

УДК 582.232:[581.143+577.122.5]

А. Б. Боровков, И. Н. Гудвилович

**ИНТЕНСИВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *DUNALIELLA SALINA* КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ  $\beta$ -КАРОТИНА.  
2. ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Проведены экспериментальные исследования по оптимизации двустадийной системы культивирования зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* для получения биомассы, обогащенной  $\beta$ -каротином. Для повышения содержания  $\beta$ -каротина в клетках рекомендуется увеличить освещенность в 10 раз при дефиците биогенных элементов в среде на второй стадии культивирования водоросли.

**Ключевые слова:** *Dunaliella salina*, интенсивное культивирование, световые условия,  $\beta$ -каротин, продуктивность.

Получение биомассы микроводорослей как источника целого ряда полезных веществ занимает одно из центральных мест в современной биотехнологии [4, 7, 22]. Культивирование дуналиеллы характеризуется рядом уникальных аспектов, — от биологических особенностей вида до элементов технологии выращивания [5, 13, 14, 16].

Исследования *Dunaliella salina* продолжают с начала XX в., а ее промышленное культивирование налажено со второй половины XX в. Но существующие производства отличаются низкой эффективностью, так как культивирование водорослей организовано экстенсивно (использование обширных производственных площадей при низкой концентрации клеток *D. salina*). Так, полученная продуктивность составляет  $2 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$  по биомассе или приблизительно  $200 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$   $\beta$ -каротина [15, 19]. При этом разработаны и уже внедрены в производство технологии интенсивного культивирования *Arthrospira platensis* и *Chlorella vulgaris*. В частности, в отделе биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ разработаны и внедрены на предприятиях Украины и РФ технологии получения биомассы *Arthrospira platensis* с продуктивностью свыше  $8 \text{ г} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$  [7].

Повышение продуктивности при выращивании *D. salina* позволит в значительной степени повысить рентабельность производств и вывести на рынок для пищевой, косметической и фармацевтической промышленности альтернативу химически синтезированному  $\beta$ -каротину в виде натурального водорослевого  $\beta$ -каротина.

© А. Б. Боровков, И. Н. Гудвилович, 2015

Все вышесказанное предопределило цель исследования — оптимизировать режим культивирования *D. salina* для получения биомассы с повышенным содержанием  $\beta$ -каротина.

**Материал и методика исследований.** Объект исследования — зеленая эвригалобная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (штамм IBSS-1) из коллекции культур ИнБЮМ.

Установка для культивирования микроводорослей состояла из шести стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа объемом 6 дм<sup>3</sup> с рабочей толщиной 5 см, осветителя — лампы ДРЛ-700, термостабилизирующей и газораспределительной систем. Объем суспензии в каждом культиваторе поддерживали на уровне 5 дм<sup>3</sup>.

Эксперимент проводили в два этапа: первоначально культуру *D. salina* выращивали в накопительном режиме на модифицированной питательной среде Ven-Amotz [20], при приготовлении которой использовали морскую соль до концентрации в растворе 120 г/дм<sup>3</sup> [1]. Первый этап длился до стационарной фазы роста и исчерпания в среде элементов минерального питания. На этом этапе освещенность рабочей поверхности культиваторов составляла 80 Вт/м<sup>2</sup>, температура — 26—28°C, pH культуральной среды — 6—7 единиц. В процессе выращивания культура непрерывно снабжалась газо-воздушной смесью с концентрацией углекислоты 3% по объему.

Далее полученную биомассу смешивали и разбавляли в 10 раз (до плотности 0,57 г/дм<sup>3</sup>) дистиллированной водой с добавлением морской соли до концентрации 120 г/дм<sup>3</sup>. Полученную суспензию клеток распределили по экспериментальным культиваторам. В варианте эксперимента № 3 культуру дополнительно разбавляли в 2 раза, а в культиваторы № 1 и 2 дополнительно вносили 120 г/дм<sup>3</sup> морской соли.

