

УДК 579:582.26 / .27:576.31:577.1

**ОСОБЛИВОСТІ ВТОРИННОГО КАРОТИНОГЕНЕЗУ У ЗЕЛЕНІЙ
МІКРОВОДОРОСТІ *SCENEDESMUS RUBESCENS* (DANGEARD) KESSLER
ET AL. В УМОВАХ ДВОХСТАДІЙНОЇ НАКОПИЧУВАЛЬНОЇ КУЛЬТУРИ**

Челебієва Е.С., Мінюк Г.С., Чубчикова І.М.

*Інститут біології південних морів ім. А.О. Ковалевського НАН України, Севастополь, Україна
E-mail: elina.chelebieva @ gmail.com*

Наведено нові дані, що характеризують морфометричні, фізіолого-біохімічні та продукційні характеристики зеленої мікродорості *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. в умовах двохстадійної накопичувальної культури. Виявлено специфічні особливості адаптивного відгуку водорості на індукцію вторинного каротиногенезу із застосуванням ацетату натрію: висока виживаність клітин, істотне збільшення їх об'ємів, незвичайний склад вторинних каротиноїдів з домінуванням β-каротину і вільних астаксантину і адоніксантину, високий вихід ліпідів з літру культури.

Ключові слова: вторинний каротиногенез, астаксантин, β-каротин, ліпіди, *Scenedesmus rubescens*.

ВСТУП

Робота є складовою частиною досліджень вторинного каротиногенезу (ВКРГ) у зелених мікродоростей для виявлення нових комерційно перспективних продуцентів природного кетокаротиноїду (ККР) астаксантину (АСТ), що проводяться в Інституті біології південних морів ім. А.О. Ковалевського НАН України (ІнБПМ). Характеристика стратегії та методології скринінгу викладена у вступній статті, яка випереджає серію робіт, присвячених окремим видам [1]. Підставою для включення планктонної мікродорості-мешканця дрібних евтрофних водойм *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler, Schafer, Hummer, Kloboucek & Huss до списку об'єктів скринінгу послужили: а) незвичайний жовтувато-помаранчевий колір старих агаризованих культур; б) екологічна спеціалізація, відмінна від уже протестованих едафотільних видів порядку Scenedesmales Kostikov [2-6]; в) фрагментарність літературних відомостей, що характеризують ВКРГ у представників багаточисленого роду *Scenedesmus* Meyen, 1829. Матеріали, які висвітлюють дане питання, в переважній більшості випадків лише констатують наявність вторинних каротиноїдів (ВКР) у окремих видів *Scenedesmus* і не містять кількісних даних про особливості їх складу залежно від умов зовнішнього середовища, продукційні характеристики культури, адаптивні морфо-фізіологічні зміни клітин, сполучені з процесом ВКРГ [7-8].

Отже, метою даної роботи є визначення динаміки морфометричних, фізіолого-біохімічних і продукційних характеристик *S. rubescens* при вирощуванні за

уніфікованою схемою двохстадійної накопичувальної культури [1]. Основні завдання полягали у визначенні: а) динаміки чисельності (N) і об'ємів клітин (V), вмісту в них сухої речовини (CP), хлорофілу a (X_{la}) і сумарних каротиноїдів ($\Sigma K P$) на «зеленій» і «червоній» стадіях культивування, б) оцінці виживаності клітин при індукції ВКРГ із застосуванням ацетату натрію ($NaAc$), в) визначенні фракційного складу ВКР; г) техніко-хімічній оцінці біомаси водорості за вмістом ліпідів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження служив штам IPPAS D-292, переданий у ІнБПМ з колекції Інституту фізіології рослин РАН у травні 2007 р. як мутант *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. [9]. За результатами морфологічного і молекулярно-генетичного аналізу нуклеотидної послідовності ядерного гена 18S rDNA, виконаного в ІнБПМ НАНУ та Київському національному університеті ім. Т. Шевченка, штам був ідентифікований як *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. (Scenedesmaceae, Acutodesmus) [10].

Фізико-хімічні параметри режиму культивування на I («зеленій») стадії двохстадійної культури були такими: поживне середовище ВВМ 3N, освітленість – 7000 лк (лампи Feron DL 20W 6400K), фотоперіод – 15 год світло: 9 год темрява, температура середовища – 25-26 °C, швидкість продувки газо-повітряною сумішшю – 0,44 л·хв⁻¹·л⁻¹ (0,5 % CO₂ (v/v), об'єм культур в скляних конічних колбах – 0,6 л, початкова чисельність клітин – (2,3-2,4)·10⁶ кл·мл⁻¹, тривалість стадії – 16 діб. Переведення культур на II («червону») стадію тривалістю 11 діб здійснювали шляхом 10-кратного розведення «зеленої» культури редукованим по N і P середовищем ВВМ (4,12 мг·л⁻¹ N і 5,32 мг·л⁻¹ P) і зміни однобічного періодичного освітлення на двостороннє цілодобове (по 7000 Лк з кожної сторони). Для запобігання перегріву та агрегації клітин швидкість продувки збільшили до 1 л·хв⁻¹·л⁻¹, а температуру живильного середовища підтримували на рівні 26-27 °C за допомогою побутового кондиціонера та двох вентиляторів. В одному з варіантів експерименту для інтенсифікації біосинтезу ККР в поживне середовище внесли NaAc до концентрації 0,05 М. Варіант без додавання NaAc служив контролем. Число повторностей в обох випадках дорівнювало трьом. Динаміку чисельності клітин (N) контролювали за допомогою проточного цитометра Cytomics™ FC 500, забезпеченого однофазним 488 нм аргонним лазером (Beckman Coulter, США) [11]. Об'єми клітин (V) встановлювали як у [12] за допомогою комп'ютерної програми ImageJ, мікроскопу Leica DM -1000 і цифрової камери Leica Microsystem AG (Німеччина). Вміст сухої речовини (CP) аналізували ваговим методом на мембранних фільтрах «Sartorius» (Німеччина). Вміст хлорофілу a (X_{la}) і сумарних каротиноїдів ($\Sigma K P$) у ацетонових екстрактах визначали на СФ 46 (ЛОМО, Росія) за рівняннями Ліхтенталера [13]. Фракційний склад ВКР досліджували методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинах «Silicagel 60» Merck (Німеччина) у двох системах розчинників як описано раніше у [14]. Вміст ліпідів у біомасі аналізували за [15]. Всі аналітичні вимірювання для кожної біологічної повторності проводили тричі. Дані, що наведені на малюнках і в тексті, є середніми з усіх

