

Г.С. МИНЮК, Э.С. ЧЕЛЕБИЕВА, И.Н. ЧУБЧИКОВА

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского,  
пр. Нахимова, 2, Севастополь 99011, Крым**ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА У  
*BRACEACOCCLUS MINOR (CHLOROPHYTA)* В УСЛОВИЯХ  
ДВУХСТАДИЙНОЙ КУЛЬТУРЫ**

Приведены новые данные, характеризующие морфометрические, физиолого-биохимические и продукционные характеристики зелёной почвенной микроводоросли *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrová в условиях двухстадийной накопительной культуры. Показаны специфические особенности адаптивного ответа водоросли на экспериментальную индукцию вторичного каротиногенеза – высокая устойчивость клеток к ацетату натрия, накопление многокомпонентной смеси вторичных кетокаротиноидов с доминированием в их составе фракции диацильных эфиров астаксантина (37–42 % суммы) и высокое содержание липидов в биомассе (53–63 % сухой биомассы).

**Ключевые слова:** вторичный каротиногенез, кетокаротиноиды, астаксантин, *Bracteacoccus minor*, *Chlorophyta*.

**Введение**

В последнее время возникла необходимость в скрининге зелёных микроводорослей для выявления новых коммерчески перспективных продуцентов природных кетокаротиноидов (ККР) астаксантина (АСТ) и кантаксантина (КАН) (Минюк и др., 2010). Актуальность нового направления определяется высокой биологической ценностью ККР (Krinsky, Johnson, 2005; Hussein et al., 2006), широким спектром областей их применения (Carlsson et al., 2007; Dufossé, 2009) и растущим рыночным спросом на природные пигменты (März, 2009). Модельным объектом в исследованиях различных аспектов вторичного каротиногенеза (ВКРГ) и пока единственным среди микроводорослей промышленным источником АСТ является планктонная микроводоросль *Haematococcus pluvialis* Flot. (<http://www.scholar.google.com>). Большинство работ посвящено оптимизации технологии выращивания этого не совсем пригодного для промышленных целей вида. Низкая скорость роста, узкий диапазон физико-химических параметров культивирования и высокий риск контаминации культур требуют применения дорогостоящих закрытых систем культивирования, определяющих неприемлемую для большинства потенциальных потребителей цену на АСТ из *H. pluvialis* ( $\approx$  US\$ 7000), и, как следствие, стагнацию мирового объёма производства его биомассы на уровне 300 т·год<sup>-1</sup> (März, 2009). В то же время, десятки эдафотрофных и аэротрофных видов *Chlorophyceae* с выраженной способностью к ВКРГ (Костіков та ін., 2001), более технологичных, чем планктонные водоросли, в силу большей экологической валентности (Андреева, 1998), долгое время

© Г.С. Минюк, Э.С. Челебиева, И.Н. Чубчикова, 2015

оставались вне поля зрения специалистов. Лишь недавно стали появляться сведения об особенностях роста и составе вторичных каротиноидов (ВКР) у отдельных наземных коккоидных видов, таких, например, как: *Chlorococcum* sp., *Scenedesmus* spp., *Chlorella zofingiensis* Dönn., *Protosiphon botryoides* (Kütz.) Klebs, *Scotiellopsis oocystiformis* (J.W.G. Lund) Puncochárová и др. (Hanagata, Dubinsky, 1999; Liu, Lee, 2000; Ma, Chen, 2001; Orosa et al., 2001; Del Campo et al., 2004; Qin et al., 2008; и др.), подтверждающие целесообразность поисков новых источников ККР среди наземных *Chlorophyceae*.

Данная работа является продолжением исследования особенностей ВКРГ у эдаофильной микроводоросли *Bracteacoccus minor* в условиях двухстадийной накопительной культуры (Чубчикова и др., 2011). Цель работы – определение динамики численности, морфометрических и физиолого-биохимических характеристик на «зелёной» и «красной» стадиях культивирования; оценка целесообразности использования ацетата натрия (NaAc) для увеличения выхода ККР; уточнение фракционного состава ВКР; анализ содержания основных компонентов сухой биомассы.

### Материалы и методы

В исследовании использовали штамм АСКУ 506-06 (= SAG 221-1) *B. minor*, полученный из коллекции Киевского национального университета им. Т. Шевченко. Водоросль выращивали по двухстадийной схеме скрининга продуцентов АСТ (Минюк и др., 2010). Условия культивирования на I («зелёной») стадии продолжительностью 16 сут были следующими: питательная среда ВВМ 3N, освещённость 7000 лк (лампы Fegon DL 20W T4 6400K), фотопериод 15 ч свет : 9 ч темнота, температура среды 25–26 °С, скорость продувки газо-воздушной смесью 0,44 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> (0,7 % CO<sub>2</sub> (v/v)), объём культур в стеклянных литровых колбах 0,6 л, начальная численность клеток (2,3–2,4)·10<sup>6</sup> кл·мл<sup>-1</sup>. Перевод культур на II («красную») стадию продолжительностью 11 сут осуществляли путём 10-кратного разбавления «зелёной» культуры редуцированной по N и P средой ВВМ (4,12 мг·л<sup>-1</sup> N и 5,32 мг·л<sup>-1</sup> P) и изменения режима освещения с одностороннего периодического на двухстороннее круглосуточное (по 7000 лк с каждой из сторон). Скорость продувки увеличивали до 1 л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> во избежание оседания на дно колб красных апланоспор, более тяжелых, чем зелёные 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 вносили NaAc до концентрации 0,05 М. Вариант без добавления NaAc служил контролем. Число повторностей во всех случаях равнялось трём. Динамику роста и состояния культуры контролировали при помощи проточного цитометра Cytomics™ FC 500, снабженного однофазным 488 нм аргоновым лазером (Beckman Coulter, США). Общую численность клеток (*N*) и активность внутриклеточных эстераз как инте-

