ramos, N. M. Henriques, L. Cancela, J. C. S. Vareda // Mar. Biotechnol. - 2008. - Vol. 10, iss. 5. - P. 602-611.
173. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina* / H. Mendoza, A. Martel, M. Jiménez del Rio, G. G. Reina // J. Appl. Phycol. - 1999. - Vol. 11, iss. 1. - P. 15-19.
174. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions / A. S. Cifuentes, M. A. Gonzalez, S. Vargas, M. Hoeneisen, N. Gonzalez // Biol. Res. - 2003. - Vol. 36, no. 3-4. - P. 343-357.
175. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis* / J. Fábregas, A. Domínguez, M. Regueiro, A. Maseda, A. Otero // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2000. - Vol. 53, iss. 5. - P. 530-535.

176. Palozza, P. Antioxidant effects of carotenoids in Vivo and in Vitro: An overview / P. Palozza, N. I. Krinsky // Method. Enzymol. - 1992. - Vol. 213. - P. 403-420.
177. Park, E. K. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths / E. K. Park, C. G. Lee // J. Microbiol. Biotechnol. - 2001. - Vol. 11, no. 6. - P. 1024-1030.
178. Pashkow, F. J. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease / F. J. Pashkow, D. G. Watumull, C. L. Campbell // Am. J. Cardiol. - 2008. - Vol. 101, iss. 10(A). - P. 58D-68D.
179. Pelah, D. The effect of salt stress on the production of cantaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity / D. Pelah, A. Sintov, E. Cohen // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2004. - Vol. 20, iss. 5. - P. 483-486.
180. Physiological, biochemical, and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta) / E. Kessler, M. Schafer, C. Hummer, A. Kloboucek, V. A. R. Huss // Bot. Acta. - 1997. - Vol. 110, iss. 3. - P. 244-250.
181. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae) / K. Grünwald, M. Eckert, J. Hirschberg, C. Hagen // Plant Physiol. - 2000. - Vol. 122, iss. 4. - P. 1261-1268.
182. Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography / Eds. S. Roy, C. A. Llewellyn, E. S. Egeland, G. Johnsen. - Cambridge : Cambridge Univ. Press. - 2011. - 874 p.
183. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress / E. Bar, M. Rise, M. Vishkautsan, S. (M.) Arad // J. Plant Physiol. - 1995. - Vol. 146, iss. 4. - P. 527-534.
184. Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga / L. Gouveia, G. Choubert, N. Pereira, J. Santinha, J. Empis, E. Gomes // Aquac. Res. - 2002. - Vol. 33, iss. 12. - P. 987-993.

185. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae / J. P. Yuan, J. Peng, K. Yin, J. H. Wang // *Mol. Nutr. Food Res.* - 2011. - Vol. 55, iss. 1. - P. 150-165.
186. Pringsheim, E. G. Nutritional requirements of *Haematococcus pluvialis* and related species / E. G. Pringsheim // *J. Phycol.* - 1966. - Vol. 2, iss. 1. - P. 1-7.
187. Proctor, V. W. Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis* / V. W. Proctor // *Ecology.* - 1957. - Vol. 38, no. 3. - P. 457-462.
188. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae / M. Orosa, E. Torres, P. Fidalgo, J. Abalde // *J. Appl. Phycol.* - 2000. - Vol. 12, iss. 3-5. - P. 553-556.
189. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Faar, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* - 1951. - Vol. 193, no. 1. - P. 265-275.
190. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass / C. V. González López, M. D. C. C. García, F. G. A. Fernández, C. S. Bustos, Y. Chisti, J. M. Sivilla // *Bioresour Technol.* - 2010. - Vol. 101, iss. 19. - P. 7587-7591.
191. Qin, S. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) / S. Qin, G. X. Liu, Z. Y. Hu // *Process Biochem.* - 2008. - Vol. 43, iss. 8. - P. 795-802.
192. Remias, D. Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis* / D. Remias, U. Lütz-Meindl, C. Lütz // *Eur. J. Phycol.* - 2005. - Vol. 40, iss. 3. - P. 259-268.
193. Richmond, A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view / A. Richmond // *J. Appl. Phycol.* - 2000. - Vol. 12, iss. 3-5. - P. 441-451.
194. Río, E. D. Efficient one step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture / E. D. Rio, G. Acién, M. G. García-Malea // *Biotechnol. Bioeng.* - 2005. - Vol. 91, no. 7. - P. 808-815.
195. Rmiki, N. E. Carotenoids and stress in higher plants and algae / N. E. Rmiki, B. Schoefs, Y. Lemoine // *Handbook of plant and crop stress* / Ed. M. Pessarakli. - CRC Press, 2010. - P. 465-482