значень (\bar{x}). Їх варіабельність характеризується вибіркоким стандартним відхиленням (s) або помилкою середньої арифметичної (m).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Доцільність використання методу двохстадійної накопичувальної культури для проведення скринінгу нових промислових джерел АСТ неодноразово обговорювалась нами в попередніх публікаціях [1, 3-6, 16], тому тут ми лише ще раз підкреслимо, що найважливішою умовою порівняльної оцінки особливостей ВКРГ і біотехнологічного потенціалу продуцентів АСТ є стандартизація режиму їх культивування, що у свою чергу передбачає і схожу схему обговорення експериментальних даних для різних видів, з акцентом на аналізі таких властивостей водоростей як швидкість росту на I «зеленій» стадії культивування, динаміка розмірів клітин, їх виживання в результаті індукції ВКРГ, швидкість накопичення ВКР в клітинах, вихід цільових компонентів і ін. З цих позицій розглянемо результати, отримані для *S. rubescens*, використовуючи, в разі необхідності, дані більш ранньої роботи, виконаної в 2009 р [5], і не включені у вказану публікацію через ще невстановлений на той час таксономічний статус виду [10].

Накопичувальні криві, отримані для *S. rubescens* на «зеленій» стадії культивування в двох експериментах (рис. 1а), свідчать про те, що в лабораторних умовах прісноводний планктонний вид мало відрізняється від наземних водоростей за швидкістю росту на мінеральному середовищі ВВМ 3N.

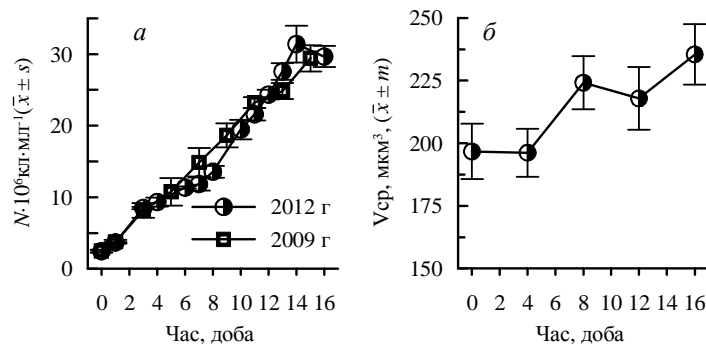


Рис.1 Динаміка чисельності (а) і об'ємів (б) клітин *S. rubescens* на «зеленій» стадії культивування

Середні питомі швидкості росту в обох експериментах ($\mu_{\text{сер}} = 0,17-0,18$ добу⁻¹, $\mu_{\text{макс}} = 0,42$ добу⁻¹) були такими ж, як і у раніше досліджених видів ($\mu_{\text{сер}} = 0,14-0,18$ добу⁻¹) [5], за винятком швидше зростаючих *Bracteacoccus* spp., у яких в подібних умовах $\mu_{\text{сер}}$ досягала 0,44-0,48 добу⁻¹, а $\mu_{\text{макс}} - 0,80-1,00$ добу⁻¹ [4]. У міру розвитку дефіциту живлення середній об'єм автоспор поступово збільшувався і до кінця «зеленої» стадії перевищив початковий майже на 20 % (рис. 1 б).

Паралельно зростанню числа клітин в культурі накопичувалися СР і фотосинтетичні пігменти (рис. 2 а, д, і).

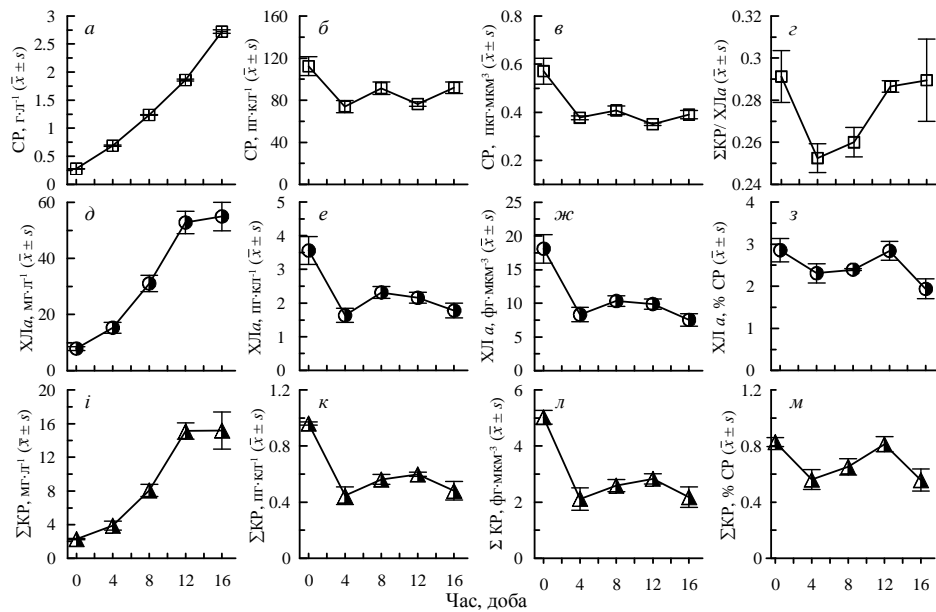


Рис. 2 Динаміка вмісту сухої речовини і фотосинтетичних пігментів в культурі і клітинах *S. rubescens* на «зеленій» стадії культивування