Разбавление культуры проводили для повышения средней пространственной освещенности клеток примерно в 10 раз по сравнению с первой стадией, так как дальнейшее повышение поверхностной освещенности свыше 200 Вт/м<sup>2</sup> было сопряжено с техническими трудностями. В варианте опыта № 3 начальная плотность культуры была в 2 раза меньше, чем в остальных вариантах, что, с учетом заданной поверхностной освещенности, приблизительно уравнило культуру по световым условиям в этом варианте и вариантах № 1 и 4 с максимальной поверхностной освещенностью (табл. 1).

На этой стадии эксперимента изменяли освещенность рабочей поверхности культиваторов, которая составляла 200 и 80 Вт/м<sup>2</sup>, температуру — 35 и 28°C, концентрацию морской соли — 240 и 120 г/дм<sup>3</sup>. Кроме того, в культиваторы дополнительно вносили элементы минерального питания, что, по литературным данным способствует адаптации культуры к стрессовым условиям среды и снижает долю отмерших клеток [9]. При проведении эксперимента во все культиваторы вносили 0,014 г N/дм<sup>3</sup>, 0,001 г P/дм<sup>3</sup> и микроэлементы в виде солей из прописи среды Ven-Amotz, а в вариант № 3 добавили двойное количество биогенных элементов и микроэлементов по сравнению с другими культиваторами (0,028 г N/дм<sup>3</sup>, 0,002 г P дм<sup>3</sup>) (см. табл. 1).

**1. Условия проведения второй стадии культивирования *Dunaliella salina* на среде Ven-Amotz**

Параметры	Варианты эксперимента					
	1	2	3	4	5	6 контроль
Начальная плотность культуры, г/дм <sup>3</sup>	0,57 ± 0,10	0,57 ± 0,10	0,29 ± 0,09	0,57 ± 0,10	0,57 ± 0,10	0,57 ± 0,10
Концентрация морской соли, г/дм <sup>3</sup>	240	240	120	120	120	120
Поверхностная освещенность, Вт/м <sup>2</sup>	200	80	80	200	80	80
Температура, °С	28	28	28	28	35	28
Дополнительные элементы минерального питания	N, P, МЭ	N, P, МЭ	2×N, 2×P, 2×МЭ	N, P, МЭ	N, P, МЭ	N, P, МЭ

Примечание. МЭ — микроэлементы.

Плотность культуры, а также содержание сухого вещества (СВ) определяли объемно-весовым [10], а также фотометрическим методами [1, 6]. Определяемые показатели химического состава выражали в пересчете на органическое вещество (ОВ). Массовую долю зольного остатка в сырой биомассе микроводорослей определяли путем предварительного высушивания навесок при 105°С в течение 24 ч и последующего сжигания в муфельной печи при  $t = 500^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса [6]. Содержание суммарных каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом [6]. Поскольку содержание  $\beta$ -каротина в клетках дуналиеллы составляет более 90% [5, 17], то, пользуясь методикой измерения суммарных каротиноидов, с нашей точки зрения возможно считать, что измеряли содержание  $\beta$ -каротина. Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном. Спектры экстрактов пигментов промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400—800 нм с шагом 0,1 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным [21], по значениям оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов.

Рассчитывали средние арифметические ( $\bar{x}$ ), стандартные отклонения ( $S$ ), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ( $\Delta\bar{x}$ ). Все расчеты проводили для уровня значимости  $\alpha = 0,05$ . В таблицах и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ( $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$ ).

