

Г. С. МИНЮК, И. В. ДРОБЕЦКАЯ, И. Н. ЧУБЧИКОВА,
Н. В. ДАНЦЮК, Э. С. ЧЕЛЕБИЕВА

СКРИНИНГ ЗЕЛЁНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПРИРОДНЫХ КЕТОКАРОТИНОИДОВ. АКТУАЛЬНОСТЬ, СТРАТЕГИЯ И ТАКТИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Дано обоснование актуальности, стратегии и тактики исследований, направленных на выявление новых коммерчески перспективных видов зелёных микроводорослей для получения природных кетокаротиноидов астаксантина и кантаксантина. Приведена унифицированная схема скрининга, основанная на методе двухстадийной накопительной культуры.

Ключевые слова: микроводоросли, культивирование, вторичный каротиногенез, астаксантин

Поиск новых промышленно перспективных видов микроводорослей-продуцентов кетокаротиноидов (ККР) астаксантина (АСТ) и кантаксантина (КАН) является одним из новых активно развивающихся направлений в биотехнологии микроводорослей. Актуальность проблемы определяется высокой биологической ценностью пигментов, широким спектром возможных областей их применения, а также неуклонно растущим рыночным спросом на природные формы каротиноидов (КР), инициированным рекомендациями ВОЗ по полному исключению синтетических БАВ и красителей из производства продуктов питания и кормов [9, 11, 13, 18, 23].

Основной сферой потребления АСТ и КАН традиционно является аквакультура лососевых рыб и ракообразных, утилизирующая до 58 % всех производимых в мире КР [9, 32]. В последнее десятилетие после проведения медико-биологических и клинических испытаний безопасности и терапевтической эффективности АСТ и КАН (особенно после коррекции суточных норм потребления КАН) заметно увеличилось их использование в медицине, пищевой и косметической промышленности [11, 13, 18, 23]. В 2007 г. их суммарная доля в общем объёме мировых продаж КР (43 %) на 11 % превысила уровень реализации недавнего лидера рынка – β -каротина. Однако до сих пор около 90 % всех производимых ККР получают путем химического синтеза и только 10 % – из природного сырья [32]. Несмотря на положительный прогноз развития отрасли на период 2007 – 2015 гг. (1,8 - 2,3 % годового прироста), существенного изменения этого соотношения в пользу натуральных пигментов в ближайшие годы не предвидится. Список промышленных продуцентов АСТ исчерпывается всего лишь двумя видами микроорганизмов (микроводоросль *Haematococcus* и дрожжи *Xanthophyllomyces dendrorhous*), а коммерчески выгодный источник природного КАН пока не известен. Более чем трехкратное ценовое превосходство синтетического аналога, обусловленное наличием у *H. pluvialis* ряда неблагоприятных для массового культивирования биологических особенностей и низким содержанием АСТ в биомассе дрожжей (30 - 800 мг·кг⁻¹) [17], вытесняет природную форму из наиболее ёмкой сферы потребления КР – производства кормов – и ограничивает ее применение выпуском дорогостоящих нутрицевтиков, лекарственных препаратов и косметики.

Одним из вариантов выхода из сложившейся ситуации может быть выявление новых, более технологичных и экономически рентабельных продуцентов АСТ и КАН, среди которых наиболее серьезный практический интерес представляют зелёные микроводоросли [6, 14, 18, 28, 33]. Хотя альтернатива *H. pluvialis*, равноценная ему по содержанию АСТ в биомассе (до 4 % сухого вещества), в этом таксоне пока найдена, установлено, что значительное число водорослей (по нашей литературной сводке более 80) при

определенных условиях накапливает смесь кетокаротиноидов, среди которых на долю АСТ может приходиться до 60 %. Остальные компоненты состава ККР (включая и КАН) являются метаболическими предшественниками АСТ, отличающимися от него по химической структуре лишь по числу кето- и гидроксигрупп в β -циклах и характеризующимися сходной биологической активностью [12, 13]. Состав вторичных КР у таких видов формируется в ходе реализации двух основных путей биосинтеза АСТ, соотношение которых зависит как от генетически предопределенного набора ферментов, так и изменения их активности под действием факторов внешней среды [20, 30, 39]. Активные исследования ростовых и метаболических характеристик отдельных видов Chlorophyceae (*Chlorococcum* sp. [30, 31, 39, 40], *Chlorella zofingiensis* [16, 24, 34], *Scenedesmus* spp. [22, 26, 35], *Coelastrella striolata* [7], *Botriococcus braunii* [38]) как претендентов на роль объектов промышленной биотехнологии ведутся в Израиле, Испании, Китае, Японии и др. странах. В Украине работы в этом направлении впервые начаты в Институте биологии южных морей НАН Украины им А.О. Ковалевского (ИнБЮМ НАНУ) в 2008 г. в рамках проекта «Комплексные исследования биологических и экологических ресурсов Азово-Черноморского бассейна и других стратегически важных регионов Мирового океана» [6]. Их предпосылкой послужило обобщение результатов исследований, направленных на разработку более экономичного способа выращивания *H. pluvialis*, выполненных по комплексной программе НАН Украины «Новые медико-биологические проблемы и окружающая среда человека» (2004 – 2007 гг.) [5].

Анализ литературных сведений по проблеме показал, что бессистемный, в значительной степени случайный выбор видов для тестирования их коммерческой перспективности как источников ККР, основанный на весьма полезном и простом, но не всегда достаточном критерии – покраснении старых агаризованных культур – приводит к неубедительным результатам. Достаточно обширный, но чрезвычайно разрозненный фактический материал, характеризующий содержание и состав вторичных КР у отдельных представителей филогенетически и экологически удаленных групп, полученный, к тому же, при разных экспериментальных условиях, дает весьма неопределенную и противоречивую информацию для формирования стратегии поисковых исследований.