Середня продуктивність культур по СР на «зеленій» стадії складала $0,15 \pm 0,002$ г·л⁻¹·добу⁻¹, по ХЛа – $2,80 \pm 0,39$ мг·л⁻¹·добу⁻¹; по ΣКР – $0,81 \pm 0,14$ мг·л⁻¹·добу⁻¹. У той же час при розрахунку на клітину вміст ХЛа і ΣКР через старіння культур знизився приблизно в 2 рази (рис. 2 е, к), а в одиниці клітинного об'єму (мкм³) – у 2,4-2,5 рази (рис. 2 ж, л). Аналогічні (хоча і менш істотні) зміни були відзначені і для вмісту в клітинах СР – на 16-ту добу він зменшився в 1,3-1,4 рази (рис. 2 б, в). Внаслідок односпрямованості кривих абсолютних показників негативна динаміка масової частки пігментів (% СР) була виражена менш чітко (рис. 2 з, м).

Індукцію ВКРГ в голодуючих клітинах здійснювали за допомогою прийнятого в наших дослідженнях прийому – створення 20-кратного позитивного градієнта освітленості одночасно з внесенням в середовище NaAc до концентрації 50 мМ [1]. Ідея використовувати для цих цілей NaAc належить М. Друпу, який показав ще в 1955 р, що за допомогою NaAc можна ініціювати біосинтез АСТ у *Haematococcus pluvialis* навіть у повній темряві. Завдяки роботам М. Кобаяші і співавт. [17] цей прийом отримав широке розповсюдження в дослідженнях мікроводоростей, здатних до ВКР [17-19]. Молекулярні механізми впливу NaAc на експресію генів біосинтезу АСТ до кінця не ясні, проте ряд авторів вважає, що роль сигнальних факторів, «що включають» їх транскрипцію, виконують активні форми кисню, а ацетат лише підсилює окислювальний стрес і поставляє вуглець для утворення ВКР [17, 20-21].

При роботі з NaAc потрібно мати на увазі, що при високій освітленості реакція голодуючих клітин на його присутність в середовищі залежить від фази їх життєвого циклу. Так, наприклад, молоді монади *H. pluvialis* гинуть навіть при

відносно низьких концентраціях NaAc (15 мМ), у той час як нерухомі пальмели добре переживають більш високі концентрації (до 50 мМ) і відповідають на них дозозалежним прискоренням синтезу АСТ [2]. Наземні кокоїдні продуценти АСТ, як правило, більш стійкі до NaAc [3-6], однак і для них може спостерігатися значна смертність клітин, як це, наприклад, мало місце при культивуванні *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. при природній освітленості в 40-60 клк [6]. Що стосується видів роду *Scenedesmus*, то відомості про їх відношення до ацетату нам вдалося знайти лише в трьох публікаціях, присвячених *S. vacuolatus* [20] і двох видів *Scenedesmus* sp. [21, 33]. При цьому про останні наведено лише напівкількісну інформацію, представлену у вигляді збільшення площ каротиноїдних піків на хроматограмах [8] і коефіцієнту КАР/Хла в присутності NaAc [7].

Нижче наведені нові дані, які кількісно характеризують морфометричні та фізіолого-біохімічні особливості реакції *S. rubescens* на експериментальну індукцію ВКРГ з використанням NaAc. Перш за все, необхідно відзначити, що у цього виду протягом всієї «червоної» стадії не спостерігалось ні масового відмирання клітин (як, наприклад, у *H. pluvialis* або *Bracteacoccus* spp. [16, 4]), ні істотного зменшення їх розмірів при споруляції (як у *Ettlia carotinoso*) [12]. Навпаки, їх чисельність в обох варіантах залишалася незмінною, а середні об'єми збільшилися в контролі в 2,6 рази, а в присутності NaAc – в 3,4 рази (рис. 3).

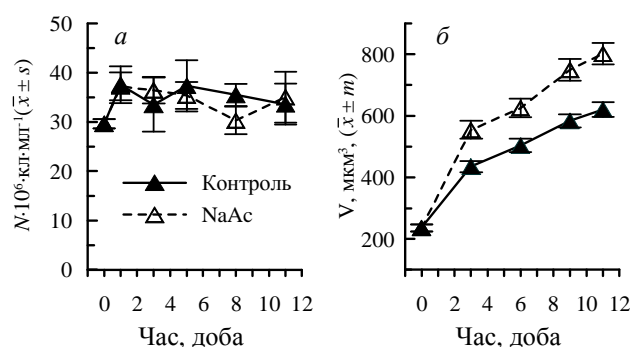


Рис. 3. Динаміка чисельності (а) і середніх об'ємів клітин (б) *S. rubescens* на «червоній» стадії культивування

Мікроскопічний аналіз виявив зміни клітинної структури, подібні до змін, описаних у *Scenedesmus komarekii* Hegewald в умовах високої освітленості [22]. Найбільш важливі з них полягали в трансформації одноядерних клітин в багатоядерні, розчленуванні одиночних лопатевих пристінних хлоропластів на численні дрібні глобули, переміщенні останніх у центральну область клітин, потовщенні клітинної оболонки і зміні форми клітин з веретеновидної або подовжено-овальної на овальну або кулясту (рис. 4).