**Результаты исследований**

Культивирование в эксперименте (варианты 1, 2, 4, 5, 6) было организовано от первоначальной плотности культуры 0,57 г ОВ/дм<sup>3</sup>. На 4-е сутки эксперимента зафиксирован рост плотности культуры для варианта опыта № 1 на 40% и снижение ее для варианта № 5 — в 2,3 раза. Для вариантов № 2, 4 и 6 плотность культуры значимо не изменилась. Для варианта № 3, с максима-

## 2. Относительное содержание каротиноидов в эксперименте по индукции каротиногенеза в культуре *Dunaliella salina*

Варианты опыта	Плотность культуры, г ОВ/дм <sup>3</sup>			Содержание каротиноидов, % ОВ		
	начало	4-е сутки	10-е сутки	начало	4-е сутки	10-е сутки
1	0,57 ± 0,10	0,81 ± 0,09	0,65 ± 0,10	3,9 ± 0,4	7,6 ± 0,5	7,8 ± 0,8
2	0,57 ± 0,10	0,49 ± 0,10	0,49 ± 0,08	— « —	4,7 ± 0,4	6,0 ± 0,1
3	0,29 ± 0,09	0,57 ± 0,08	0,57 ± 0,09	— « —	7,2 ± 0,3	7,7 ± 0,2
4	0,57 ± 0,10	0,49 ± 0,09	0,41 ± 0,09	— « —	7,9 ± 0,3	8,3 ± 0,2
5	0,57 ± 0,10	0,24 ± 0,08	—	— « —	4,9 ± 0,5	—
6	0,57 ± 0,10	0,65 ± 0,09	0,65 ± 0,09	— « —	6,6 ± 0,2	6,7 ± 0,7

льным разбавлением культуры, отмечен рост ее плотности в 2 раза по сравнению с первоначальными значениями (табл. 2). На фоне этих процессов наблюдали изменение цвета культуры от желто-зеленого в начале эксперимента до оранжевого на 10-е сутки для всех вариантов опыта, кроме № 5, где культура погибла на 6-е сутки.

Содержание β-каротина на 4-е сутки возросло незначительно (на 20—25%) в вариантах с повышенной концентрацией соли и температурой (№ 2 и 5). В остальных вариантах опыта, в том числе и контрольном, содержание β-каротина увеличилось до 7% ОВ и выше (см. табл. 2). Наибольшее содержание β-каротина было зарегистрировано для варианта № 4, где оно составляло 7,9% ОВ.

На 10-е сутки эксперимента плотность культуры и содержание каротиноидов во всех вариантах опыта значительно не изменились по сравнению с 4-ми сутками, за исключением вариантов № 2 и 4, где наблюдали повышенные содержания каротиноидов (см. табл. 2).

### Обсуждение результатов исследований

В литературе представлены две противоположные точки зрения на организацию культивирования *D. salina* для получения β-каротина. Согласно первой из них, выращивание дуналиеллы более эффективно в интенсивной культуре в одну стадию [1, 8, 18]. Согласно второй, выращивание микроводорослей в две стадии дает больший выход каротиноидов [5, 15]. Одностадийное выращивание, как правило, характеризуется низким содержанием β-каротина в клетках микроводоросли, но более высокой плотностью и продуктивностью культуры. Кроме того, оно проще в организации и требует меньших площадей. При двустадийном выращивании *D. salina* содержание

$\beta$ -каротина достигает 10% сухой массы, но высока вероятность гибели клеток.

Ранее мы провели тщательное исследование возможностей одностадийной системы культивирования для получения биомассы *D. salina* и  $\beta$ -каротина. Экспериментально установили, что содержание  $\beta$ -каротина колеблется в пределах 0,5—2,0% ОВ [3]. Оптимальным был признан квазинепрерывный режим культивирования с удельной скоростью протока питательной среды  $0,3 \text{ сут}^{-1}$ , позволяющий получить продуктивность  $4,15 \text{ мг} \cdot \text{дм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$  [2].