Более результативным, по нашему мнению, может оказаться подход, базирующийся на планомерном скрининге по единой схеме близкородственных таксонов, насчитывающих наибольшее число видов с ярко выраженным ВКРГ. При этом особое внимание следует уделять обитателям гиперсолёных и пресноводных временных водоёмов, почвенным и аэрофитным водорослям, успешно переживающим в ходе жизненного цикла действие экстремальных факторов внешней среды (обезвоживания, интенсивной солнечной радиации, высокой температуры, солёности и др.) благодаря накоплению ККР.

Первостепенное значение при таком подходе имеет выбор системы Chlorophyta, отражающей реальные родственные связи между таксонами. Внедрение электронно-микроскопических и молекулярно-генетических методов исследования в альгологию привело к радикальному пересмотру структуры этого отдела на уровне таксонов всех рангов и, что наиболее важно в данном контексте, к установлению гетерогенности класса Chlorophyceae, наиболее богатого продуцентами ККР [2, 14, 28, 33]. Массив информации, касающейся таксономии Chlorophyta, непрерывно пополняется и общепринятая классификация отдела пока отсутствует. Это в значительной мере затрудняет сравнительный анализ и систематизацию литературных данных по составу вторичных КР у микроводорослей так как одни и те же виды в принятых в настоящее время классических (морфолого-онтогенетических) и современных (цитологических и молекулярных) системах оказываются на различных ветвях филогенетического древа Chlorophyta. Наиболее полезной в данном аспекте представляется 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 микроводо-

послей к синтезу вторичных КР [2]. Эта система четко очерчивает границы поиска продуцентов АСТ и КАН в рамках отдела Chlorophyta двумя классами – Chlorophyceae и Ulvophyceae. Причем среди Chlorophyceae наибольший интерес представляют порядки, принадлежащие к эволюционным линиям *Chlamydomonas applanata* (Protosiphonales, Volvocales, Chaetophorales) и *Chlamydomonas lobulata* (Scenedesmales). Прогностический характер системы хорошо подтверждается уже имеющимся фактическим материалом [7, 14, 15, 16, 21, 22, 24, 26, 28, 33 - 38] за исключением данных, характеризующих наличие биосинтеза АСТ и КАН у *Chlorococcum* sp. [30, 31, 39, 40]. По И. Ю. Костикову, порядок Chlorococcales существенно отличается по составу от классического «*sensu stricto*», принадлежит к генетически обособленной филогенетической линии *Chlamydomonas toewusii* и характеризуется отсутствием у его представителей способности накапливать вторичные КР [2]. Из рода *Chlorococcum* авторы вывели одноядерные виды, имеющие цитологические и молекулярные признаки протосифоновых водорослей и объединили их в составе приложения к роду *Neosporangiococcum* (Protosiphonales), насчитывающего, по данным [15], более десятка видов, накапливающих АСТ и КАН. Не исключено, что в цитированных выше работах по *Chlorococcum* sp. на самом деле речь идет именно о таких видах. Отдавая предпочтение данному варианту таксономии Chlorophyta, мы, разумеется, принимаем во внимание, что она, как и любая другая из ныне существующих, не окончательна и в определенной мере дискуссионна. Тем не менее, пока это единственная система, ставящая наличие ВКРГ у зелёных микроводорослей на уровень таксономического критерия. Вполне возможно, что результаты сравнительного анализа фракционного состава вторичных ККР у различных видов Chlorophyceae окажутся полезными для ее верификации или уточнения.

Стратегия поиска новых промышленно перспективных продуцентов АСТ и КАН внутри класса Chlorophyceae должна включать два последовательных этапа, каждый из которых предполагает решение ряда взаимосвязанных задач.

I этап – первичный скрининг – предусматривает:

- создание коллекции культур микроводорослей-продуцентов ККР, включающей представителей перечисленных выше порядков с различной экологической специализацией;

- проведение предварительной оценки скорости роста и накопления вторичных КР в клетках микроводорослей при выращивании по унифицированной схеме и отбор видов с наиболее высоким среднесуточным выходом АСТ и КАН;

- оптимизацию методов анализа фракционного состава вторичных КР применительно к конкретным видам.

II этап – оценка продукционного потенциала отобранных в результате первичного скрининга видов в оптимизированных условиях культивирования. Его основные задачи:

- подбор оптимального сочетания физико-химических параметров культивирования (минерального обеспечения, светового, температурного и газового режимов), способствующего наиболее полной реализации генетически предопределенного продукционного потенциала видов и обеспечения максимального выхода биомассы в конце «зелёной» стадии культивирования;

- установление верхних границ толерантности видов к экстремально высоким величинам освещённости, температуры, pH и солёности для разработки эффективных методов перевода культур на стадию ВКРГ, предполагающих массивное накопление ККР в культурах при минимальной смертности вегетативных клеток;

- оценка степени вариабельности фракционного состава ККР у отдельных видов в зависимости от условий культивирования для установления возможности управления полнотой трансформации интермедиатов биосинтеза АСТ в конечный продукт;

- определение суммарной антиоксидантной активности экстрактов КР из биомассы в системах *in vitro* для оценки их биологической ценности;

– анализ и обобщение экспериментальных данных и разработка рекомендаций по внедрению новых видов в практику массового культивирования для получения АСТ и КАН.

В настоящее время базовый экспериментальный фонд живых культур микроводорослей-продуцентов ККР насчитывает 33 штамма зелёных микроводорослей. Его формирование осуществляется путем межколлекционного обмена, а также в ходе собственных полевых сборов. Основной принцип начальной комплектации такой специализированной коллекции – подбор набора модельных объектов, характеризующих надвидовые таксоны одной и той же «перспективной» филогенетической линии от ее основания до вершины. В дальнейшем видовой состав наиболее интересных семейств и родов будет расширяться за счет представителей разных экологических групп.