Рис. 4. Клітини *S. rubescens* в кінці «зеленої» та «червоної» стадій культивування

Морфологічні перетворення супроводжувалися характерними для продуцентів АСТ метаболічними перебудовами, спрямованими на підготовку клітин до стадії спокою – накопиченням запасних речовин і ВКР і зниженням вмісту ХЛа (рис. 5).

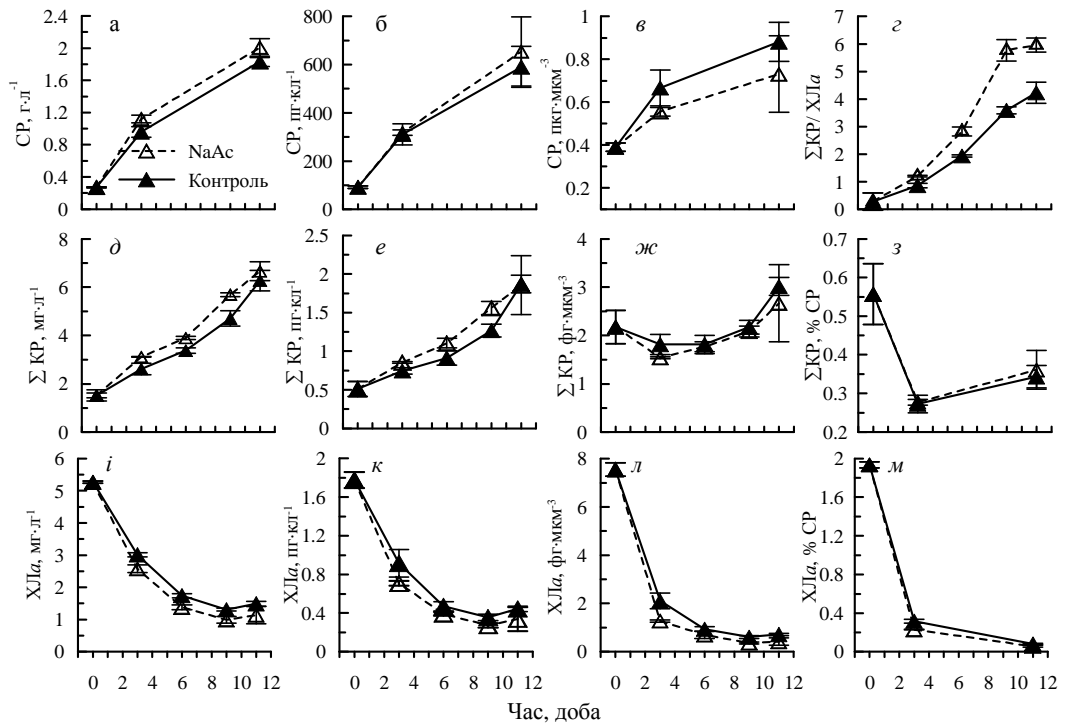


Рис. 5. Динаміка вмісту сухої речовини (а-в), сумарних каротиноїдів (д-з), хлорофілу *a* (и-м) і коефіцієнта $\Sigma\text{КР}/\text{ХЛа}$ (г) в клітинах *S. rubescens* на «червоній» стадії культивування ($\bar{x} \pm s$)

Цікаво, що у *S. rubescens* NaAc практично не впливав на швидкість цих процесів. Чисельні значення аналізованих показників у більшості паралелей достовірно не розрізнялися, хоча слабо виражена тенденція посилення стрес-впливу у присутності NaAc все ж таки спостерігалася. Статистично значущими були лише зміни коефіцієнту $\Sigma\text{КР}/\text{Хла}$ (рис. 5 з).

Ще однією особливістю стрес-реакції *S. rubescens* було більш значне, ніж у інших продуцентів АСТ, накопичення СР. За 11 діб її вміст у клітинах обох варіантів збільшився в 6,4 і 7,1 рази (рис. 5 б), а середня продуктивність 10-кратно розбавлених стаціонарних культур (рис. 3а) була майже такою ж, як і в період активного росту на зеленій стадії, і склала $0,14 \pm 0,01 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{добу}^{-1}$ у контролі та $0,16 \pm 0,01 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{добу}^{-1}$ в варіанті з ацетатом.

Протягом 11 діб вміст Хла в розрахунку на клітину, мкм^3 і СР знизився до мінімальних значень ($0,44\text{-}0,34 \text{ пг}\cdot\text{кл}^{-1}$; $0,72\text{-}0,42 \text{ фг}\cdot\text{мкм}^3$; $0,08\text{-}0,06 \%$ СР) і його загальний рівень у культурах зменшився в 3,5-4,6 рази (рис. 5 і-м).

Криві динаміки вмісту $\Sigma\text{КР}$ (рис. 5 д-ж), що були результуючими процесів деградації фотосинтетичних КР в хлоропластах та накопичення ВКР в цитоплазмі, мали спрямованість, протилежну кривим Хла. Середня швидкість накопичення $\Sigma\text{КР}$ в клітинах становила $123\text{-}148 \text{ фг}\cdot\text{кл}^{-1}\cdot\text{добу}^{-1}$. За їх внутрішньоклітинним вмістом у кінці «червоної» стадії ($1,82$ і $1,86 \text{ пг}\cdot\text{кл}^{-1}$), а також за теоретичним виходом $\Sigma\text{КР}$ з літра початкової культури щільністю $2,3\text{-}2,4\cdot 10^6 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}$ ($1,76 \pm 0,02$ і $1,93 \pm 0,21 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{добу}^{-1}$) планктонний вид був схожий з едафотільними водоростями порядку Scenedesmales Костіков *Bracteacoccus* spp. [4] і *Scotiellopsis rubescens* [6], проте істотно поступався їм за масовою часткою $\Sigma\text{КР}$ в СР ($0,34 \%$ СР проти $0,5\text{-}0,9 \%$ СР у *B. spp.* і $1,9\text{-}2,2 \%$ СВ у *S. rubescens*). Ці відмінності, а також рідкісний для продуцентів АСТ зменшення масової частки $\Sigma\text{КР}$ (рис. 5 з), по всій ймовірності, були пов'язані з випереджаючою швидкістю накопичення сухої речовини.

