

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 581.1
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-7-15>

Поступила в редакцию 05.09.2019
 Received 05.09.2019

**Н. Г. Аверина, Н. В. Козел, Р. А. Щербаков, М. С. Радюк, Е. Е. Мананкина,
 Р. Г. Гончарик, Н. В. Шальго**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*, СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ, АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И АСТАКСАНТИНА

Аннотация. Изучено влияние этанола (0,1; 0,3 и 1,6 %) на содержание фотосинтетических пигментов, астаксантина и активных форм кислорода (АФК) в *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*, штамм IBCE H-17), а также на продуктивность водоросли по показателю сухой биомассы. Установлено, что в изученных концентрациях этанол стимулировал накопление сухой биомассы в течение 3, 7 и 12 сут выращивания в среднем в 2 раза. При всех используемых концентрациях этанола количество клеток увеличивалось. Так, при использовании 0,3 % этанола количество клеток гематококка возросло в 2,1; 2,5 и в 3,3 раза по сравнению с их уровнем в контрольной культуре на 3-и, 7-е и 15-е сутки выращивания. При этом отмечена тенденция к уменьшению их размеров. Этанол стимулировал также накопление фотосинтетических пигментов. Так, через 3 сут инкубации в растворе, содержащем 0,1 и 0,3 % этанола, содержание хлорофилла (Хл) *a* составило 142 и 130 % от контроля, Хл *b* – 126 и 115, лютеина – 151 и 132 % соответственно. Максимальный эффект отмечен для β-каротина – 177 и 157 % по сравнению с контролем. Стрессовые условия, создаваемые этанолом, привели к генерации АФК. В частности, через 7 сут инкубации при использовании 0,1; 0,3 и 1,6 % этанола количество АФК составило 114, 141 и 179 % от контроля, а через 12 сут инкубации – 130, 165 и 183 % соответственно. Отмечено существенное положительное влияние этанола на содержание астаксантина. Так, через 7 сут инкубации содержание астаксантина при использовании 0,1; 0,3 и 1,6 % этанола возросло в 3,6; 4,9 и 4,6 раза соответственно, а через 12 сут – в 8,6; 6,6 и 7,7 раза по сравнению с контролем. Результаты указывают на огромный потенциал использования этанола как в качестве эффективного индуктора накопления астаксантина в клетках гематококка, так и в качестве активного стимулятора продуктивности водоросли.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*, сухой вес, количество и размер клеток, фотосинтетические пигменты, активные формы кислорода, астаксантин, этанол

Для цитирования: Влияние этанола на продуктивность *Haematococcus pluvialis*, содержание фотосинтетических пигментов, активных форм кислорода и астаксантина / Н. Г. Аверина [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 1. – С. 7–15. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-7-15>

**Nataliya G. Averina, Nikolai V. Kozel, Rostislav A. Shcherbakov, Mechislav S. Radyuk,
 Elena E. Manankina, Ruslan G. Goncharik, Nikolai V. Shalygo**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF ETHANOL ON THE PRODUCTIVITY OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*, CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS, REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ASTAXANTIN

Abstract. The effect of ethanol (0.1, 0.3, and 1.6 %) on the content of photosynthetic pigments, astaxanthin, and reactive oxygen species (ROS) in *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*, strain IBCE H-17), as well as on algae productivity, was studied in terms of dry biomass. Ethanol was found to stimulate in the studied concentrations the accumulation of dry biomass for 3, 7, and 12 days of cultivation on average 2 times. At all used ethanol concentrations, the number of cells increased. So, when using 0.3 % ethanol, the number of cells increased by 2.1; 2.5 and 3.3 times compared with the control culture on days 3, 7 and 15 of haematococcus cell growth. At the same time, a tendency toward a decrease in their size was noted. Ethanol also stimulated the accumulation of photosynthetic pigments. So, after 3 days of incubation in a solution containing 0.1 and 0.3 % ethanol, the content of chlorophyll (Chl) *a* was 142 and 130 % of that in the control, respectively, Chl *b* – 126 and 115 %, lutein – 151 and 132 %. The maximum effect was noted for β-carotene – 177 and 157 % compared with the control. The stress conditions created by ethanol led to the generation of ROS, in particular, after 7 days of incubation using 0.1; 0.3 and 1.6 % ethanol, the amount of ROS was 114, 141 and 179 % of that in the control, and after 12 days of incubation, 130, 165 and 183 %, respectively. A significant positive effect of ethanol on the content of astaxanthin was noted. So, after 7 days of incubation, the content of astaxanthin in options of 0.1; 0.3 and 1.6 % increased by 3.6; 4.9 and 4.6 times, respectively, and after 12 days – 8.6; 6.6 and 7.7 times compared with the control. The results indicate the enormous potential of using