Виды, уже имеющиеся в нашем распоряжении, получены из ведущих коллекций Украины (АСКУ – Киевский национальный университет им. Т.Г. Шевченко; IBASU А – Институт ботаники НАНУ), России (IPRAS – Институт физиологии растений РАН; CALU – Санкт-Петербургский университет), а также из коллекции Института гидробиологии Китайской АН (FACHB) (табл. 1). В ИнБЮМ НАНУ культуры поддерживаются на агаризованных (1,5 %) средах BBM [8], ОНМ (штаммы *H. pluvialis*) [19] и CHU-13 (*Botryococcus braunii*) [38] при постоянной температуре 13 - 15 °С и непрерывном освещении люминесцентными лампами «Ферон» DL 20W T4 6400K (2000 Лк) с пересевом через 2 - 2,5 месяца. Перед проведением экспериментов коллекционные штаммы, полученные из других научных учреждений, хранившиеся длительное время на твердых средах (иногда в течение нескольких десятилетий), а также «дикие» штаммы, выделенные из полевых проб, выдерживаются в течение 3 - 4 месяцев при естественном рассеянном свете на жидкой среде BBM или CHU-13 [38] и постоянной продувке воздухом со скоростью $1\cdot 3\cdot 10^{-4}$ м³·л⁻¹ культуры·мин⁻¹ с пересевом через каждые 10 - 14 дней. В противном случае инокуляты, полученные путем переноса клеток непосредственно с агаризованных сред в жидкие, нередко демонстрируют в эксперименте низкие скорости роста, искажая тем самым результаты первичного скрининга.

С учетом собственного опыта экспериментальных исследований Chlorophyceae [3 - 6] и цитированных выше литературных данных была разработана унифицированная схема выращивания водорослей на этапе первичного скрининга, основанная на методе двухстадийной накопительной культуры. Этот метод, впервые использованный М. Kobayashi в исследованиях биосинтеза АСТ у *H. pluvialis*, дает возможность получать в одном эксперименте за сравнительно короткое время данные по двум наиболее важным для скрининга критериям: скорости нелимитированного условиями среды роста и выходу ККР из литра культуры [3, 27]. Одностадийная культура для этих целей менее пригодна, так как рост и биосинтез ККР у микроводорослей, как правило, разобщены в пределах клеточного цикла и для интенсификации ВКРГ нужно или изначально снижать концентрацию биогенов в среде (ухудшая тем самым условия для роста), или увеличивать продолжительность периода наблюдений до 35 - 40 сут.

Поскольку для большинства будущих объектов исследования потребности в элементах питания в условиях лабораторного культивирования неизвестны, для I (вегетативной или «зелёной») стадии была выбрана универсальная для Chlorophyceae питательная среда BBM 3N [8]. Освещённость, температуру, скорость продувки газозвоздушной смесью и начальную численность клеток подбирали таким образом, чтобы их величины находились в середине рабочих диапазонов, предложенных для *Scenedesmus*, *Chlorella* и *Chlorococcum* spp. и, вместе с тем, обеспечивали выход культур на стадию стационарного роста за 5 - 7 суток.

Для перевода культур на стадию индуцированного ВКРГ («красную» стадию) предпочтение было отдано наиболее эффективному из апробированных нами ранее (на примере *H. pluvialis*) способам и приёмам индукции и интенсификации ВКРГ – созданию резкого градиента всего комплекса ключевых параметров культивирования. В этом пла-

не наилучшие результаты дает 5 - 10-кратное разведение культур водой (или существенно редуцированной по азоту и фосфору средой) в сочетании с изменением режима освещения с одностороннего периодического (день:ночь) на круглосуточное двухстороннее. Такой прием приводит к развитию острого дефицита питания, более чем 20-кратному увеличению облучённости клеток и повышению температуры среды до величин, близких к верхнему пределу толерантности вегетативных клеток у многих видов *Chlorophyceae* (30 - 32 °C).

Таблица 1. Базовый экспериментальный фонд живых культур зелёных микроводорослей-продуцентов вторичных каротиноидов

Table 1. Base experimental stock of living cultures of green algae – secondary carotenoids producers