гральный показатель метаболической активности клеток (МАК) (Franklin, 2001) оценивали на двухпараметрических цитограммах: по прямому светорассеянию в системе координат FS Log – FL4 Log и интенсивности флуоресценции флуоресцеина на канале FL1 в системе координат FL1 Log – FL4 Log после обработки клеток диацетатом флуоресцеина (ФДА) (Franklin et al., 2001; Marie et al., 2005). Линейные размеры клеток устанавливали по микрофотографиям с применением микроскопа Leica DM-1000, цифровой камеры Leica Microsystem AG и компьютерной программы ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Объем клеток ( $V$ ) рассчитывали по формуле шара. Содержание сухой биомассы (СБ) анализировали весовым методом на мембранных фильтрах «Sartorius» (3; 5 и 8 мкм). Пигменты экстрагировали 100 % ацетоном (о.с.ч.) с соблюдением всех предосторожностей, необходимых при работе с пигментами (Britton, 2008). Содержание хлорофилла *a* (хл. *a*) и суммарных каротиноидов ( $\Sigma$ КР) в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом на СФ 46 (ЛОМО, Россия) по уравнениям Лихтенталера (Lichtenthaler, 1987). Фракционный состав КР исследовали при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах «Silica gel 60» Merck (Германия) в двух системах растворителей: I – гексан-ацетон 9 : 1; II – гексан-бензол-ацетон 5 : 3,75 : 0,8 (Дробецкая и др., 2010). Идентификацию каротиноидных фракций проводили по химическим, спектральным и хроматографическим тестам на наличие и количество гидроксид- и кетогрупп; положение максимумов поглощения в УФ-ВИД спектрах в трёх растворителях (гексане, бензоле и ацетоне); совпадение  $R_f$  идентифицируемых фракций и стандартов при совместной ТСХ (Rodriguez-Amaya, 2001; Britton et al., 2004; Britton, 2008; Egeland et al., 2011). Стандарты ККР получали путём экстракции пигментов из свежего материала и выделения отдельных компонентов методом адсорбционной ТСХ (Britton, 2008). Моно- и диэфиры АСТ выделяли из красных апланоспор *Haematococcus pluvialis*, свободный АСТ – из мышц *Salmon salar*, КАН – из цист *Artemia salina*.

Для расчёта концентрации отдельных фракций использовали индивидуальные коэффициенты удельного поглощения, приведенные в литературе (Britton et al., 2004; Дробецкая и др., 2010, Egeland et al., 2011). Содержание белка в биомассе анализировали по Лоури (Lowry et al., 1951), углеводов – при помощи фенольного и сернокислотного реагентов (Strickland, Parsons, 1968), липидов – фосфованилиновым методом (Ahlgren, Merino, 1991). Концентрацию нитратов в среде контролировали с помощью нитрат-селективного электрода 9307BNWP (Thermo Orion) ([www.aurumlab.com.ua](http://www.aurumlab.com.ua)). Все аналитические измерения для каждой биологической повторности проводили трижды. Данные, приведенные на рисунках и в тексте, являются средними ( $\bar{x}$ ). Их вариабельность характеризуется выборочным стандартным отклонением ( $s$ ) или ошибкой средней арифметической ( $m$ ).

## Результаты и обсуждение

Одним из важных факторов, определяющих конечный результат выращивания продуцентов ККР методом двухстадийной накопительной культуры, является выживаемость клеток в результате стресс-воздействия, индуцирующего биосинтез ККР. В зависимости от его интенсивности и времени применения (фазы роста культуры) потери биомассы, полученной в конце «зелёной» стадии, могут достигать 40–50 %. Такой высокий процент гибели характерен, например, для *H. pluvialis* при совместном использовании NaAc и NaCl для активации биосинтеза АСТ (Минюк и др., 2007). В то же время, у ряда исследованных нами почвенных микроводорослей (*Scotiellopsis rubescens* Vinatz., *Chlorococcum granatum* Beij., *Pseudosporogococcum protococcoides* Gromov, *Chlorella zofingiensis*, *Scenedesmus rubescens* (P.J.L. Dang.) E. Kessler) при сходном способе индукции ВКРГ численность клеток на II стадии не снижалась (Чубчикова и др., 2009), а у *Ettlia carotinos* Komárek, наоборот, даже существенно увеличивалась (Челебиева и др., 2013). Из ряда устойчивых к модельному стрессу видов выпали два представителя рода *Bracteacoccus* Tereg (*B. minor* и *B. giganteus* Bisch. et Bold.), у которых при попытке сокращения «зелёной» стадии до 6 сут гибель клеток составила 32–33 % (Чубчикова и др., 2011). Это обстоятельство послужило поводом для пролонгирования I стадии до 16 сут и проведения более детальных наблюдений за динамикой роста и морфофизиологическими показателями вегетативных клеток *B. minor*.