Предварительные эксперименты по двустадийному культивированию показали, что клетки *D. salina* в интенсивной культуре накапливают до 3—4% ОВ  $\beta$ -каротина при дефиците минерального субстрата и повышенной освещенности [1]. Дальнейшее повышение освещенности при дефиците минерального субстрата, вероятно, вызовет еще более высокое накопление каротиноидов. Так как повышение поверхностной освещенности свыше  $200 \text{ Вт/м}^2$  в лабораторных условиях проблематично и требует специальных технических решений, то использовали разбавление культуры *D. salina*, что также повышает удельную освещенность клеток микроводоросли.

Созданные условия выращивания обеспечили высокую скорость накопления каротиноидов. Уже на 4-е сутки эксперимента в клетках *D. salina* содержание  $\beta$ -каротина увеличилось в 2 раза (варианты 1, 3, 4). Незначительное повышение содержания  $\beta$ -каротина в вариантах с повышенной концентрацией соли (№ 2) и температурой (№ 5) свидетельствует о замедлении или нарушении физиологических процессов в клетках микроводорослей при росте солёности до  $240 \text{ г/дм}^3$  и температуры — до  $35^\circ\text{C}$ . Максимальное содержание  $\beta$ -каротина было в вариантах с наивысшей освещенностью (№ 1, 3, 4). В остальных вариантах опыта содержание  $\beta$ -каротина было ниже на 20—40% (см. табл. 2). Таким образом, подтверждается предположение о том, что комбинация факторов высокой освещенности и дефицита биогенных элементов является оптимальной для гиперсинтеза  $\beta$ -каротина.

Кроме относительного содержания целевого компонента, важнейшей характеристикой системы культивирования является выход по этому компоненту, или продуктивность. Поскольку продуктивность определяется как плотностью культуры, так и относительным содержанием исследуемого компонента в клетках микроводоросли, то высокий выход  $\beta$ -каротина может быть получен как за счет высокой плотности культуры, так и за счет высокого содержания этого пигмента в биомассе. В связи с тем, что на практике нецелесообразно извлекать компонент при его низком содержании (даже при наличии значительной биомассы), важно, чтобы высокие показатели продуктивности достигались в результате оптимального сочетания плотности культуры и содержания целевого компонента.

Для двух вариантов (№ 3, 4) выход по  $\beta$ -каротину был близок к контрольному (табл. 3). Полученные значения продуктивности для этих вариантов эксперимента обусловлены, главным образом, высоким уровнем накопления каротиноидов, в то время как аналогичный выход в контрольном варианте опыта (№ 6), при более низком относительном содержании каротиноидов

### 3. Выход каротиноидов на второй фазе двустадийной накопительной культуры *Dunaliella salina*

Выход каротиноидов, мг	Варианты эксперимента					
	1	2	3	4	5	6
На 1 дм <sup>3</sup> культуры в сутки	11,25	4,15	7,49	7,03	2,17	7,87
На 1 дм <sup>3</sup> исходной культуры	56,25	20,75	74,88	35,15	10,85	39,35

дов, объясняется более высокой плотностью культуры (см. табл. 2). Наличие других действующих факторов на фоне высокой облученности и дефицита биогенных элементов еще более увеличивает выход  $\beta$ -каротина [5]. Причем при самостоятельном воздействии каждый из этих факторов не способен вызвать сколько-нибудь существенного увеличения относительного содержания или продукции  $\beta$ -каротина (варианты № 2, 5). Наибольший выход по  $\beta$ -каротину (выше контрольного на 40%) зафиксирован для варианта № 1, при воздействии комбинации факторов повышенной освещенности и солености (см. табл. 3).

Ранее нами экспериментально показано, что квазинепрерывный метод с удельной скоростью потока среды не менее  $0,32 \text{ сут}^{-1}$  обеспечивает максимальные продукционные характеристики культуры *D. salina*, по сравнению с другими режимами культивирования. Установленная ранее продуктивность культуры *D. salina* составляет 4,15 мг  $\beta$ -каротина на 1 дм<sup>3</sup> в сутки [3]. Таким образом, использование двустадийной системы культивирования *D. salina* позволило получить продуктивность культуры по  $\beta$ -каротину в 2,7 раза выше, чем при использовании одностадийной.