Название вида	Источник, год поступления в коллекцию ИнБЮМ	№ штамма в коллекции ИнБЮМ
<i>Ankistrodesmus</i> sp. Corda 1838	FACHB, 2007 (FACHB – 49)	IBSS-84
<i>Ankistrodesmus</i> sp. Corda 1838	Выделен Данцюк 2008, родниковый водоем, Севастополь	IBSS-87
<i>Botryococcus braunii</i> Kützing 1849	FACHB, 2007 (FACHB – 759)	IBSS-76
<i>Bracteacoccus giganteus</i> Bischoff et Bold 1963	ACKU, 2009 (ACKU 461-06)	IBSS-87
<i>Bracteacoccus minor</i> (Chodat) Petrova 1931	ACKU, 2009 (ACKU 506-06)	IBSS-88
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard 1888	IPPAS, 2007 (IPPAS D – 292)	IBSS-82
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard 1888	FACHB, 2007 (FACHB – 479)	IBSS-83
<i>Chlorella zofingiensis</i> Donz 1934	CALU, 2006 (CALU – 190)	IBSS-20
<i>Chlorococcum granatum</i> Meneghini em Starr 1955	CALU, 2006 (CALU – 859)	IBSS-11
<i>Chlorococcum vacuolatum</i> Starr 1955	ACKU, 2009 (ACKU 543-06)	IBSS-89
<i>Coelastrella vacuolata</i> Chodat	IBASU-A, 2003 (IBASU-A 183)	IBSS-21
<i>Deasonia granata</i> (Starr) Ettl et Komarek 1982	ACKU, 2009 (ACKU 566-06)	IBSS-90
<i>Dunaliella salina</i> Teodorescu 1905 (4 штамма)	Выделены: Шадрин, Данцюк, 2006-2008, солёные озера Крыма	IBSS-77-79; IBSS-85
<i>Ettlia carotinosa</i> Komarek 1989	ACKU, 2009 (ACKU 573-06)	IBSS-91
<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow emend. Wille 1844	Выделен: Минюк, Галатонова, 2003, ёмкость для пресной воды, г. Адлер	IBSS-18
<i>Haematococcus pluvialis</i>	IPPAS, 2004 (IPPAS H – 239)	IBSS-17
<i>Haematococcus pluvialis</i>	LABIK, 2006 (LABIK 927 – 1)	IBSS-16
<i>Haematococcus pluvialis</i>	FACHB, 2007 (FACHB – 712)	IBSS-73
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Выделен: Шадрин, Данцюк, 2008, лужа, Кавказ	IBSS-74
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Выделен: Дробецкая, Данцюк, 2008, лужа, Севастополь	IBSS-75
<i>Neosporangiococcum gelatinosum</i> (Archibald et Bold) Ettl et Gartner 1987	ACKU, 2009 (ACKU 631-06)	IBSS-92
<i>Pseudosporangiococcum protococcoides</i> Громов 1962	CALU, 2006 (CALU – 221)	IBSS-10
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing 1833	CALU, 2006 (CALU – 13)	IBSS-9
<i>Scenedesmus obliquus</i>	FACHB, 2007 (FACHB – 12)	IBSS-80
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turpin) Brébisson (1835)	IPPAS, 2007 (IPPAS S – 313)	IBSS-81
<i>Scenedesmus abundans</i> (Kirchner) Chodat 1926	IBASU, 2003 (IBASU – A 243)	IBSS-8
<i>Scenedesmus</i> sp. Meyen 1829	Выделен: Данцюк, 2008, родниковый водоем, Севастополь	IBSS-88
<i>Scenedesmus rubescens</i> Dangeard 1966	ACKU, 2009 (ACKU 647-06)	IBSS-93
<i>Scotiellopsis rubescens</i> Vinatzer 1975	IPPAS, 2006 (IPPAS H – 350)	IBSS-12
<i>Sporogochloris spongiosa</i> (Vischer) Starr 1955	ACKU, 2009 (ACKU 649-06)	IBSS-94

Накопление ККР в клетках водорослей можно существенно интенсифицировать путем увеличения соотношения C/N в среде за счёт повышения концентрации CO₂ в газо-воздушной смеси или внесения в среду ацетата натрия (NaAc) [3 – 6, 27]. Использование ацетата позволяет выявить различия между исследуемыми объектами по содержанию суммарных КР (ΣКР) в клетках уже на 3 - 5 сут. В принципе, этого вполне достаточно для отбора видов на этапе первичного скрининга. Однако с учетом того, что доля АСТ в ΣКР со временем увеличивается, и его общий выход зависит не только от скорости биосинтеза, но и уровня смертности клеток в присутствии ацетата [1], продолжительность II стадии целесообразно увеличить до 10-14 сут. В этом случае будут получены не только более корректные сведения по составу вторичных КР у разных видов, но и дополнительная информация об их устойчивости к стресс-воздействиям.

Что касается NaCl, применявшегося нами ранее в качестве индуктора ВКРГ у *H. pluvialis* [3, 4], то, как показали результаты наших последних экспериментов на других видах, это соединение следует использовать с осторожностью. В некоторых случаях даже сравнительно небольшие дозы соли (0,2 М), внесенные в среду в начале II стадии культивирования, вызывают тотальную гибель клеток. Такое явление мы наблюдали в скрининговом эксперименте в культурах *Chlorococcum vacuolatum* и *Spongiochloris spongiosa*, а также на примере *Scotiellopsis rubescens* при проведении стадии ВКРГ на ярком солнечном свете (40-100 кЛк) при температуре среды, достигающей в середине дня 40-44°C. Культуры с добавлением NaCl (0,2 М) на 6-е сутки погибли, а в контрольном варианте численность клеток на фоне активного накопления ККР сохранялась без изменения в течение 14 сут. По всей вероятности, для пресноводных и почвенных микроводорослей использование NaCl в качестве стресс-агента может быть рекомендовано лишь в условиях невысокой освещённости и температуры [6, 34].

Физико-химические параметры метода двухстадийной периодической культуры, использующегося в нашей лаборатории для первичного скрининга зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных ККР приведены в табл. 2.

Таблица 2. Физико-химические параметры двухстадийной периодической культуры для первичного скрининга зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов

Table 2. Physical-chemical parameters of two-stage batch culture for primary screening of green algae as potential source of natural ketocarotenoids

Стадия, (сут)	Питательная среда	Световой режим	Температура, °C	Концентрация CO ₂ , % v/v	Скорость барботажa, м ³ ·л ⁻¹ ·ч ⁻¹	Концентрация NaAc, ммоль
I (7)	BVM 3N	лампы «Feron» DL 20W T4 6400 К, одностороннее боковое освещение, интенсивность ФАР – 120 мкЕ·м ⁻² ·с ⁻¹ , 15 ч свет : 9 ч темнота	24-26	0,2	1,8·10 ⁻²	0
II (14)	1/10 BVM	двухстороннее боковое освещение, интенсивность ФАР – (130 мкЕ·м ⁻² ·с ⁻¹) x 2, 24 ч свет : 0 ч темнота	30-32	1,0	1,8·10 ⁻²	50