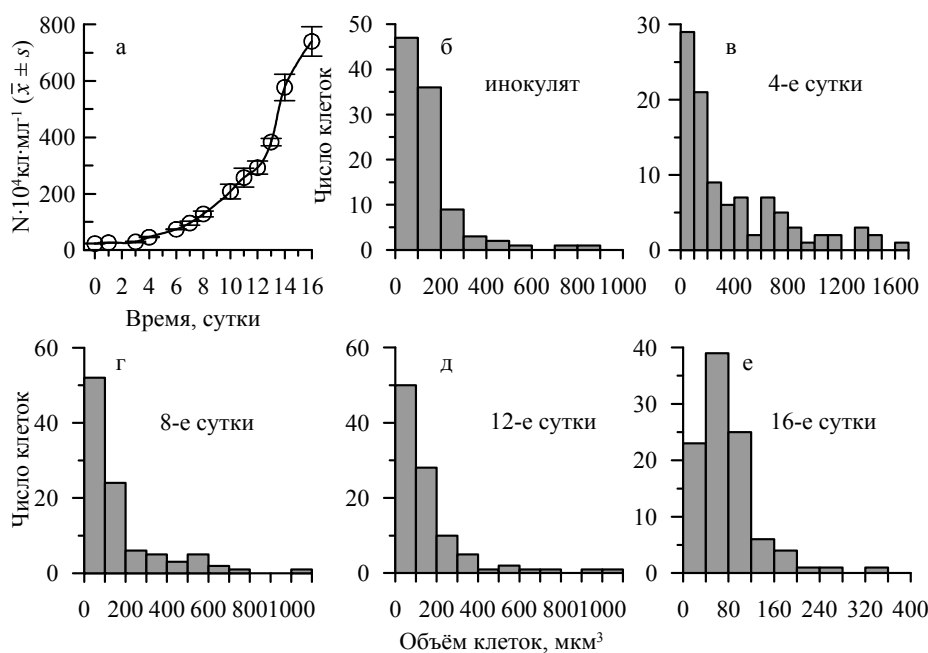


Рис. 1. Динамика численности (а) и объёма (б-е) клеток *Bracteacoccus minor* на I («зелёной») стадии культивирования

Несмотря на длительный дефицит питания (уже на 8-е сут концентрация  $N(NO_3)^-$  в среде была ниже предела чувствительности ионоселективного электрода), численность клеток в культуре продолжала увеличиваться до конца «зелёной» стадии (рис. 1, а).

При этом размножение зооспорами, преобладающее в начальный период, постепенно уступало место делению с образованием апланоспор/автоспор, что, в свою очередь, приводило к заметному изменению размерной структуры популяции. Так, на 4-е сут в культуре 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 (см. рис. 1, в; 2, а, б).

Относительное содержание апланоспорангиев ( $V = 200-400 \text{ мкм}^3$ ), дававших по 2-4, реже 6 апланоспор, составляло в это время 15 % общего числа клеток. Углубление дефицита питания сопровождалось неуклонным снижением числа крупных зооспорангиев (см. рис. 1, з, д) вплоть до их полного исчезновения на 16-е сут (см. рис. 1, е; 2, б). При этом размеры апланоспорангиев уменьшались в 2-3 раза и на 16-е сут основу культуры (62 %) составляли мелкие ( $V < 80 \text{ мкм}^3$ ), частично агрегированные клетки (рис. 3, з). На этом фоне содержание СВ, хл. а и  $\Sigma\text{КР}$  в культуре увеличивалось до конца I стадии (см. рис. 1, а; 3, а, д, и). Средняя продуктивность по СВ составила  $143,05 \pm 7,63 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ; по хл. а —  $2,46 \pm 0,08 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ; по  $\Sigma\text{КР}$  —  $0,91 \pm 0,03 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ .

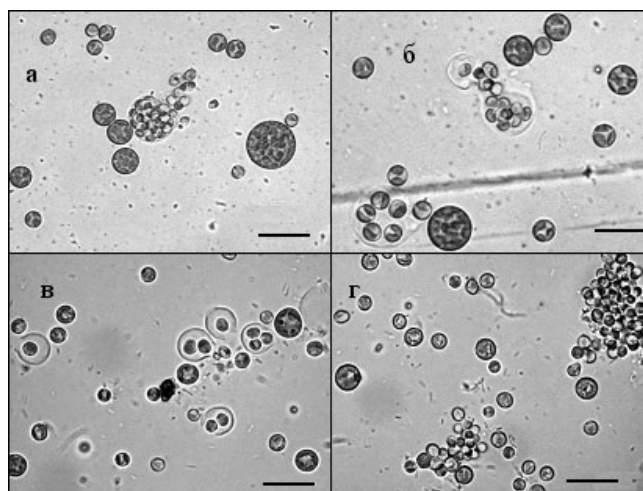


Рис. 2. Культура *Bracteacoccus minor* на 4-е (а, б) и 16-е (в, г) сут «зелёной» стадии (увеличение  $10 \times 40$ ). Масштаб 10 мкм

Положительная динамика численности клеток маскировала противоположно направленные изменения их физиологического состояния, проявлявшиеся в устойчивом снижении внутриклеточного содержания СБ и фотосинтетических пигментов (рис. 3).

Уже через сутки после полного поглощения азота из питательной среды содержание СБ клетках снизилось  $\approx$  на 20 % по отношению к периоду адекватной обеспеченности питанием (4-е сут), а к концу «зелёной» стадии уменьшилось на 70 % (в 3,2 раза) (см. рис. 3, б). Отмеченная тенденция, по всей вероятности, была обусловлена как прогрессирующим измельчением культуры, так и активизацией использования внутриклеточных резервов на размножение в условиях голодания, на что косвенно указывает снижение (в 1,7 раза) содержания СБ в расчёте на единицу объёма клеток ( $\text{мкм}^3$ ) (см. рис. 3, в).