Специфічний жовтувато-помаранчевий колір культур *S. rubescens* в кінці «червоної» стадії визначався особливостями фракційного складу його ВКР, які майже на третину складалися з жовтого β -каротину (БК) (табл.). Коментуючи цей факт, необхідно зазначити, що у більшості досліджених нами видів Chlorophyceae БК визначався в «червоній» біомасі або як мінорний компонент ($<3 \%$ $\Sigma\text{КР}$ [16]), або в концентраціях, що не перевищували $8\text{-}12 \%$ $\Sigma\text{КР}$ [3, 12], причому його вміст варіював залежно від наявності в середовищі NaAc [12] і мікроелементів [3]. В цілому, зазначені величини добре узгоджуються з сучасними уявленнями про синтез АСТ у мікрводоростей, в якому БК грає роль ключового проміжного субстрату. Вважається доведеним, що при стресі БК утворюється *de novo* в хлоропластах і транспортується в цитоплазму, де під дією неспецифічних 4,4'-кетолаз (CRTO) і 3,3'-гідроксилаз (CRTR- b) окислюється через ряд інтермедіатів до АСТ [18]. З цього правила відомо тільки два винятки – *Dunaliella salina* і *Trentepohlia aurea*, які, внаслідок відсутності у них ядерних генів CRTO і CRTR-b, акумулюють як ВКР β - і α -каротини [20, 23-24].

Таблиця 1
Фракційний склад вторинних каротиноїдів *S. rubescens*, % від суми; $\bar{x} \pm s$; n = 3

Найменування фракції	Колір ацетонових екстрактів	$\lambda_{\text{макс}}$ в ацетоні, нм	Rf	Контроль	Ацетат
β -каротин (БК)	жовтий	454	0,93	30,57 \pm 0,64	34,00 \pm 1,44
Дієфіри астаксантину (ДЕАСТ)	лососево- червоний	480	0,55	сліди	сліди
Ехіненон (ЭХ)	світло-шафрановий	460(473)	0,48	9,3 \pm 1,26	6,88 \pm 0,24
Ефіри адонірубін (ЕАДР)	рожево-червоний	474	0,18	сліди	сліди
Кантаксантин (КАН)	шафрановий	471	0,16	14,22 \pm 1,13	8,99 \pm 1,07
Моноєфіри астаксантину (МЕАСТ)	лососево-червоний	480	0,13	10,72 \pm 0,35	7,89 \pm 0,67
Моноєфіри адоніксантину (МЕАДК)	помаранчево- червоний	480	0,08	8,53 \pm 1,02	4,99 \pm 0,24
Вільний адонірубін (АДР)	рожево-червоний	474	0,04	сліди	сліди
Сума вільного астаксантину (АСТ) і адоніксантину (АДК)	лососево-червоний / помаранчево- червоний	480 / 480	0,015 / 0,01	23,62 \pm 2,32	31,81 \pm 0,84

Виходячи з цих співставлень, логічно передбачити, що причиною накопичення БК при стресі у видів, наділених генами CRTO і CRTR-b, є зниження концентрації/активності ферментів що приймають участь у його оксигенації і гідроксилюванні, які в свою чергу, контролюються умовами середовища. Той факт, що при подібному режимі культивування відносна концентрація БК варіює у різних водоростей в досить широких межах, вказує на наявність видової специфіки контролю за швидкістю протікання окремих стадій синтезу АСТ. Слід зазначити, що хоча в даній роботі динаміку вмісту фракцій на стадії ВКРГ не визначали, судити про те, що БК дійсно виконував роль ВКР (тобто накопичувався в клітинах *S. rubescens* внаслідок абіотичного стресу) можна за такими непрямими показниками як: а) незвично висока частка БК у ВКР наприкінці «червоної» стадії, невласлива для його рівня в ПКР (10-15%), б) суттєва деградація фотосинтезу, що виключає накопичення допоміжного пігменту в хлоропластах; в) результати дослідження динаміки складу ВКР у різних видів, виконаного в 2009 р, який показав, що при однакових умовах середовища у 4 з 6 досліджених видів частка БК в Σ КР у міру розвитку ВКРГ знижувалась, у *Chlorella zofingiensis* практично не мінчалась, і тільки у *S. rubescens* зросла майже в 2 рази (рис. 6).

Ще одна особливість складу ВКР у *S. rubescens* полягає в незвично високій частці вільних АСТ і АДК в Σ КР (у використаній системі ТШХ вони не розділяються), яка достовірно збільшується у присутності NaAc. Зазвичай вільні гідроксильовані ККР (АСТ, АДК і АДР) реєструються або у виді слідів (як у *H. pluvialis*, *E. carotinosus*, *B. minor*), або в концентраціях 8-10% Σ КР (як у *Scotiellopsis rubescens*, *B. giganteus*). Основними формами їх запасання є моно- і рідше дієфіри жирних кислот [3-6, 12, 16]. Це цілком відповідає відомим уявленням про те, що речовини ліпідної природи з вільними реакційними групами не можуть накопичуватися в живих клітинах без негативних наслідків для структурної

організації клітинних мембран і тому запасуються у складі ефірів або білково-вуглеводних комплексів [25].