ethanol as an effective inducer of astaxanthin accumulation in haematococcus cells, as well as an active stimulator of algal productivity.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, dry weight, number and size of cells, photosynthetic pigments, reactive oxygen species, astaxanthin, ethanol

For citation: Averina N. G., Kozel N. V., Shcherbakov R. A., Radyuk M. S., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Influence of ethanol on the productivity of *Haematococcus pluvialis*, content of photosynthetic pigments, reactive oxygen species and astaxanthin. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 1, pp. 7–15 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-7-15>

Введение. Астаксантин – красный пигмент, широко используемый в сельском хозяйстве, пищевой, фармакологической промышленности, а также в косметологии благодаря его чрезвычайно высокой антиоксидантной активности, которая в определенных условиях значительно превышает таковую β -каротина и витамина Е [1, 2]. В клетках *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) содержание астаксантина составляет от 2 до 5 % от сухой массы водоросли [3, 4]. Химически синтезированный искусственный астаксантин, представляющий смесь из трех стереоизомеров, отличается от натурального структурно и обладает гораздо меньшей биоактивностью, чем натуральный пигмент [5–7]. В последние годы интерес к *H. pluvialis* значительно возрос, что связано с его промышленным производством, а также с поиском способов увеличения общей продуктивности и выхода астаксантина. Использование света высокой интенсивности, добавление в культуральную среду NaCl, а также истощение азота, железа или фосфата в среде выращивания ряда водорослей индуцирует в клетках *Scenedesmus*, *Chlorella* и *H. pluvialis* накопление астаксантина [8–15]. В единичной публикации [16] отмечено, что выращивание клеток водоросли *H. pluvialis* в среде, содержащей 3 % этанола, приводило к увеличению продукции астаксантина в 2 раза по сравнению с таковой в контрольной культуре. Штамм ИВСЕ Н-17 *H. pluvialis* из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси не был изучен на предмет индукции накопления астаксантина в условиях избыточного содержания этанола в среде выращивания.

Цель данной работы – изучение возможности применения низких концентраций этанола (0,1; 0,3 и 1,6 %) при выращивании водоросли *H. pluvialis* (штамм ИВСЕ Н-17) с целью повышения выхода астаксантина, оценка продуктивности гематококка по показателям сухого веса, количеству и размеру клеток, содержанию фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a*, *b* и каротиноидов), а также анализ общего уровня активных форм кислорода.

Объекты и методы исследования. Объектом исследований служила альгологически чистая культура одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм ИВСЕ Н-17, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [17]. Клетки гематококка (эллипсоидной или удлинённо-яйцевидной формы, с гладкой оболочкой и двумя жгутиками) стерильно пересевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ВВМ, подращивали на свету в течение 5–7 сут при температуре 23 ± 2 °С, после чего смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика и выращивали в накопительном режиме при освещении светом люминесцентных ламп Philips TD-36/765, освещенности 20 мкмоль фотонов на $1 \text{ м}^2/\text{с}$ и режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре в световом периоде 23 ± 2 °С, как описано в работе [18]. Через 4 сут выращивания суспензию гематококка, находящуюся на стадии активного роста и содержащую около 80 % подвижных клеток, использовали в экспериментах. На этой стадии в суспензию водорослей с оптической плотностью (ОП) 0,3–0,4 при 560 нм добавляли этанол, таким образом, чтобы его конечная концентрация в суспензии составляла 0 (контроль); 0,1; 0,3 и 1,6 %. В этих условиях водоросль культивировали в течение 12 сут, периодически подвергая анализу.