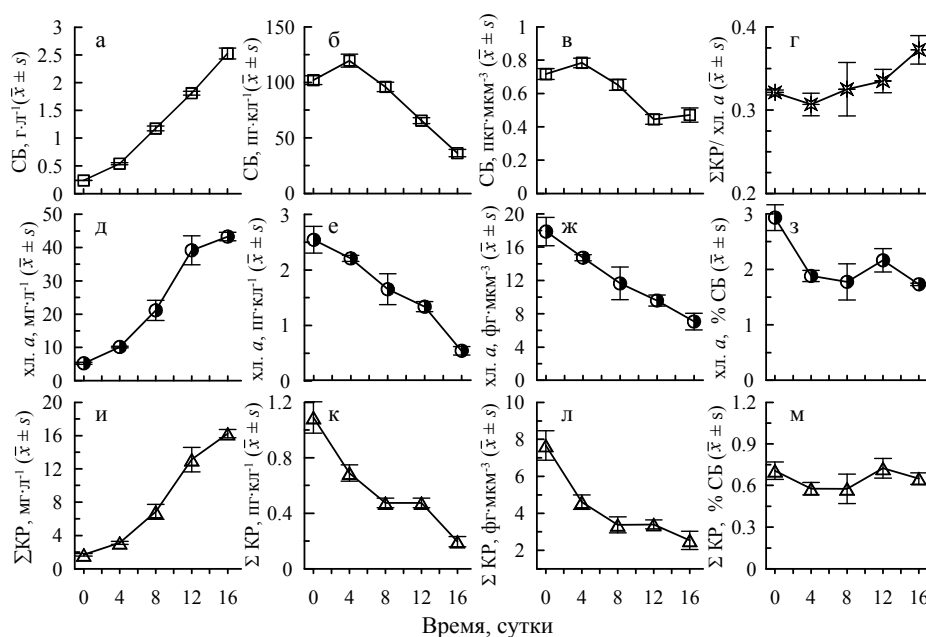


Рис. 3. Динамика содержания сухой биомассы (а – в), хлорофилла а (д – з), суммарных каротиноидов (и – м) и коэффициента  $\Sigma\text{КР}/\text{хл. а}$  на «зелёной» стадии культивирования

Четко выраженные отрицательные тренды содержания хл. а (рис. 3, е, ж) и  $\Sigma\text{КР}$  (рис. 3, к, л) в клетках *Bracteacoccus minor* на «зелёной» стадии культивирования в наших исследованиях продуцентов АСТ отмечены впервые и рассматриваются на данном этапе как дискуссионная видоспецифическая характеристика, нуждающаяся в дополнительной экспериментальной проверке и аргументации. Литературные сведения, подтверждающие или опровергающие вероятность такой динамики при лабораторном культивировании почвенных видов *Chlorophyceae*, найти не удалось, за исключением работы испанских исследователей, показавших

аналогичное снижение содержания  $\Sigma$ КР в клетках *Chlorella zofingiensis* ( $\approx$  в 2 раза) на фоне их массивного накопления в растущей культуре (Del Campo et al., 2004). 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  $\Sigma$ 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. У *Ch. zofingiensis* перманентное снижение уровня  $\Sigma$ КР в клетках сопровождалось одновременным накоплением АСТ.

У *B. minor* массовая доля хл. *a* и  $\Sigma$ КР в СБ на протяжении «зелёной» стадии практически не менялась (см. рис. 3, з, м), что было следствием однонаправленности векторов всех трёх показателей.

Индукцию ВКРГ в ослабленных голоданием клетках *B. minor* (переход на «красную» стадию) проводили путём резкого изменения комплекса физико-химических параметров культивирования (Минюк и др., 2010). Роль ключевого стресс-фактора играл более чем 20-кратный положительный градиент облучённости клеток, достигнутый при одновременном 10-кратном разбавлении плотной «зелёной» культуры, увеличения интенсивности (в 2 раза) и продолжительности (в 2,6 раза) внешнего освещения. Для разведения вместо воды использовали 10-кратно редуцированную по N и P среду ВВМ для подкормки истощённой культуры биогенами и микроэлементами, необходимыми для синтеза *de novo* ферментов, контролирующих разветвленный метаболический путь образования АСТ из  $\beta$ -каротина (Liu, Lee, 2000; Lemoine, Schoefs, 2010).

Особенно интересно было определить отношение *B. minor* к NaAc как популярному и в то же время неоднозначному химическому активатору ВКРГ у *Chlorophyceae* (Kobayashi et al., 1993; Данцюк, 2010). Ранее нами было показано, что ацетат (0,05 М) в сочетании с NaCl (0,17 М) вызывает массовое отмирание молодых клеток *B. minor* (Чубчикова и др., 2011). Исключение NaCl из стресс-комплекса и перенесение сроков индукции ВКРГ на более позднюю стадию развития культуры в данном эксперименте частично ослабило стресс-воздействие, но полностью не устранило нежелательный побочный эффект ацетата, проявившийся уже на 3-и сут в склеивании клеток в плотные хлопьевидные скопления. Диспергировать клеточные агрегаты в пробах, отобранных для анализа, не удавалось даже при помощи продувки аквариумным воздушным компрессором (Sera 550R с производительностью 9 л·мин<sup>-1</sup>), что, к сожалению, не позволило осуществить цитофлуорометрический анализ численности и состояния клеток в присутствии NaAc. Поэтому на рисунках, характеризующих постстрессорные изменения физиолого-биохимических показателей в расчёте на клетку и мкм<sup>3</sup>, данные представлены фрагментарно. В контроле ни агрегирования, ни массовой гибели клеток на «красной» стадии не наблюдалось. Постепенно краснеющие клетки продолжали делиться, и к окончанию периода наблюдений их численность выросла в 2 раза (рис. 4, а).