Сравнение выхода  $\beta$ -каротина при использовании одно- и двустадийного культивирования затруднено и, возможно, необъективно, в связи с разбавлением культуры микроводоросли при переводе с первой стадии на вторую. Поэтому мы также использовали расчет выхода  $\beta$ -каротина на 1 дм<sup>3</sup> исходной культуры, предложенный в работе [12]. При таком подходе выход  $\beta$ -каротина в варианте № 1 данного опыта выше уже не в 2,7 раза, а в 13,5 раза, по сравнению с квазинепрерывным режимом культивирования. При сравнении с вариантом № 3 выход  $\beta$ -каротина был в 18 раз выше, чем при квазинепрерывном режиме, за счет более высокой степени разбавления культуры в этом варианте по сравнению с другими (см. табл. 3). На производстве воссоздать условия варианта № 3 представляется менее затратным и технически легче осуществимым, что, наряду с более высоким выходом  $\beta$ -каротина, позволяет рекомендовать данный вариант к проверке в полупромышленных условиях, с дальнейшим внедрением в производство.

На сегодняшний день одно из существующих в мире производств *D. salina* обеспечивает средний выход  $\beta$ -каротина  $200 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$  [15]. Указанная автором максимальная продуктивность при двустадийном накопительном выращивании дуналиеллы в  $300 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$  (или 1,5 мг  $\beta$ -каротина на 1 дм<sup>3</sup> в сутки) (табл. 4) возможна либо при накоплении 15%  $\beta$ -каротина (в пересчете на органическое вещество биомассы), либо при высокой продуктивности культуры (свыше  $3,5 \text{ г ОВ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$ ), что маловероятно при высоком содер-

**4. Продуктивность культуры *Dunaliella salina* при различных условиях выращивания**

Режим культивирования	Продуктивность культуры, г ОВ·дм <sup>-3</sup> ·сут <sup>-1</sup>	Выход каротиноидов, мг·дм <sup>-3</sup> ·сут <sup>-1</sup>
Непрерывный [3]	0,46 ± 0,02	4,15 ± 0,379
Накопительный [3]	0,33 ± 0,02	3,17 ± 0,31
Непрерывный [18, 19]	0,01 (или 1,0 г ОВ·м <sup>-2</sup> ·сут <sup>-1</sup> )	0,5 (или 50 мг·м <sup>-2</sup> ·сут <sup>-1</sup> )
Накопительный [15]	—	1,5 (или 300 мг·м <sup>-2</sup> ·сут <sup>-1</sup> )
Непрерывный [11]	0,07 (или 3,6 г ОВ·м <sup>-2</sup> ·сут <sup>-1</sup> )	1,44 (или 72 мг·м <sup>-2</sup> ·сут <sup>-1</sup> )
Эксперимент	—	11,25 мг·дм <sup>-3</sup> ·сут <sup>-1</sup>

жании каротина в клетках микроводоросли. Полученная на предприятии Украины продуктивность непрерывной культуры *D. salina* в 3,6 г·м<sup>-2</sup>·сут<sup>-1</sup> соответствовала выходу каротиноидов в 36—72 мг·м<sup>-2</sup>·сут<sup>-1</sup> [11]. Так же в квазинепрерывном режиме испанские исследователи получили выход β-каротина 50 мг·м<sup>-2</sup>·сут<sup>-1</sup> при продуктивности по биомассе 1,0 г ОВ·м<sup>-2</sup>·сут<sup>-1</sup> и содержании каротиноидов около 5% ОВ [18]. При этом при двустадийном накопительном выращивании [18] выход β-каротина был таким же, как и при квазинепрерывном режиме, за счет увеличения накопления β-каротина до 16% ОВ при резком снижении продуктивности культуры по биомассе.