Количество клеток в культуре водоросли оценивали при помощи камеры Горяева и построения калибровочной кривой, как это описано в работе [18]. Диаметр клеток гематококка определяли, проведя предварительную калибровку, с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2, используя программное обеспечение NIS-Elements Advanced Solutions v. 4.40 (Nikon, Япония).

Продуктивность *H. pluvialis* определяли по изменению сухой биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензий водоросли в красной и инфракрасной областях спектра при 680 и 750 нм на спектрофотометре Solar PB-2201 (Беларусь). Поглощение при 680 нм соответствует максимуму поглощения хлорофилла (Хл), а поглощение при 750 нм определяется в основном светорассеянием на клетках гематококка. Для количественного расчета сухой биомассы *H. pluvialis* использовали формулу, описанную Tomohisa Katsuda с соавт. в работе [15].

Качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов в клетках водоросли оценивали с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), содержание Хл и каротиноидов в образцах – с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия). Экстракцию, разделение и идентификацию пигментов осуществляли, как это описано в работе [18]. Содержание Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов оценивали в мкг/г сухой массы либо на 1 л суспензии.

Для определения содержания АФК промытую и осажденную путем центрифугирования (центрифуга Sigma 1-15К) сырую биомассу *H. pluvialis* (100 мг) растирали в жидком азоте и экстрагировали 1 мл 10 мМ трис-НСl, рН 7,2, затем центрифугировали 20 мин при 12 000 g на холоде. К 100 мкл супернатанта добавляли 900 мкл 10 мМ трис-НСl, рН 7,2, и 10 мкл 1 мМ раствора ди-ацетата дихлорфлуоресцеина в диметилсульфоксиде. Пробы инкубировали в темноте в течение 10 мин, после чего регистрировали интенсивность флуоресценции при 524 нм и возбуждающем свете 496 нм на спектрофлуориметре Solar RB (Беларусь). По калибровочной кривой определяли содержание АФК в образцах, как описано в работе [19].

Количество астаксантина в клетках гематококка определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония). Для этого клетки гематококка осаждали на центрифуге при 12 000 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в 4 н НСl, нагревали суспензию при 70 °С в течение 5 мин, после чего ее центрифугировали при той же скорости и дважды промывали осадок 2 мл дистиллированной воды. После каждой промывки суспензию центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин. Промытый осадок ресуспендировали в 0,5 мл метанола, экстрагировали пигменты при встряхивании 30 мин на шейкере и центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин. Процедуру экстрагирования пигментов в 0,5 мл метанола повторяли еще раз. К 1,0 мл суммарного экстракта добавляли 20 мкл 1 М КОН и оставляли в темноте на 6 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт использовали для хроматографии. Перед хроматографией супернатант еще раз центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 g. Далее в вials для хроматографии вносили по 0,5 мл супернатанта (объем инъекции – 20 мкл) и помещали их в камеру хроматографа. Разделение пигментов в колонке производили со скоростью 0,5 мл/мин с использованием растворов А (90 % ацетонитрила, 9,9 % дистиллированной воды и 0,1 % триэтиламина) и В (100 % этилацетата). Пигменты регистрировали с помощью детектора с диодной матрицей по спектрам поглощения в диапазоне 200–800 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 475 нм. Площади пиков хроматограммы использовали для количественного определения пигментов [7, 20].

В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее, стандартное отклонение среднего, достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$) и данного числа степеней свободы. Представлены результаты 6 опытов, проведенных в двукратной биологической повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2010, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [21].