Доля метаболически активных клеток (МАК) (флуоресцирующих на канале FL1 после обработки ФДА) была стабильно высокой (> 97 % обще-

го числа) (рис. 4, а). В то же время относительная интенсивность флуоресценции на канале FL1, характеризующая активность внутриклеточных эстераз (Franklin et al., 2001), снизилась в 2,4 раза (рис. 4, з).

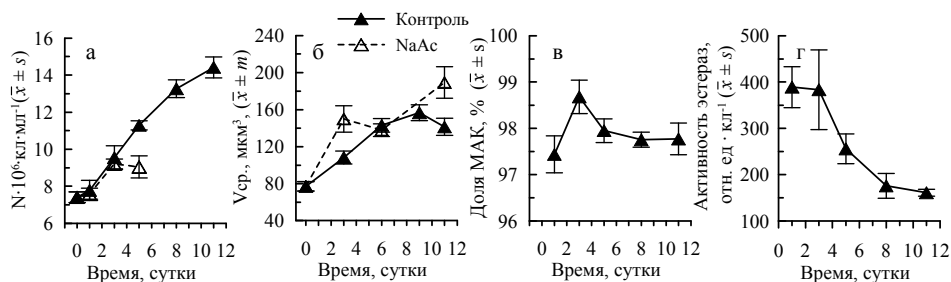


Рис. 4. Динамика численности (а), средних объёмов клеток (б), относительного содержания метаболически активных клеток в культурах (в) и активности внутриклеточных эстераз (з) на «красной» стадии культивирования

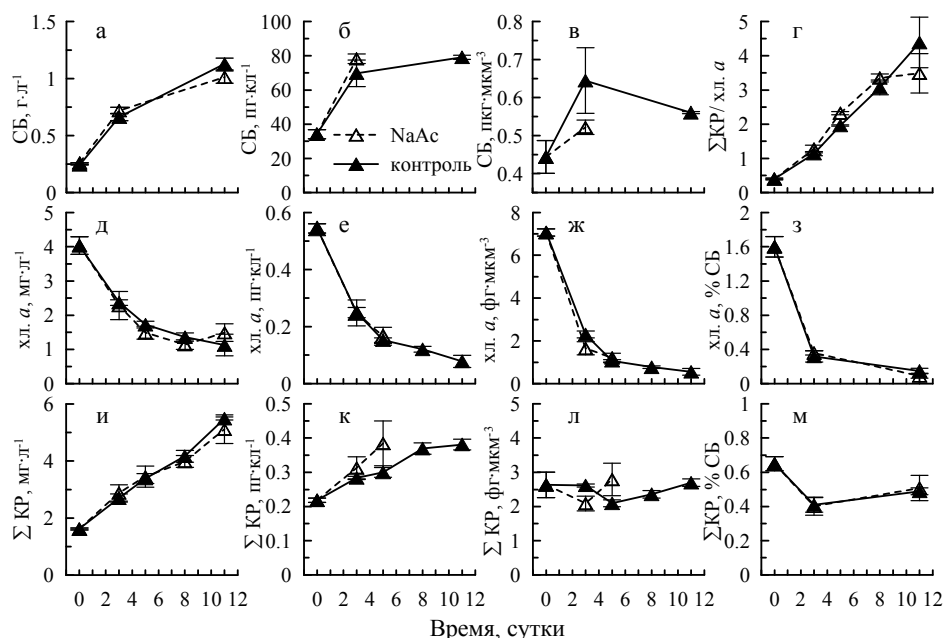


Рис. 5. Динамика содержания сухой биомассы (а–в), хлорофилла а (д–з), суммарных каротиноидов (и–м) и коэффициента  $\Sigma \text{КР} / \text{хл. } a$  (е) на «красной» стадии культивирования

К характерным последствиям экспериментально индуцированного ВКРГ у почвенных *Chlorophyceae* следует отнести увеличение объёма клеток *B. minor* (в 1,8 раза в контроле и в 2,5 раза в варианте с NaAc) (рис. 4, б), а также противоположную направленность динамики содержания хл. а и  $\Sigma \text{КР}$  в культурах и клетках водоросли (рис. 5). За 11 сут содержание хл. а в расчёте на литр культуры в обоих вариантах снизи-



лось приблизительно в 3,5 раза (рис. 5, д), на клетку в 6,9 раза (рис. 5, е), на  $\text{мкм}^3$  – в 12,9 раза (рис. 5, ж).