Начальная численность клеток в культурах разных видов в скрининговых экспериментах должна быть сходной и достаточно высокой – (1-2)·10⁶ кл·мл⁻¹, так как существенные межвидовые различия в максимальной удельной скорости роста, регистрируемые, как правило, только в сильно разрыхленных суспензиях, далеко не всегда положи-

тельно коррелируют с различиями в максимуме биомассы на стационарной фазе, т.е. в конце «зелёной» стадии. В то же время увеличение исходной плотности клеток, в сочетании с предварительной адаптацией водорослей к росту на среде ВВМ, минимизирует продолжительность лаг-фазы до 1 суток и обеспечивает достижение культурами стационарного состояния не более чем в недельный срок при практически полном поглощении биогенных элементов из среды. У быстро растущих видов дефицит питания при выращивании на сравнительно бедной по N и P среде может наступить раньше (на 5 – 6 сут), что обычно приводит к заметному увеличению содержания сухого вещества (СВ) в клетках. Такое накопление запасных веществ при ухудшении условий среды является характерной особенностью видов, способных к ВКРГ. Поэтому продукционные характеристики сравниваемых объектов необходимо оценивать одновременно по двум параметрам: изменению содержания СВ и численности клеток в культурах. Сведения о численности клеток необходимы также и для оценки уровня потерь (смертности) при действии стресс-агентов, индуцирующих ВКРГ [1].

Ключевым условием успешного скрининга продуцентов АСТ и КАН является корректное определение состава вторичных КР в биомассе микроводорослей. В фундаментальных исследованиях с этой целью используют преимущественно высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в сочетании с рядом физико-химических методов структурного анализа (УФ-ВИД-, масс-, и ЯМР- спектроскопии, рентген кристаллографии, кругового дихроизма, рамановской спектроскопии и др.) [12, 25]. Такой методический подход, позволяющий достоверно идентифицировать химическую природу КР и определять концентрацию минорных соединений в многокомпонентных смесях на уровне геометрических и стереоизомеров, используется с конца 1980-х годов при исследовании состава вторичных КР у *Chlorophyceae* в хемотаксономическом [12, 29] и метаболическом аспектах [20, 30], а также при установлении их биологических функций [9, 13, 25]. На основании идентификации основных путей биосинтеза АСТ из β -каротина и возможных точек их бифуркации, показано, что у видов класса *Chlorophyceae* максимально полный набор вторичных КР включает 8 пигментов [20, 30, 39] (рис. 1).

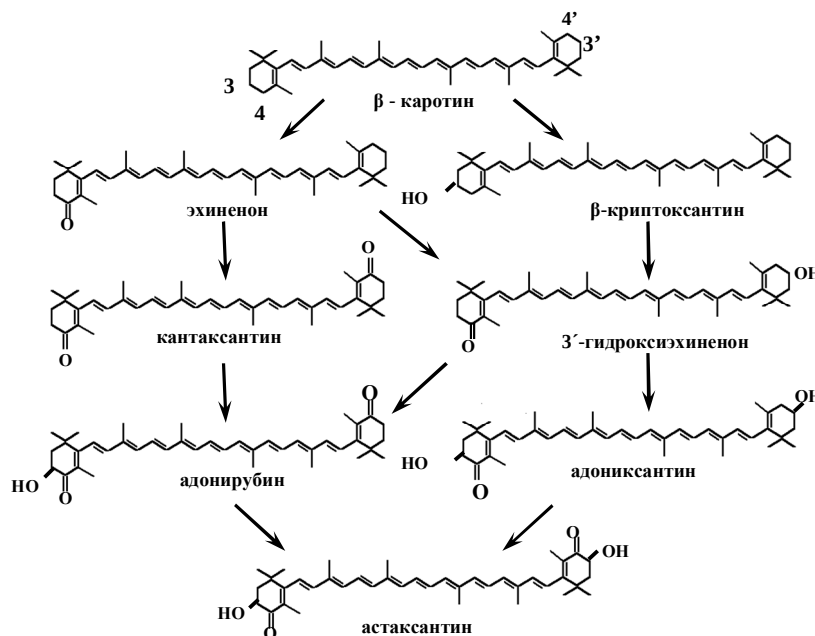


Рисунок 1. Гипотетическая схема путей биосинтеза кетокаротиноидов у зелёных микроводорослей [30, 39]

Figure 1. Hypothetical scheme of ketocarotenoids biosynthesis pathways in the green algae [30, 39]

Три из них (криптоксантин, гидроксиэхинонен и адонирубин) могут быть представлены двумя формами (свободной и в виде моноацильных эфиров), еще три (адониксантин, зеаксантин и астаксантин) – тремя формами (свободной и в виде моно- и диацильных эфиров), а кантаксантин и эхинонен, не содержащие гидроксильных групп, – только в свободной форме. Моно- и диэфиры одного и того же гидрооксокетокаротиноида могут быть образованы несколькими, различающимися по длине ацильного радикала и степени ненасыщенности жирными кислотами. Если же, в дополнение к этому учесть теоретически вероятное количество R/S и особенно E/Z изомеров у каждого из ККР [12], то задача количественного определения состава пигментов у множества видов на объемном экспериментальном материале при помощи прецизионных физико-химических методов приобретает для гидробиологов очертания практически неразрешимой.

На самом деле все обстоит не так пессимистично. Выбор метода исследования, как известно, определяется его конечной целью. В задачи скрининга продуцентов ККР уже по определению («screening» – грубая фильтрация, отсев) не входит скрупулезная идентификация и количественное определение всего комплекса пигментов у разных видов водорослей в специфических эколого-физиологических ситуациях. Его роль аналогична роли стрелочника, переводящего движение поездов в стратегически важном направлении, а ожидаемый результат должен заключаться в выявлении новых видов, отличающихся повышенной продуктивностью по АСТ и КАН в условиях интенсивной лабораторной культуры, и, следовательно, представляющих интерес для дальнейших многопрофильных исследований.