Результаты и их обсуждение. В качестве индуктора накопления астаксантина и других фотосинтетических пигментов использовали этанол. Наиболее оптимальными его концентрациями оказались 0,1; 0,3 и 1,6 %. Более высокая концентрация этанола (3,2 %) в среде выращивания уже на 3-и сутки вызывала появление белых хлопьев, а при использовании концентрации 11,7 % клетки водоросли полностью разрушались.

Оптическая плотность суспензии водоросли при 680 нм, позволяющая ориентировочно оценивать содержание хлорофилловых пигментов в культуре, значительно увеличивалась на 3-и, 7-е и 12-е сутки

инкубации по сравнению с контролем (табл. 1). Визуально суспензии опытных образцов также окрашивались в более зеленый цвет, чем в контрольной культуре, что позволяло количественно оценить содержание хлорофилла по спектрам поглощения экстрактов клеток (рис. 1). Так, через 3 сут инкубации в растворе, содержащем 0,1 и 0,3 % этанола, содержание Хл *a* составило 142 и 130 % от контроля, Хл *b* – 126 и 115, лютеина – 151 и 132 % соответственно. Максимальный эффект отмечен для β -каротина – 177 и 157 % по сравнению с контролем (рис. 1). В одном из опытов содержание β -каротина на 3-и сутки выращивания составило 203 и 199 % от контроля.

Значительно (практически в 2 раза) возросло количество клеток при всех используемых концентрациях этанола (табл. 2). При этом отмечалась тенденция к уменьшению их диаметра (рис. 2). Так, на 12-е сутки инкубации культуры клеток в присутствии 0,1; 0,3 и 1,6 % этанола диаметр клеток в среднем составил 87, 90 и 92 % от контроля соответственно. По мере продолжения выращивания культуры клеток эта тенденция усиливалась.

Таблица 1. Влияние этанола на оптическую плотность при 680 нм (OP_{680}) и сухой вес водоросли *H. pluvialis*, выращиваемой в течение 7–12 сут

Table 1. Effect of ethanol on optical density at 680 nm (OD_{680}) and dry weight of *H. pluvialis* algae grown for 7–12 days

Время инкубации	Вариант опыта	OP_{680} (исходная – 0,432)	Сухой вес, мг/мл (исходный – 0,344)
3 сут	Контроль	0,511	0,442
	Этанол 0,1 %	1,153	0,982
	Этанол 0,3 %	1,094	0,928
	Этанол 1,6 %	0,937	0,863
7 сут	Контроль	0,532	0,516
	Этанол 0,1 %	1,062	1,020
	Этанол 0,3 %	1,492	1,224
	Этанол 1,6 %	1,390	1,171
12 сут	Контроль	0,587	0,670
	Этанол 0,1 %	0,720	1,365
	Этанол 0,3 %	1,367	1,527
	Этанол 1,6 %	1,362	1,057

Примечание. Показатели в контроле приняты за 100 %. Представлены средние значения по результатам 4 опытов. То же в табл. 2.