Массовая доля хл. *a* в сухой биомассе по окончании эксперимента составила 0,15 % СБ против 1,6 % в конце «зелёной» стадии (рис. 5, з). За это же время содержание  $\Sigma\text{КР}$  в 1 л культуры в обоих вариантах эксперимента увеличилось в 3,2–3,4 раза (рис. 5, и), отношение  $\Sigma\text{КР}/\text{хл. } a$  увеличилось в контроле в 11 раз, а в варианте с NaAc – почти в 9 раз (рис. 5, з). В данном случае стремительный рост коэффициента  $\Sigma\text{КР}/\text{хл. } a$ , часто используемого для характеристики ВКРГ у *Haematococcus pluvialis* (Boussiba, 2000), отражал не столько интенсивность накопления  $\Sigma\text{КР}$  в клетках *B. minor*, сколько глубину деградации хл. *a* в результате стресс-воздействия, индуцирующего ВКРГ. В контроле содержание  $\Sigma\text{КР}$  в расчёте на  $\text{мкм}^3$  на протяжении «красной» стадии практически не менялось (рис. 5, л) и накопление ВКР в отдельных клетках (рис. 5, к) и в целом в культуре определялось увеличением размеров и числа апланоспор. В варианте с NaAc проследить аналогичную динамику  $\Sigma\text{КР}$  не удалось из-за образования клеточных агрегатов. Можно лишь отметить, что и в скоплениях клетки водоросли активно накапливали  $\Sigma\text{КР}$ . Причем, судя по их содержанию в 1 л культуры (см. рис. 5, и) и массовой доле в СБ (рис. 5, м), NaAc не оказывал на этот процесс положительного влияния, характерного для некоторых других видов (*H. pluvialis*, *Scotiellopsis rubescens*, *Ettlia carotinoso*) (Данцюк, 2010; Чубчикова и др., 2010; Челебиева и др., 2013). Выход  $\Sigma\text{КР}$  из 1 л исходной культуры с плотностью  $(2,3\text{--}2,4)\cdot 10^6$  кл. $\cdot\text{мл}^{-1}$  в обоих вариантах эксперимента достоверно не различался и с учётом 10-кратного разбавления культуры при переходе на II стадию составил  $1,43\pm 0,01$  мг $\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$  в контроле и  $1,30\pm 0,22$  мг $\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$  в варианте с NaAc. В конце «красной» стадии культура в обоих вариантах имела темно-апельсиновый цвет, обусловленный деградацией фотосинтетических пигментов и накоплением  $\text{C}_{40}$ -ККР (91–93%  $\Sigma\text{КР}$ ) (см. таблицу, рис. 6).

В качестве особенностей состава ВКР у *B. minor* следует отметить сравнительно низкое относительное содержание всех форм АСТ (46–48 %  $\Sigma\text{КР}$ ), запасание АСТ преимущественно в виде диэфиров и более выразительный в количественном отношении спектр интермедиатов синтеза АСТ. Все они, за исключением свободных АСТ и АДК, присутствовали в количестве, достаточном для корректного определения методом ТСХ, причем доля моноэфиров АДК была необычно высокой – 16–18 %  $\Sigma\text{КР}$ . Достоверного влияния NaAc на фракционный состав ВКР *B. minor* не выявлено. Вместе с тем, у всех исследованных нами ранее продуцентов ККР (включая близкородственный *B. giganteus*), доминирующей формой АСТ были моноацильные эфиры, из двух прямых предшественников (АДК и АДР) количественно определялся, как правило, только один, а второй, как и ЭХ, отмечен только в виде следов.

**Фракционный состав каротиноидов *Bracteacoccus minor* в конце «красной»  
стадии культивирования**

Фракция	Содержание каротиноидов, % суммы	
	Контроль	Ацетат натрия
β-каротин	3,98 ± 0,64	3,57 ± 0,58
Диэфиры астаксантина	42,34 ± 2,81	38,74 ± 3,85
Эхиненон (ЭХ)	9,19 ± 1,06	5,38 ± 0,83
Эфиры адонирубина (АДР)	5,28 ± 1,53	6,70 ± 0,36
Кантаксантин	13,15 ± 0,66	11,51 ± 0,98
Моноэфиры астаксантина	5,17 ± 1,38	9,16 ± 1,20
Моноэфиры адониксантина (АДК)	15,81 ± 1,17	17,51 ± 0,90
Свободный астаксантин и адониксантин	Следы	Следы

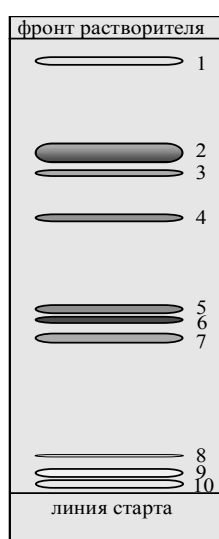


Рис. 6. Схема хроматограммы каротиноидов *Bracteacoccus minor* в конце «красной» стадии: 1 – β-каротин; 2 – диэфиры АСТ; 3 – ЭХ; 4 – эфиры АДР; 5 – кантаксантин; 6 – моноэфиры АСТ; 7 – моноэфиры АДК; 8 – свободные АСТ и АДК; 9 – первичные ксантофиллы; 10 – хлорофиллы

При этом NaAc стимулировал как накопление  $\Sigma$ КР, так и относительное содержание эфиров АСТ (Минюк и др., 2007; Чубчикова и др., 2010; Челебиева и др., 2013).

Увеличение содержания СБ в клетках *B. minor* (см. рис. 5, б, в) сопровождалось существенным изменением содержания его основных компонентов (рис. 7). В расчёте на  $\text{мкм}^3$  содержание белка снизилось в 1,4 раза (рис. 7, ж), а содержание липидов (рис. 7, в) и углеводов (рис. 7, л) увеличилось в 1,8 и 10,5 раза соответственно.