Как показывает уже имеющийся в нашей лаборатории опыт, для решения задач такого плана вполне приемлем метод абсорбционной тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле, обладающий достаточно хорошей разрешающей способностью в отношении эстерифицированных и свободных форм АСТ и КАН. Для этой цели одинаково пригодны хроматографические пластины различных торговых марок («Silufol», «Sorbfil», «Merk»). С учетом соотношения «цена – качество» наилучшим вариантом являются пластины «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А, на которых при правильном подборе системы растворителей можно количественно с хорошей воспроизводимостью результатов определять содержание ключевых ККР.

Для анализа ККР у видов с преобладанием одного из возможных путей биосинтеза АСТ и максимально полным превращением интермедиатов в конечный продукт (например, *H. pluvialis*) хорошие результаты дает распространенная система ацетон: гексан (25:75) [3 - 5]. Для видов, у которых АСТ синтезируется несколькими путями (например, у *Scenedesmales*), однократная разгонка проб в данной системе не позволяет отделить свободный АСТ от его непосредственных предшественников (адониксантина или адонирубина) и КАН от моноэфиров АСТ [6]. Полного разделения этих фракций можно достигнуть при последовательной одномерной хроматографии в двух системах: I – гексан-ацетон (9 : 1); II – гексан-бензол-ацетон (5 : 3,75 : 0,8). Идентификация КАН и различных форм АСТ не вызывает затруднений и может быть выполнена при помощи общепринятых спектроскопических, химических и хроматографических методов, описанных в [10, 36].

На этапе предварительного скрининга для «экспресс»-оценки интенсивности ВКРГ в клетках водорослей на «красной» стадии культивирования могут оказаться полезными такие простые показатели как скорость накопления сухого вещества в расчёте на клетку и отношение концентрации суммарных КР к концентрации хлорофилла *a* ($\Sigma\text{КР}/\text{ХЛ}a$) в культурах (коэффициент $\Sigma\text{КР}/\text{ХЛ}a$), положительно коррелирующие, соответственно со скоростью накопления суммарных каротиноидов и содержанием АСТ в клетках (рис. 2).

Во втором этапе исследований проводят сравнительный анализ продукционных характеристик видов, прошедших первый «тур» скрининга, при оптимизированных условиях культивирования для более обоснованной оценки их коммерческой перспективности.

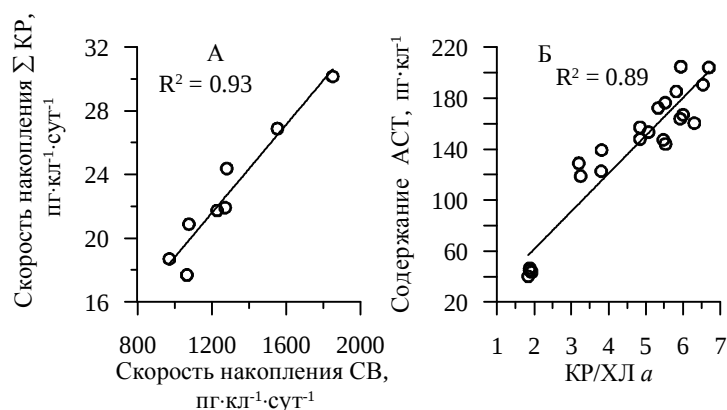


Рисунок 2. А – Зависимость между скоростью накопления сухого вещества и суммарных каротиноидов в клетках. Б – Зависимость между величиной коэффициента $\Sigma\text{КР}/\text{ХЛ}a$ в культурах и внутриклеточным содержанием астаксантина (на примере *H. pluvialis*)
 Figure 2. А – The relation between dry matter and total carotenoid's accumulation rate in cells. Б – The relation between Chl a/CAR coefficient value and intracellular astaxanthin contents (by the example of *H. pluvialis*)

На примере *H. pluvialis* нами показано, что выход АСТ из литра культуры водорослей является результирующей трех основных составляющих: величины биомассы, полученной в конце «зелёной» стадии, уровня ее потерь при комплексном стресс-воздействии, индуцирующем ВКРГ, и скорости накопления АСТ в клетках. В связи с этим быстро растущие и высоко устойчивые к экстремальным воздействиям виды (и, следовательно, менее прихотливые и более дешевые в производстве) даже при более низком содержании АСТ в биомассе, чем у *H. pluvialis*, могут оказаться более продуктивными по его выходу из литра культуры. Отсюда вытекают основные задачи II этапа, состоящие в подборе для конкретных видов микроводорослей оптимального для роста плотных культур сочетания основных параметров культивирования (освещённости, температуры и концентрации CO_2), разработке действенных и вместе с тем сберегающих методов индукции ВКРГ и выявлении факторов внешней среды, положительно влияющих на направленность и скорость промежуточных метаболических реакций при разветвленном синтезе АСТ.