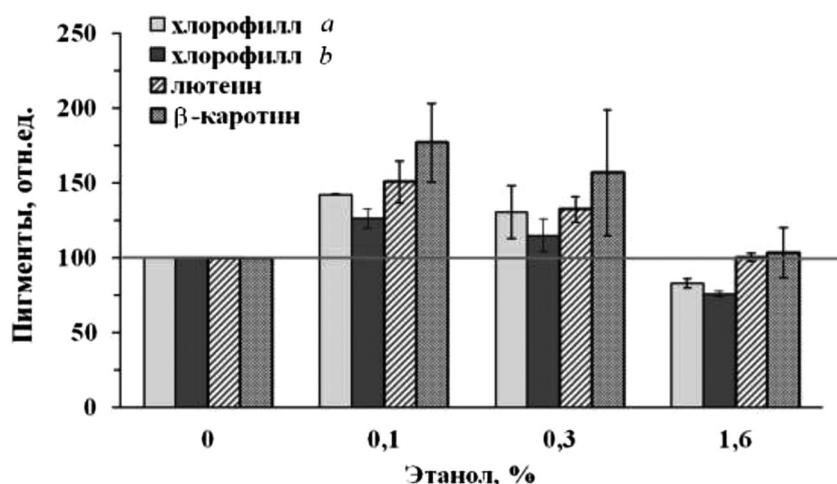
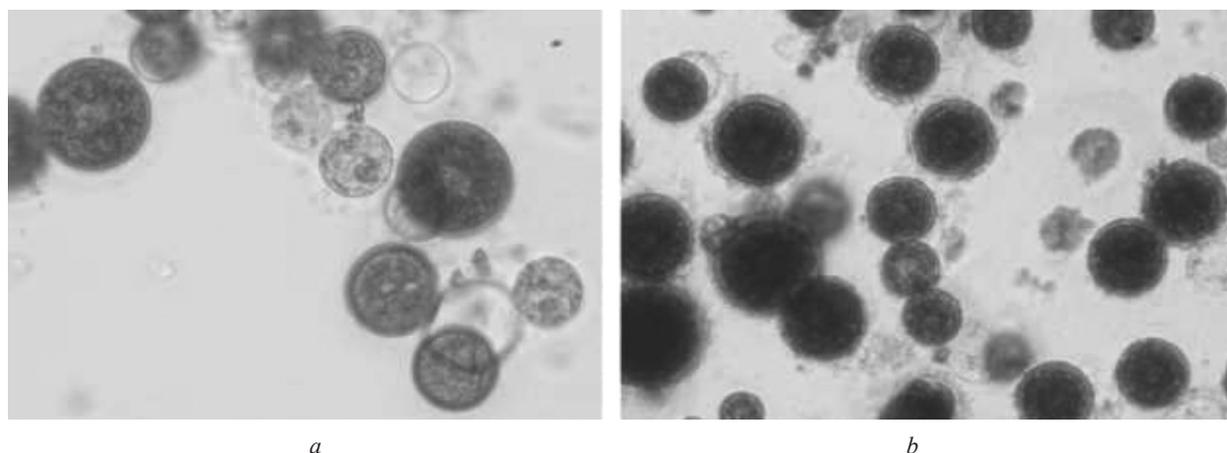


Рис. 1. Содержание Хл *a* и Хл *b*, каротиноидов в клетках водоросли *H. pluvialis* в контрольной и опытной культурах, выращиваемых в течение 3 сут на среде Рудика с добавлением этанола с конечной концентрацией в суспензии 0,1; 0,3 и 1,6 %. Линия на рисунке показывает содержание пигментов в контрольной культуре

Fig. 1. The content of chlorophylls *a* and *b*, carotenoids in *H. pluvialis* alga cells of the control and experimental cultures grown for 3 days on Rudik medium with the addition of ethanol with a final concentration in suspension 0.1; 0.3 and 1.6 %. The line in the figure shows the content of pigments in the control culture

Т а б л и ц а 2. Влияние этанола на диаметр и количество клеток водоросли *H. pluvialis*, выращиваемой в течение 7–15 сутТ а б л и ц а 2. Effect of ethanol on the diameter and number of cells of the *H. pluvialis* alga grown for 7–15 days

Время инкубации	Вариант опыта	К-во клеток		Диаметр клеток	
		тыс. кл/мл	%	мкм	%
7 сут	Контроль	160	100	19,76	100
	Этанол 0,1 %	320	200	18,97	96
	Этанол 0,3 %	342	214	19,87	100
	Этанол 1,6 %	352	220	21,20	107
12 сут	Контроль	182	100	23,61	100
	Этанол 0,1 %	346	190	20,51	87
	Этанол 0,3 %	454	249	21,28	90
	Этанол 1,6 %	289	159	21,75	92
15 сут	Контроль	106	100	27,18	100
	Этанол 0,1 %	–	–	–	–
	Этанол 0,3 %	353	333	17,93	66
	Этанол 1,6 %	120	113	19,56	72