Аналогичную трансформацию состава СБ мы отмечали и у других видов *Chlorophyceae*. Однако некоторые данные, приведенные на рис. 7, нуждаются в дополнительных комментариях. Так, 20 %-ное увеличение к концу «красной» стадии содержания белка в расчёте на клетку (рис. 7, е), представляющееся артефактом в условиях острого дефицита азота, объяс-

няется 2-кратным увеличением размеров клеток (рис. 4, б). А 10-кратный прирост уровня углеводов (рис. 7, к, л), по всей вероятности, связан с утолщением клеточной стенки и образованием вокруг клеток слизистых обёрток (Андреева, 1998). На правомерность такого предположения указывают результаты ультраструктурного исследования клеток *Haemato-coccus pluvialis*, показавшие сокращение числа крахмальных зёрен в красных апланоспорах по сравнению с зелёными пальмеллами (Wayama et al., 2013). Хотя, по нашим данным, содержание суммарных углеводов в созревающих апланоспорах увеличивается у этого вида в 10–12 раз (Минюк и др., 2007). Эти сопоставления свидетельствуют о необходимости включения в дальнейшем в комплекс анализируемых показателей такой характеристики, как фракционный состав углеводов.

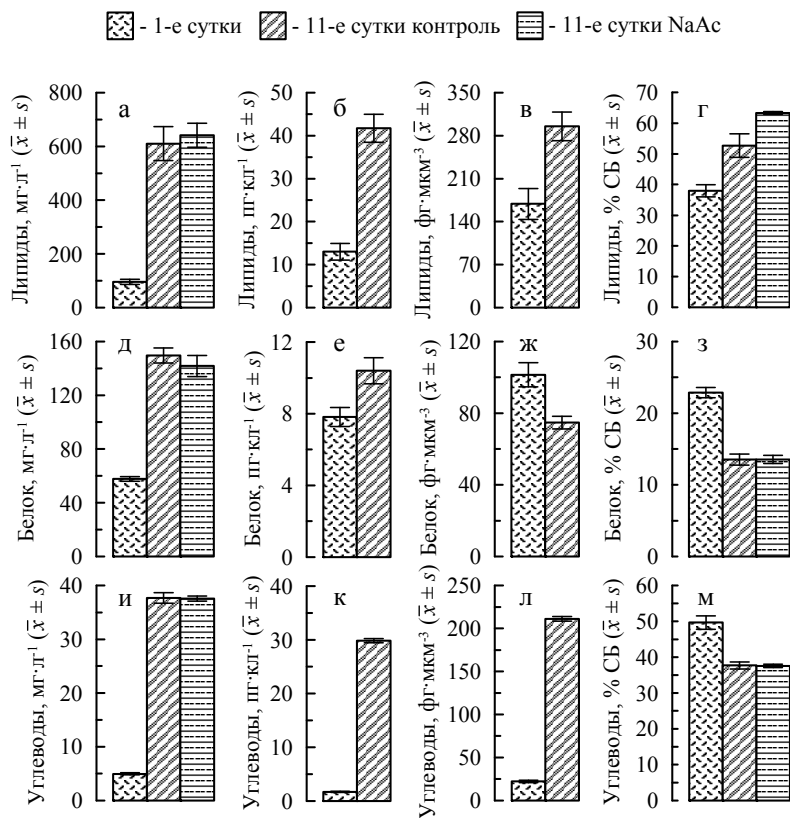


Рис. 7. Содержание липидов, белка и углеводов ( $\bar{x} \pm s$ ) в культуре, клетках и сухой биомассе в начале и в конце «красной» стадии культивирования

Среди отмеченных изменений в составе СБ на «красной» стадии наибольший интерес представляет значительное увеличение содержания липидов (с 38 до 52 % СБ в контроле и до 63 % СБ в варианте с NaAc) (рис. 7, з), что указывает на возможность комплексного культивирования *V. minor* как источника ККР и технических масел.

## Заключение

Изменения в составе и содержании пигментов, а также основных компонентов сухой биомассы, наблюдаемые в клетках *Bracteacoccus minor* в условиях модельного абиотического стресса, согласуются с современными представлениями о вторичном каротиногенезе как составной части комплексного физиологического ответа экстремобионтных видов *Chlorophyceae* на абиотический стресс, заключающегося в сохранении жизнеспособности клеток путём снижения их метаболической активности и перехода в покоящееся состояние. К специфическим особенностям стресс-реакции вида на комплексное стресс-воздействие следует отнести отсутствие выраженной реакции (как положительной, так и отрицательной) на внесение в среду ацетата натрия, более высокое, чем у других видов содержание интермедиатов биосинтеза астаксантина (около 50 %  $\Sigma$ КР), преимущественное запасание последнего в форме диацильных эфиров (39–42 %  $\Sigma$ КР) и высокое содержание липидов в биомассе (53–63 % СВ). Коммерчески значимые величины выхода кетокаротиноидов (1,3–1,4 мг·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>) и липидов (187–202 мг·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>) из 1 л исходной культуры позволяют сделать заключение о перспективности продолжения исследований данного вида с целью разработки технологии его культивирования для получения природных красителей и технических масел.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли. С.Пб.: Наука, 1998. – 351 с.
- Данцюк Н.В. Влияние ацетата натрия на интенсивность вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* // Экол. моря. – 2010. – Вып. 80. – С. 44–50.
- Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Боровков А.Б., Минюк Г.С. Определение содержания астаксантина и кантаксантина у зелёных микроводорослей методом тонкослойной хроматографии // Там же. – 2010. – Вып. 79. – С. 50–56.
- Костіков І.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М. та ін. Водорості ґрунтів України. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.
- Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований // Экол. моря. – 2010. – Вып. 80. – С. 67–78.
- Минюк Г.С., Терентьева Н.В., Дробецкая И.В. Сравнительная характеристика морфологических и физиолого-биохимических признаков трёх штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow (*Chlorophyta*, *Chlamydomonadales*) // Альгология. – 2007. – 17(2). – С. 148–159.
- Челебиева Э.С., Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н. Динамика химического состава *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (*Chlorophyceae*) при экспериментальной индукции вторичного каротиногенеза // Мор. экол. журн. – 2013. – 12(2). – С. 78–87.

- Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Минюк Г.С., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Bracteacoccus* (*Chlorophyceae*) // Мор. экол. журн.. – 2011. – **10**(1). – С. 91–97.
- Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В. Данцюк Н.В. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов // Экол. моря – 2009. – Вып. 77. – С. 77–83.
- Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В. Вторичный каротиногенез у зелёной микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. в условиях природной освещённости и температуры. – Там же. – 2010. – Вып. 81. – С. 77–81.
- Ahlgren G., Merino L. Lipid analysis of freshwater microalgae: A method study // Arch. Hydrobiol. – 1991. – **121**(3). – P. 295–306.
- Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response // Physiol. Plant. – 2000. – **108**. – P. 111–117.
- Britton G. TLC of carotenoids // Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Chap. 21. – New York: CRC Press, 2008. – P. 543–573.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids Handbook. – Basel: Birkhäuser Verlag, 2004. – 647 p.
- 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.
- Del Campo A., Rodrigues H., Moreno J., Vargas M.Á., Rivas J., Guerrero M.G. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (*Chlorophyta*) // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – **64**(6). – P. 848–854.
- Dufossé L. Microbial and Microalgal Carotenoids as Colourants and Supplements // Carotenoids. – Vol. 5: Nutrition and Health. – Basel: Birkhauser Verlag, 2009. – P. 67–82.
- Egeland E.S., Garrido J.L., Clementson L. et al. Data sheets aiding identification of phytoplankton carotenoids and chlorophylls // Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2011. – P. 718–823.
- Franklin N.M., Adams M.S., Stauber J.L., Lim R.P. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry // Arch. Environ. Contam. Toxicol. – 2001. – **40**. – P. 469–480.
- Hanagata N., Dubinsky Z. Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) // J. Phycol. – 1999. – **35**. – P. 960–966.
- Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential human health and nutrition // J. Nat. Prod. – 2006. – **69**(3). – P. 443–449.
- 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**(3). – P. 867–873.
- Krinsky N.I., Johnson E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease // Mol. Aspects Med. – 2005. – **26**. – P. 459–516.
- Lemoine Y., Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress // Photosynt. Res. – 2010. – **106**. – P. 155–177.

- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes // Methods Enzym. – 1987. – **148**. – P. 350–382.
- Liu B.H., Lee Y.K. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. // J Appl. Phycol. – 2000. – **12**. – P. 301–307.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. Protein measurement with folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265–275.
- Ma R., Chen F. Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum* sp. // Biotechnol. Lett. – 2001. – **23**(7). – P. 519–523.
- Marie D., Simon N., Vaultot D. Phytoplankton cell counting by flow cytometry // Algal Culturing Techniques. – Amsterdam: Elsevier Acad. Press, 2005. – P. 253 – 267.
- März U. The global market for carotenoids. – Business report FOD925C. – 2009. – www.bccresearch.com
- 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**(13). – P. 1079–1085.
- Qin S., Liu G.-X., Hu Z.-Y. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (*Chlorophyceae*) // J. Proc. Biochem. – 2008. – **43**(8). – P. 795–802.
- Rodriguez-Amaya D.B. A guide to carotenoid analysis in foods. – Washington: ILSI Press, 2001. – 71 p.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. Determination of carbohydrate // A practical handbook of seawater analysis. – Ottawa: Fish. Res. Board Can., 1968. – P. 173–174.
- Wayama M., Ota S., Matsuura H., Nango N., Hirata A., Kawano S. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis* // PLoS ONE. – 2013. – **8**(1): e53618. doi:10.1371/journal.pone.0053618.

Поступила 25 августа 2013 г.

Подписала в печать Е.И. Шнюкова

ISSN 0868-8540. Algologia. 2015, 25(1): 21–34 <http://dx.doi.org/10.15407/alg25.01.021>

G.S. Minyuk, E.S. Chelebieva, I.N. Chubchikova

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, NAS of Ukraine,  
2, Nakhimov Pr., Sevastopol 99011, Crimea

SECONDARY CAROTENOGENESIS OF THE GREEN MICROALGA  
*BRACTEACOCCLUS MINOR* (*CHLOROPHYTA*) IN A TWO-STAGE CULTURE

Morphometric and physiologic-biochemical characteristics as well as the productivity of the green terrestrial microalga *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrová were investigated in a two-stage batch culture. The specific adaptive responses, which the microalga developed under the experimentally induced secondary carotenogenesis were: high cellular resistance to sodium acetate, the accumulation of a multicomponent mixture of secondary ketocarotenoids with the dominance of astaxanthin diesters (37–42% of the total carotenoids) and a large lipid content in algal biomass (53–63% of dry matter).

**Key words:** secondary carotenogenesis, ketocarotenoids, astaxanthin, *Bracteacoccus minor*.