В настоящее время возможность направленного сдвига процессов внутриклеточного окисления интермедиатов АСТ в сторону образования конечного продукта относится к разряду гипотетических и фактически данными подтверждена слабо. Положительная динамика относительного содержания АСТ в $\Sigma\text{КР}$, показанная в ряде работ [16, 24, 30, 40], нередко принимается за желанную «возможность управления процессом», который, не исключено, протекает при созревании спор самопроизвольно до генетически предопределенного предела. Но даже отрицательный в этом смысле результат не будет означать неудачу скрининговых исследований при выявлении активных продуцентов ККР с низким относительным содержанием АСТ во фракционном составе. Судя по химической структуре, такие ККР, как адонирубин (АР) и адониксантин (АК), по своим функциональным свойствам очень сходны с АСТ и в любом случае должны превосходить по антиоксидантной активности (АОА) уже известные природные соединения, в том числе и КАН [13]. При наличии многолетнего положительного опыта использования последнего в аквакультуре нет причин полагать, что более близкие по структуре к АСТ гидрокаротиноиды будут давать худшие результаты. Более того, может оказаться, что смесь ККР, включающая мощные антиоксиданты (АСТ, АР, АК), каротиноиды с провитаминной активностью (β -каротин, эхиненон, гидроксиэхиненон и криптоксантин [13]), а также «зрительный» пигмент лютеин, будет обладать более высокими

лечебно-профилактическими свойствами, чем отдельные КР в чистом виде. Первый шаг к оценке биологической ценности экстрактов биомассы новых продуцентов КР может быть сделан уже на этапе их скрининга путем оценки суммарной АОА экстрактов биомассы в системе *in vitro* при помощи несложного колориметрического метода, основанного на изменении интенсивности окраски 2,2 дифенил-1-пикрилгидразида (ДРРН) в присутствии АО [37]. Данные такого рода послужат основанием для инициирования медико-биологических испытаний безопасности и физиологической эффективности смесей водорослевых КР для человека и животных.

Проведение всего комплекса указанных выше исследований для отдельных, наиболее перспективных видов по сути дела будет являться разработкой лабораторного регламента их интенсивного культивирования как источников КР, который в дальнейшем может служить руководством для создания новых промышленных технологий получения природных КР.

Выводы. 1. Наибольшее число видов, способных к синтезировать КР в коммерчески значимых количествах, принадлежит к классу Chlorophyceae. **2.** Наиболее целесообразным направлением поиска новых объектов биотехнологии внутри этого класса является планомерный максимально унифицированный скрининг близкородственных таксонов, принадлежащих к филогенетическим линиям *Chlamydomonas applanata* и *Chlamydomonas lobulata*. **3.** Решению задач I этапа исследований в наибольшей степени соответствует метод двухстадийной накопительной культуры, позволяющий в короткие сроки получать данные по трем важным для первоначального отбора видов критериям: скорости роста, устойчивости к экстремальным внешним воздействиям и среднесуточному выходу Σ КР. **4.** Для разработки обоснованных рекомендаций относительно перспективности внедрения в промышленное культивирование видов, отобранных на этапе первичного скрининга, необходимо выполнить исследования по оценке их продукционных характеристик в условиях интенсивной культуры, при оптимальном для роста плотных популяций сочетании освещенности, температуры и концентрации CO₂. **5.** При проведении скрининговых исследований предварительная оценка биологической ценности экстрактов КР из биомассы новых продуцентов может быть выполнена по результатам определения фракционного состава КР методом ТСХ и определения их суммарной АО-активности в системе *in vitro* стандартными методами.

1. Данцюк Н.В. Влияние ацетата натрия на интенсивность вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* // Экология моря – 2010. – Спец. вып. 80: Биотехнология водорослей. – С. 44–50.
2. Костіков І. Ю., Романенко П. О., Демченко Е. М. і інш. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.
3. Минюк Г.С., Ерохин В.Е., Гордиенко А.П. Физиолого-биохимические и биофизические характеристики одноклеточной водоросли *Haematococcus pluvialis* – перспективного источника природного астаксантина / Микроводоросли Чёрного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. – С. 353–378.
4. Минюк Г. С., Терентьева Н. В., Дробецкая И. В. Сравнительная характеристика морфологических и физиолого-биохимических признаков трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyta, Chlamydomonadales) // Альгология. – 2007. – 17, № 2. – С. 148–159.
5. Минюк Г.С., Терент'єва Н.В. Дробецька І.В. и др. Спосіб культивування одноклітинної зеленої водорості *Haematococcus pluvialis* для одержання астаксантину / Патент № 87245 С2, UA, A01G 33/00, C12N 1/12, C12R 1/89. № а 200806137; Заявл. 12.05.2008; Опубл. 25.06.2009, Бюл. № 12.
6. Чубчикова И. Н., Минюк Г. С., Дробецкая И. В. и др. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов // Экология моря – 2009. – Вып. 77 – С. 77–83.
7. Abe K., Hattori H., Hirano M. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* // Food Chem. – 2007. – 100, No 2. – P. 656-661.
8. Andersen R. A., Berges J. A. Harrison P. J. et al. Recipes for Freshwater and Seawater Media / Algal Culturing Techniques. – Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. – P. 429-532.