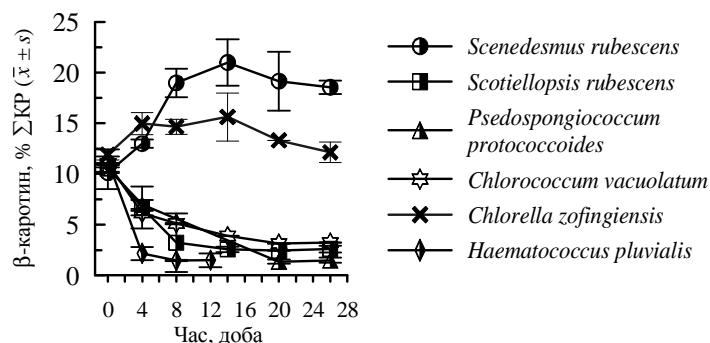


Рис. 6. Динаміка вмісту β-каротину у зелених мікроводоростей на «червоній» стадії

Тим не менш, описаний вище факт переважного накопичення АСТ у вільному вигляді не є одиничним, і був відзначений в ще більш яскравій формі у аерофільної водорості *Chlorococcum* sp., у якій в присутності H_2O_2 вміст вільного АСТ досягав 81% від суми всіх його форм [21]. Пояснення цим фактам поки немає, ясно тільки, що вони навряд чи пов'язані з недоліком жирних кислот для естерифікації ОН-груп, так як вміст ліпідів у клітинах *S. rubescens* за 11 діб «червоної» стадії збільшився майже на порядок (рис. 7 б).

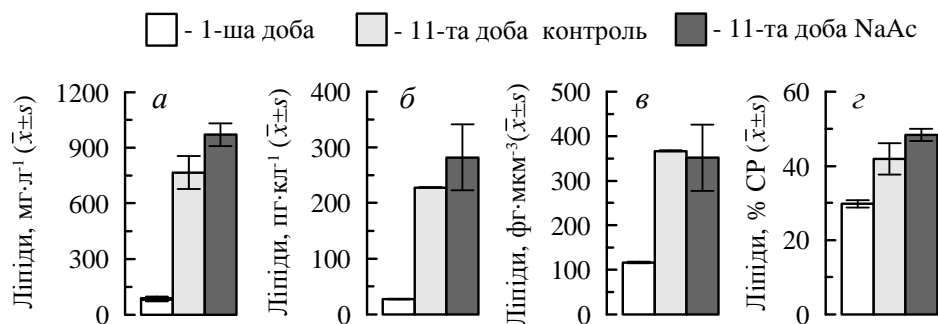


Рис. 7. Вміст ліпідів в культурах (а), клітках (б, в) і біомасі (г) *S. rubescens* на «червоній» стадії культивування залежно від наявності ацетату натрію в середовищі

Таке форсоване накопичення ліпідів вже саме по собі, навіть безвідносно до динаміки вмісту ВКР, заслуговує серйозної уваги при оцінці комерційного потенціалу даного виду. Середньодобовий вихід ліпідів з літра вихідної культури *S. rubescens* (з урахуванням її 10-кратного розведення при переході на стадію ВКРГ) склав $253,59 \pm 18,85$ $mg \cdot L^{-1} \cdot добу^{-1}$ у контролі та $329,25 \pm 10,69$ $mg \cdot L^{-1} \cdot добу^{-1}$ у присутності NaAc, а масова частка ліпідів в СВ зросла з $29,84 \pm 0,98$ до $41,89 \pm 4,20$ і $48,36 \pm 1,66$ % CP, відповідно (рис. 7г). За цими показниками *S. rubescens* істотно

перевершує багато морських видів, рекомендованих в даний час для виробництва технічних олій і біодизеля [26].

ВИСНОВКИ

Підсумовуючи отримані результати, варто ще раз акцентувати увагу на особливостях адаптивної відповіді *S. rubescens* на комплексний стрес-вплив, що індукує ВКРГ: а) збереження чисельності клітин в постстресорний період при використанні NaAc для індукції ВКРГ; б) не менше ніж трикратне збільшення об'ємів вегетативних клітин при переході в стадію спокою; в) накопичення гідроксильованих ККР переважно у вільній формі; г) незвично високий відносний вміст β-каротину у фракційному складі вторинних каротиноїдів; д) комерційно значуща продуктивність культур по ліпідам.

Список літератури

1. Минюк Г. С. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований / Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова [и др.] // Экология моря. - 2010. - Вып. 80. - С. 67–78.
2. Костиков И. Ю. Водоросли грунтов Украины. / И. Ю. Костиков, П. О. Романенко, Е. М. Демченко [та ін.] // К.: Фітосоціо-центр. - 2001. - 300 с.
3. Чубчикова И. Н. Влияние состава среды на содержание вторичных каротиноидов у микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae) / И. Н. Чубчикова // Морск. экол. журн. - 2012. - Т. XI. № 4. - С. 95–101.
4. Чубчикова И. Н. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Wraecteosoccus* / И. Н. Чубчикова, И. В. Дробецкая, Г. С. Минюк [и др.] // Морск. экол. журн. - 2011. - Т. X. № 1. - С. 91–97.
5. Чубчикова И. Н. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов / И. Н. Чубчикова, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, [и др.] // Экология моря. - 2009. - Вып. 77. - С. 77–83.
6. Чубчикова И. Н. Вторичный каротиногенез у зелёной микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. в условиях природной освещённости и температуры / И. Н. Чубчикова, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая // Экология моря. - 2010. - Спец. вып. 81. - С. 77–81.
7. Chu F.L. Carotenogenesis up-regulation in *Scenedesmus* sp. using a targeted metabolomics approach by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry / F. L. Chu, L. Pirastru, R. Popovic [et al.] // J. Agric. Food Chem.- 2011. - N 59. - P. 3004–3013.
8. Pirastru L. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment / L. Pirastru, M. Darwish, F. L. Chu [et al.] // J. Appl. Phycol. - 2012. - Vol. 24. - P. 117–124.
9. Каталог культур микроводорослей в коллекции СССР.- М: ИФР РАН. - 1991. - С. 226.
10. Челебієва Е. С. Морфологічні та молекулярно-філогенетичні дослідження *Scenedesmus rubescens* (Chlorophyta) / Е. С.Челебієва, С. В. Скребовська // Вчені записки Таврійського національного університету імені В. І. Вернадського. Серія «Біологія, хімія». - 2013. - Том 26 (65). № 2. - С. 189–196.
11. Marie D. Phytoplankton cell counting by flow cytometry / D. Marie, N. Simon, D. Vaultot. - Algal Culturing Techniques. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. - P. 253–267.
12. Челебієва Э. С. Динамика химического состава *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) при экспериментальной индукции вторичного каротиногенеза / Э. С. Челебієва, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая [и др.] // Морск. экол. журн. - 2013. - Т. XII. № 2. - С. 78–87.
13. Lichtenthaler Н. К. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes / Н. К. Lichtenthaler // Methods Enzym. - 1987. - Vol. 148. - P. 350–382.