Полученное несоответствие значений продуктивности культуры и выхода каротина свидетельствует о наличии большого числа нерешенных проблем в данной области и о перспективности продолжения исследований по повышению продуктивности культуры *D. salina*. Столь большая разница по выходу β-каротина между данными разных исследователей, а также между лабораторными и промышленными условиями может объясняться действием различных факторов: колебанием дневной освещенности, отсутствием освещения ночью, фотоингибирующим действием солнечного света в полдень, суточными колебаниями температуры, неэффективным поглощением углекислого газа культурой. В отличие от производства, где системы и условия выращивания микроводорослей нестабильны и могут значительно варьировать, в лабораторных установках все эти параметры поддерживаются на заданном уровне.

Полученная в данном опыте продуктивность *D. salina* по каротиноидам составляет 11,25 мг·дм<sup>-3</sup>·сут<sup>-1</sup>, что соответствует получению более 1000 мг β-каротина с 1 м<sup>2</sup> в сутки. Данный показатель более чем в 3 раза выше максимально зарегистрированного в промышленных условиях, что оставляет простор для исследований получения β-каротина в полупромышленных условиях, а также для усовершенствования методов и режимов культивирования *D. salina*. При успешном решении ряда научных и технических задач удастся повысить рентабельность производства и вывести на мировой ры-

нок натуральный водорослевый  $\beta$ -каротин, для производства которого в Украине есть все условия.

### Заклучение

Таким образом, на основании полученных данных по динамике плотности культуры *D. salina*, а также динамике содержания и выхода  $\beta$ -каротина, показано, что ее культивирование в двустадийном накопительном режиме имеет ряд преимуществ (по накоплению и выходу  $\beta$ -каротина) по сравнению с квазинепрерывным методом. Для получения биомассы *D. salina* с содержанием  $\beta$ -каротина до 8% ОВ на второй стадии рекомендуется использование накопительного режима культивирования с повышением освещенности в 10 раз при дефиците биогенных элементов в среде. Наибольшая продуктивность по  $\beta$ -каротину для исследованного вида реализуется при совместном действии факторов повышенной освещенности и солености на фоне дефицита элементов минерального питания и достигает  $11,25 \text{ мг дм}^{-3} \text{ сут}^{-1}$ , что на 40% выше по сравнению с продуктивностью культуры при недостаточности минерального питания. Апробированный метод двустадийного культивирования *D. salina* для получения биомассы, обогащенной  $\beta$ -каротином, позволяет повысить выход  $\beta$ -каротина в 2,7 раза по сравнению с одностадийным методом. Оптимизированный по освещенности, температуре и составу среды режим двустадийного культивирования *D. salina* позволяет повысить выход  $\beta$ -каротина на 40% по сравнению со стандартными условиями.

\*\*

*Проведено експериментальні дослідження з оптимізації двостадійної системи культивування зеленої мікроводорості Dunaliella salina для одержання біомаси, збагаченої  $\beta$ -каротином. Для підвищення вмісту  $\beta$ -каротину у клітинах *D. salina* рекомендується на другій стадії культивування збільшити освітленість у 10 разів при дефіциті біогенних елементів в середовищі. Апробований метод культивування *D. salina* дозволяє підвищити вихід  $\beta$ -каротину в 2,7 рази порівняно з одностадійним методом.*

\*\*

*Experimental researches on optimization of two-stage system of green microalgae Dunaliella salina cultivation for production of biomass enriched with  $\beta$ -carotene were hold. In order to increase the content of  $\beta$ -carotene up to 8% DWFA in *D. salina* cells, it was recommended to intensify the illumination by 10 times at the deficit of nutrients in the culture medium on the second stage of cultivation. Tested method of *D. salina* cultivation allows to increase  $\beta$ -carotene yield by 2.7 times in comparison with the one-step method.*