196. Rodriguez-Amaya, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods / D. B. Rodriguez-Amaya. - Washington : ILSI Press. - 2001. - 71 p.
197. Rowan, K. S. Photosynthetic pigments of algae / K. S. Rowan. - Cambridge : Cambridge Univ. Press. - 1989. - 334 p.
198. Selva, A. Tandem-MS for the structure characterization of novel or very rare seco-carotenoids isolated from leaves of two Cycads / A. Selva, F. Cardini // Org. Mass. Spectrom. - 1993. - Vol. 28, iss. 5. - P. 570-573
199. Strickland, J. D. H. Determination of carbohydrate / J. D. H. Strickland // Strickland J. D. H. A practical handbook of seawater analysis / J. D. H. Strickland, T. R. Parsons. - Ottawa, 1968. - P. 173-174. - (Fish. Res. Board Can., Bull. no. 167).
200. Studies on the formation and localization of primary and secondary carotenoids in the green alga *Botryococcus braunii*, including the regreening process / M. Grung, P. Metzger, C. Berkaloff, S. Liaaen-Jensen // Comp. Biochem. Phys. B. - 1994. - Vol. 107, iss. 2. - P. 265-272.
201. Sukenik, A. Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* / A. Sukenik // Chemicals from Microalgae / Ed. Z. Cohen. - CRC Press, 1999. - P. 41-56.
202. Synthese von optisch aktiven, natürlichen Carotenoiden und strukturell verwandten Naturprodukten IX. Synthese von (3R)-Hydroxyechinenon, (3R,3'R)- und (3R,3'S)-Adnixanthin, (3R)-Adonirubin, deren optischen Antipoden und verwandten Verbindungen / K. Bernhard, G. Englert, H. Mayer, R. K. Muller, A. Ruttimann, M. Vecchi, E. Widmer, R. Zell // Helv. Chim. Acta. - 1981. - Vol. 64, iss. 7. - P. 2469 -2484.
203. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions / S. Takaichi // Mar Drugs. - 2011. – Vol. 9. - P. 1101–1118.
204. Taxonomic status of the species of the green algal genus *Neochloris* / T. R. Deason, P. C. Silva, S. Watanabe, G. L. Floyd // Plant Syst. Evol. - 1991. - Vol. 177, iss. 3-4. - P. 213-219.
205. The supplementation effect of astaxanthin on accommodation and asthenopia / Y. Nagaki, M. Mihara, H. Tsukahara, O. Shigeak // J. Clin. Ther. Med. - 2006. - Vol. 22, no. 1. - P. 41-54.

206. The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology / L. Krienitz, E. Hegewald, D. Hepperle, M. Wolf // *Biologia*. - 2003. - Vol. 58, no. 4. - P. 437-446.
207. Thompson, J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // *Nucleic Acids Res.* - 1994. - Vol. 22, iss. 22. - P. 4673-4680.
208. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis* / M. Wayama, S. Ota, H. Matsuura, N. Nango, A. Hirata, S. Kawano // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. - № 1. P. e53618.
209. Tripathi, U. Effect of culture conditions on growth of green alga - *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production / U. Tripathi, R. Sarada, G. A. Ravishankar // *Acta Physiol. Plant.* - 2002. - Vol. 24, iss. 3. - P. 323-329.
210. Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* / J. Fábregas, A. Otero, A. Maseda, A. Dominguez // *J. Biotechnol.* - 2001. - Vol. 89, iss. 1. - P. 65-71.
211. Ultrafast transient lens spectroscopy of various C40 carotenoids: lycopene, β -carotene,(3R, 3' R)-zeaxanthin,(3R, 3' R, 6' R)-lutein, echinenone, canthaxanthin, and astaxanthin / M. Kopczynski, T. Lenzer, K. Oum, J. Seehusen, M. T. Deidel, V. G. Ushakov // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2005. - Vol. 7, iss. 14. - P. 2793-2803.
212. Utilization of (3S, 3' S) astaxanthin acyl esters in pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / J. Bowen, C. Soutar, R. Serwata, S. Lagocki, D. A. White, S. J. Davies, A. J. Young // *Aquacult. Nutr.* - 2002. - Vol. 8, iss. 1. - P. 59-68.
213. Watanabe, M. M. Freshwater culture media / M. M. Watanabe // *Algal culturing techniques* / Ed. R. A. Andersen. - London, 2005. - P. 13-21.
214. Watanabe, S. Comparative ultrastructure of the zoospores of nine species of *Neochloris* (Chlorophyta) / S. Watanabe, G. L. Floyd // *Plant Syst. Evol.* - 1989. - Vol. 168, iss. 3-4. - P. 195-219.

215. Xantophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application / J. EonSeon, J. E. W. Polle, H.-K. Lee, S.-M. Hyun, M. Chang // J. Microbiol. Biotechnol. - 2003. - Vol. 13, no. 2. - P. 165-174.
216. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (*Trebouxiophyceae*, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga / J. Neustupa, M. Eliás, P. Skaloud, Y. Nemcova, L. Seinochova // Phycologia. - 2011. - Vol. 50, iss. 1. - P. 57-66.
217. Yamaguchi, K. Lipid composition of green alga *Botryococcus braunii* / K. Yamaguchi, H. Nakano, M. Murakami, S. Konosu, O. Nakayama, M. Kanda, A. Nakamura, H. Iwamoto // Agric. Biol. Chem.- 1987. - Vol. 51, no. 2. - P. 493-498.
218. Yokoyama, A. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum* / A. Yokoyama, W. Miki // FEMS Microbiol. Lett. - 1995. -T. 128, iss. 2. - P. 139-144.
219. Young, A. Carotenoids and stress / A. Young, G. Britton // Stress responses in plants : adaptation and acclimation mechanisms / Eds.: R. G. Alscher, J. R. Cumming. - N. Y., 1990. - P. 87-112. - (Plant Biol. , Vol. 12).
220. Zhang, D. H. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp / D. H. Zhang, Y. K. Ng, S. M. Phang // J. Appl Phycol. - 1997. - Vol. 9, iss. 2. - P. 147-155.
221. Zhang, D. H. Two-step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum* sp. strain MA-1 / D. H. Zhang, Y. K. Lee // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2001. - Vol. 55, iss. 5. - P. 537-540.
222. β -Carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: the Women's Health Study / I. M. Lee, N. R. Cook, J. E. Manson, J. E. Buring, C. H. Hennekens // J. Nati. Cancer Inst. - 1999. - Vol. 91, iss. 24. - P. 2102-2106.