14. Дробецкая И. В. Определение содержания астаксантина и кантаксантина у зелёных микроводорослей методом тонкослойной хроматографии / И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, А. Б. Боровков [и др.] // Экология моря. - 2009. - Вып. 79. - С. 50–56.
15. Ahlgren G. Lipid analysis of freshwater microalgae: A method study / G. Ahlgren, L. Merino // Arch. Hydrobiol. - 1991. - Vol. 121. N 3. - P. 295–306.
16. Данцюк Н. В. Влияние ацетата натрия на интенсивность вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* / Данцюк Н. В. // Экология моря. – 2010. - Спец. вып. 80. - С. 44 – 50.
17. Kobayashi M. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green alga *Haematococcus pluvialis* / M. Kobayashi, T. Kakizono, S. Nagai // Appl. Environ Microbiol. - 1993. - Vol. 59. - P. 867–873.
18. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response / S. Boussiba // Physiol. plant. - 2000. - N 108. - P. 111–117.
19. Orosa M. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions / M. Orosa, J. F. Valero, C. Herrero [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2001. Vol. 23. P. 1079–1085.
20. Lemoine Y. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress / Y. Lemoine, B. Schoefs // Photosynth. Res. - 2010. - Vol. 106. - P. 155–177.
21. Ma R.Y. Enhanced production of free trans-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococcum* sp. / R. Y. Ma, F. Chen // Proc. Biochem. - 2001. - Vol. 36. - P. 1175–1179.
22. Hanagata N. Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* Chlorophyceae, Chlorophyta) / N. Hanagata, Z. Dubinsky // J. Phycol. - 1999. - Vol. 35. - P. 960–966.
23. Abe K. Characteristics of growth and carotenoid accumulation of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* in liquid culture / K. Abe, H. Mihara, M. Hirano // J. Mar. Biotechnol. - 1998. - N. 6. -P. 53–58.
24. Ben-Amotz A. Accumulation of b-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of b-carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) / A. Ben-Amotz, M. Kaztz., M. Avron // J. Phycol. - 1982. - Vol. 18. - P. 529– 537.
25. Кейтс М. Техника липидологии: Выделение, анализ и идентификация липидов. / М. Кейтс // М.: Мир - 1975. - 322 с.
26. Carlsson A. S. Micro- and macro-algae: Utility for industrial applications / A. Carlsson, J. B. van Beilen, R. Möller [et al.] //Outputs from EPOBIO project. Chippenham: CPL Press/ -2007. - P.86

Челебиева Э.С. Особенности вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. в условиях двухстадийной накопительной культуры / Челебиева Э.С., Минюк Г.С., Чубчикова И.Н. // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 175-187. Приведены новые данные, характеризующие морфометрические, физиолого-биохимические и продукционные характеристики зелёной микроводоросли *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. в условиях двухстадийной накопительной культуры. Выявлены специфические особенности адаптивного ответа водоросли на индукцию вторичного каротиногенеза с применением ацетата натрия: высокая выживаемость клеток, существенное увеличение их объёмов, необычный состав вторичных каротиноидов с доминированием β -каротина и свободных гидроксикетокаротиноидов, высокое содержание липидов в биомассе.

Ключевые слова: вторичный каротиногенез, астаксантин, β -каротин, липиды, *Scenedesmus rubescens*.

FEATURES OF SECONDARY CAROTENOGENESIS IN A GREEN MICROALGAE *SCENEDESMUS RUBESCENS* (DANGEARD) KESSLER ET AL. UNDER TWO-STAGE BATCH CULTURE

Chelebieva E., Minyuk G., Chubchikova I.

*The A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas NAS of Ukraine, Sevastopol, Ukraine
E-mail: elina.chelebieva@gmail.com*

Many green microalgae have ability to accumulate under stressful environments a potent antioxidant, astaxanthin, having nutraceutical and pharmacological applications, as pigmentation source in farmed salmon, trout and poultry industries. Secondary carotenoid formation can be influenced by nitrogen-limitation, strong light intensity, pH, salinity and some organic nutrients. The aim of this work was to study morphological, physiological and biochemical characteristics of green algae *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. during «red» stage of two-stage batch culture. Cell number and cell size, total carotenoid content, secondary carotenoid composition, content of dry biomass and lipids in cells and cultures of *S. rubescens* are evaluated. The specific features of algae adaptive response to induction of secondary carotenogenesis using of sodium acetate (NaAc) are shown. In contrast to the *Haematococcus pluvialis*, the drastic changes of the complex cultivation parameters have revealed high stress resistance in *S. rubescens* cultures. As a result, the number of cells in cultures in control and the version with NaAc remained unchanged, but the average cell volumes increased by 2.6 times in control, and in the presence of NaAc - 3.4 times. A specific feature of *S. rubescens* is unusual composition of the secondary carotenoids by dominance β -carotene and free hydroxyketocarotenoids. Of particular note are the facts of a high lipid output from a liter of initial culture ($253,59 \pm 18,85 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ in control and $329,25 \pm 10,69 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ with NaAc) and high enough lipid content in the final biomass (of $41,89 \pm 4,20 \%$ DW in control and $48,36 \pm 1,66 \%$ DW with NaAc) These facts indicate the advisability of terrestrial green algae screening as potential source of vegetable oils rich in natural carotenoids.