\*\*

1. Боровков А. Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Teod.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 2008. — 28 с.
2. Боровков А. Б., Гуввилович И. Н. Ростовые и биохимические показатели квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* // Биотехнология. — 2012. — Т. 5, № 3. — С. 105—111.
3. Гуввилович И. Н. Продукционные характеристики микроводорослей *Dunaliella salina* Teod. и *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. при интенсив-



- ном культивировании: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Севастополь, 2011. — 25 с.
4. *Ефремова Н.* Разработка способов получения антиоксидантных препаратов на основе биоактивных веществ цианобактерий и микроводорослей: Автореф. дис. ... докт. биол. — Кишинев, 2009. — 29 с.
  5. *Масюк Н. П.* Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. — Киев: Наук. думка, 1973. — 487 с.
  6. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидро-биологической практике.* — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
  7. *Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Терентьева Н. В.* Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор // Мор. экол. журн. — 2008. — Т. 7, № 2. — С. 5—23.
  8. *Семененко В. Е., Абдуллаев А. А.* Параметрическое управление биосинтезом бета-каротина в клетках *Dunaliella salina* в условиях интенсивной культуры // Физиология растений. — 1980. — Т. 27, № 1. — С. 31—41.
  9. *Терентьева Н. В., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н.* Особенности вторичного каротиногенеза в вегетативных клетках *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) при различных условиях минерального обеспечения // Мор. экол. журн. — 2008. — Т. 7, № 4. — С. 66—74.
  10. *Тренкеншу Р. П., Белянин В. Н.* Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // Биология моря. — 1979. — № 51. — С. 41—46.
  11. *Тренкеншу Р. П., Геворгиз Р. Г., Боровков А. Б.* Основы промышленного культивирования Дуналиеллы солоноводной (*Dunaliella salina* Teod.). — Севастополь: Экокси-Гидрофизика, 2005. — 103 с.
  12. *Чубчикова И. Н., Дробецкая И. В., Минюк Г. С. и др.* Скрининг одноклеточных зеленых водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) // Мор. экол. журн. — 2011. — Т. 10, № 1. — С. 91—97.
  13. *Aharon O.* A hundred years of *Dunaliella* research: 1905—2005 // Saline Systems. — 2005. — Vol. 1, N 2. — P. 1—14.
  14. *Ben-Amotz A.* Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products — major industrial species — *Dunaliella* // Handbook of microalgal culture. — Oxford: Blackwell, 2004. — P. 273—280.
  15. *Ben-Amotz A.* New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for  $\beta$ -carotene production // J. of Appl. Phycol. — 1995. — Vol. 7. — P. 65—68.
  16. *Ben-Amotz A., Avron M.* The potential use of *Dunaliella* for the production of glycerol,  $\beta$ -carotene and high protein feed // Biosaline Research: A Look to the Future. — San-Pietro; New York: Plenum Publ. Corp., 1982. — P. 207—214.
  17. *Ben-Amotz A., Levy Y.* Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans  $\beta$ -carotene in human serum // Amer. J. Clin. Nutr. — 1996. — Vol. 63. — P. 729—734.

18. *Del Campo J.A., García-González M., Guerrero M.G.* Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2007. — Vol. 74, N 6. — P. 1163—1174.
19. *García-González M., Moreno J., Cacavate J. P. et al.* Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain // *J. Appl. Phycol.* — 2003. — Vol. 15. — P. 177—184.
20. *Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A.* Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella bardawil* // *Plant. Cell. Physiol.* — 1990. — Vol. 31, N 5. — P. 689—696.
21. *Wellburn A. R.* The Spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // *J. Plant Phys.* — 1994. — Vol. 144. — P. 307—313.
22. *Zilberman D., Caswell M.* Algoculture. — Department of Agricultural and Resource Economics, University of California at Berkeley, 2000. — 100 p.

Институт биологии южных морей,  
Севастополь

Поступила 16.06.14