9. Bjerkeng B. Carotenoids in Aquaculture: Fish and Crustaceans // Carotenoids. – Vol. 4: Natural Functions. – Basel: Birkhauser Verlag, 2008. – P. 237-254.
10. Britton G. TLC of Carotenoids / Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. – Boca Raton: CRC Press, 2008. – P. 543-574.
11. Carlsson A. S., van Beilen J. B., Moller R. et al. Micro- and macro-algae: Utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project. – Chippenham: CPL Press, 2007. – 86 p.
12. Carotenoids Handbook. – Basel: Birkhäuser, 2004. – 562 p.
13. Carotenoids in Health and Disease. – New York: Marcel Dekker, 2004. – 425 c.
14. Czygan F.-C. Primäre und sekundäre Carotenoide in chlorokokkalen Algen // Arh. Hydrobiol. Suppl. – 1982. – **60**, No 4. – P. 470 – 488.
15. Deason T. R., Czygan F.-C., Soeder C. J. Taxonomic significance of secondary carotenoid formation in *Neosporangium* (Chlorococcales, Chlorophyta) // J. Phycol. – 1977. – **13**. – P. 176 – 180.
16. Del Campo A., Rodrigues H., Moreno J. et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – **64**, No 6. – P. 848-854.
17. Dufossé L. Microbial and Microalgal Carotenoids as Colourants and Supplements // Carotenoids. – Vol. 5: Nutrition and Health. – Basel: Birkhauser Verlag, 2009. – P. 67-82.
18. Eonson J., Polle J. E., Lee H. K. et al. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application // J. Microbial. Biotechnol. – 2003. – **13**, N. 2. – P. 165 – 174.
19. Fábregas J., Otero A., Maseda A. Et al. Two stage for production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* // J. Biotechnol. – 2001. – **89**. – P. 65-71.
20. Fraser P.D., Miura Y., Misawa N. In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes // J. Biol. Chem. – 1997. – 272. – P. 6128-6135.
21. Fujii K., Imazato E., Nakashima H. et al. Isolation of non fastidious microalgae with astaxanthin-accumulation property and its potential for application to aquaculture // Aquaculture. – 2006. – **261**. – P. 285-293.
22. Hanagata N., Dubinsky Z. Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. – 1999. – **35**. – P. 960 - 966.
23. Higuera-Ciupara I., Félix-Valenzuela L., Coycoolea F. M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2006. – **46**. – P. 185-196.
24. Ip P.-F. Wong K.H., Chen. F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture // Process. Biochem. – 2004. – 39. – P. 1761-1766.
25. Khachik F. Analysis of Carotenoids in Nutritional Studies / Carotenoids. – Vol. 5: Nutrition and Health. – Basel: Birkhauser Verlag, 2009. – P. 7 - 44.
26. Kim M. K., Park J. W., Park C. S. et al. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater // J. Biores. Technol., – 2007. – **98**, No 11. – P. 2220 - 2228.
27. Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of green unicellular alga *Haematococcus pluvialis* // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – **59**, No 3 – P. 867-873.
28. Kopecký J., Schoefs B., Loest K. et al. Microalgae as source for secondary carotenoid production: a screening study // Algological. Studies. – 2000. – **98**. – P. 153 – 168.
29. Liaen-Jensen S. Carotenoids – a chemosystematic approach // Pure Appl. Chem. – 1979. – **51**. – P. 661 – 675.
30. Liu B.-H., Lee Y.-K. Composition and biosynthesis pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. // Biotechnol. Lett. – 1999. – **21**. – P. 1007–1010.
31. Ma R., Chen F. Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. // Biotechnol. Lett., – 2001. 23, No 7. – P. 519-523.
32. März U. The global market for carotenoids. – Business report FOD925C. – 2008. – www.bccresearch.com.
33. Orosa M., Valero J.F., Herrero C. et al. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions // J. Biotechnol. Lett. – 2001. – **23**, No 13. – P. 1079 - 1085.
34. Pelah D., Sintov A., Cohen E. The effect of salt stress on the production of cantaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity // Wold J. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – **20**. – P. 483-486.

35. Qin S., Liu G.-X. & Hu Z.-Y. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) // J. Process biochemistry. – 2008. – **43**, No 8. – P. 795 - 802.
36. Rodriguez-Amaya D. B. A guide to carotenoid analysis in foods / Washington: ILSI Press, 2001. – 71 p.
37. Shanab S. M.M. Antioxidant and Antibiotic Activities of Some Seaweeds (Egyptian Isolates) / Int. J. Agri. Biol. – 2007. – **9**, No. 2. – P. 220-225.
38. Yamaguchi K., Nakano h., Murakami M. et al. Lipid composition of green alga *Botryococcus braunii* // Agric. Biol. Chem.– 1987. – 51, No 2. – P. 493-498.
39. Yuan J-P., Chen F., Liu X., Li X-Z. Carotenoid composition in green microalga *Chlorococcum* // Food Chem. – 2002.– **76**, No 3 – P. 319-325.
40. Zang D. H., Lee Y.-K. Two-step process for ketocarotenoid production by a green alga, *Chlorococcum* sp. strain MA-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – P. 537 – 540.

Институт биологии южных морей НАН Украины
г. Севастополь, Украина

Получено 28.05.2010 г.

Г. С. МІНЮК, І. В. ДРОБЕЦЬКА, І. М. ЧУБЧИКОВА,
Н. В. ДАНЦЮК, Е. С. ЧЕЛЕБІЄВА

СКРИНІНГ ЗЕЛЕНИХ МІКРОВОДОРСТЕЙ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ ДЖЕРЕЛ ПРИРОДНИХ КЕТОКАРОТИНОЇДІВ. АКТУАЛЬНІСТЬ, СТРАТЕГІЯ І ТАКТИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Резюме

Дано обґрунтування актуальності, стратегії і тактики досліджень, спрямованих на виявлення нових комерційно перспективних видів зелених мікроводоростей для одержання природних кетокаротиноїдів астаксантина і кантаксантина. Наведено уніфіковану схему скринінгу, заснованого на методі двох-стадійної накопичувальної культури.

Ключові слова: мікроводорості, культивування, вторинний каротиногенез, астаксантин

G. S. MINYUK, I. V. DROBETSKAYA, I. N. CHUBCHIKOVA,
N. V. DANTSYUK, E. S. CHELEBIEVA

SCREENING OF GREEN MICROALGAE AS POTENTIAL SOURCE OF NATURE KETOCAROTENOIDS. THE RELEVANCE, STRATEGY AND STUDY APPROACH

Summary

The relevance, strategy and tactics of new algae species search with potential commercial interest as source of nature ketocarotenoids astaxanthin and canthaxanthin are discussed. Unified screening scheme based on two-stage batch culture is given.

Key words: microalgae, cultivation, secondary carotenogenesis, astaxanthin