Keywords: secondary carotenogenesis, β -carotene, astaxanthin, adonixanthin, *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al.

References

1. Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Chubchikova I.N., Dantsyuk N.V., Chelebieva E.S. Screening of green microalgae as potential source of nature ketocarotenoids. The relevance, strategy and study approach, *Ekologiya morya : Algae biotechnology*, special issue **80**, 67 (2010).
2. Kostikov I.Yu., Romanenko P.A., Demchenko E.N., Darienko T.M., Mihailuk T.I., Rybchynsky O.V., Solonenko A.M. *Algae in Soils of Ukraine: History and Methods of Studies, System, and List of the Algal Flora* (Fitosotsiotsentr, Kiev, 2001).
3. Chubchikova I.N. Effect of medium composition on the content of secondary carotenoids in microalgae *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae), *Marine Ecological Journal*, **XI** (4), 95 (2012).
4. Chubchikova I.N., Drobetskaya I.V., Minyuk G.S., Dantsyuk N.V., Chelebieva E.S. Screening of green microalgae as potential source of nature ketocarotenoids. 2. Features of growth and secondary carotenogenesis in the representatives of the genus *Bracteacoccus* (Chlorophyceae), *Marine Ecological Journal*, **X** (1), 91 (2011).

5. Chubchikova I.N., Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Dantsyuk N.V. Chlorococcal microalgae as source of natural secondary carotenoids, *Ekologiya morya*, **77**, 77 (2009).
6. Chubchikova I. N., Minyuk G. S., Drobetskaya I. V. Secondary carotenogenesis in green microalgae *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. under natural insolation and temperature, *Ekologiya morya*, special issue **81**, 77 (2010).
7. Chu F. L., Pirastru L., Popovic R., Sleno L. Carotenogenesis up-regulation in *Scenedesmus* sp. using a targeted metabolomics approach by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 3004 (2011).
8. Pirastru L., Darwish M., Chu F.L., Perreault F., Sirois L. Sleno L., Popovic R. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment, *J. Appl. Phycol.*, **24**, 117 (2012).
9. *Catalogue of Microalgal Cultures in the Collections of the USSR*, Semenenko, V.E., Ed., (Moscow: Akad. Nauk SSSR, 1991).
10. Chelebieva E. S., Skrebovskaya S. V. *Scenedesmus rubescens* (Chlorophyta) morphological and molecular phylogenetic studies, *Scientific Notes of Taurida National V. I. Vernadsky University Series : "Biology, chemistry"*, **26 (65)**, **2**, 189 (2013).
11. Marie D., Simon N., Vaultot D. *Phytoplankton cell counting by flow cytometry. Algal Culturing Techniques*. (Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005).
12. Chelebieva E.S., Minyuk G.S., Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N. Dynamics of chemical composition of *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) under experimental induction of secondary carotenogenesis, *Marine Ecological Journal*, **XII (3)**, 75 (2013).
13. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes, *Methods Enzym.* **148**, 350 (1987).
14. Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N., Borovkov A. B., Minyuk G. S. Determination of astaxanthin and cantaxanthin content of green microalgae by thin layer chromatography method, *Ekologiya morya*, **79**, 50 (2009).
15. Ahlgren G., Merino L. Lipid analysis of freshwater microalgae: A method study, *Arch. Hydrobiol.*, **121 (3)**, 295 (1991).
16. Dantsyuk N. V. Effect of sodium acetate on intensity of secondary carotenogenesis of green microalgae *Haematococcus pluvialis*, *Ekologiya morya : Algae biotechnology*, special issue **80**, 44 (2010).
17. Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green alga *Haematococcus pluvialis*, *Appl. Environ Microbiol.*, **59**, 867 (1993)
18. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response, *Physiol. plant.*, **108**, 111 (2000).
19. Orosa M., Valero J.F., Herrero C., Abalde J. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions, *Biotechnol. Lett.*, **23**, 1079 (2001).
20. Lemoine Y., Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress, *Photosynth. Res.*, **106**, 155 (2010).
21. Ma R.Y., Chen F. Enhanced production of free *trans*-astaxanthin by oxidative stress in the cultures of the green microalga *Chlorococum* sp., *Proc. Biochem.*, **36**, 1175 (2001).
22. Hanagata N, Dubinsky Z. Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* Chlorophyceae, Chlorophyta), *J. Phycol.*, **35**, 960 (1999).
23. Abe K., Mihara H., Hirano M. Characteristics of growth and carotenoid accumulation of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* in liquid culture, *J. Mar. Biotechnol.*, **6**, 53 (1998).
24. Ben-Amotz A., Kaztz. M., Avron M. Accumulation of *b*-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of *b*-carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, **218**, 529 (1982).
25. Cates M. *Techniques of Lipidology*, (Elsevier, New York, 1972).
26. Carlsson, A., van Beilen, J. B., Möller, R., Clayton, D. *Micro- and macro-algae: Utility for industrial applications*, Outputs from EPOBIO project. (Chippenham: CPL Press, 2007).

Поступила в редакцію 25.11.2013 г.