Рис. 2. Клетки водоросли *H. pluvialis* в контрольной (а) и опытной (b, этанол 0,3 %) культурах, выращиваемых в течение 12 сут на среде РудикаFig. 2. Cells of *H. pluvialis* alga in control (a) and experimental (b, ethanol 0.3 %) cultures grown for 12 days in Rudik medium

В соответствии с возрастанием числа клеток значительно повысилась и продуктивность культуры при оценке сухого веса. Так, при всех используемых концентрациях этанола сухой вес увеличился в среднем в 2 раза. В табл. 1 представлена динамика изменения сухой биомассы гематококка в контрольной культуре и в условиях выращивания водоросли в суспензии с добавлением этанола.

В клетках гематококка возросло и общее содержание активных форм кислорода (АФК). Через 7 сут инкубации при использовании 0,1; 0,3 и 1,6 % этанола количество АФК составило 114, 141 и 179 % от контроля, а через 12 сут инкубации – 130, 165 и 183 % соответственно, что свидетельствует об индуцированном этанолом стрессе. На рис. 3 представлены результаты индивидуального опыта, демонстрирующего повышенное содержание АФК при добавлении разных концентраций этанола.

В соответствии с повышенным содержанием АФК возросло и содержание астаксантина (клетки приобрели коричневую окраску) (рис. 2). Через 7 сут инкубации содержание астаксантина при добавлении 0,1; 0,3 и 1,6 % этанола возросло в 3,6; 4,9 и 4,6 раза соответственно, а через 12 сут – в 8,6; 6,6 и 7,7 раза по сравнению с контролем (рис. 4).

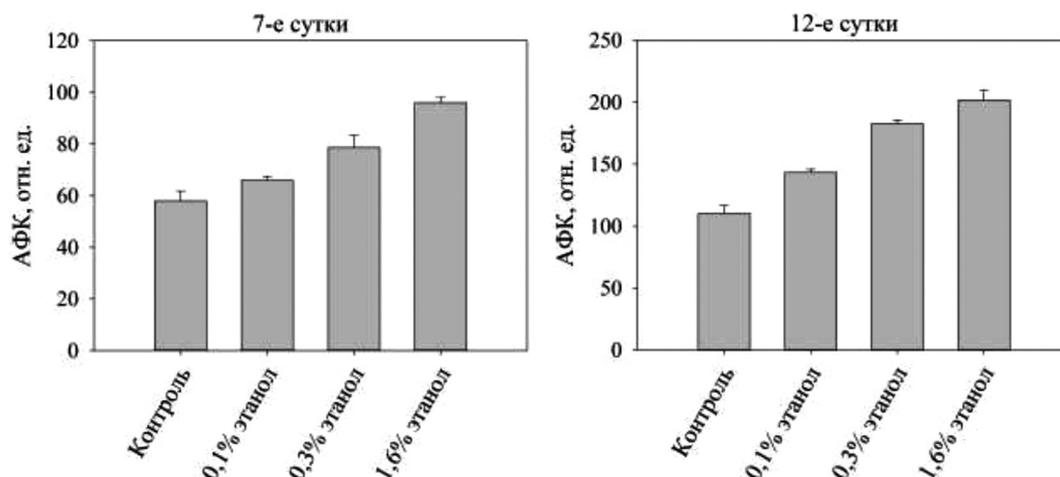


Рис. 3. Содержание АФК в клетках водоросли *H. pluvialis* в контрольной и опытной культурах, выращиваемых в течение 7 и 12 сут на среде Рудика с добавлением этанола (0,1; 0,3 и 1,6 %)

Fig. 3. Reactive oxygen species (ROS) content in *H. pluvialis* alga cells of the control and experimental cultures grown for 7 and 12 days in Rudik medium with ethanol (0.1; 0.3 and 1.6 %)

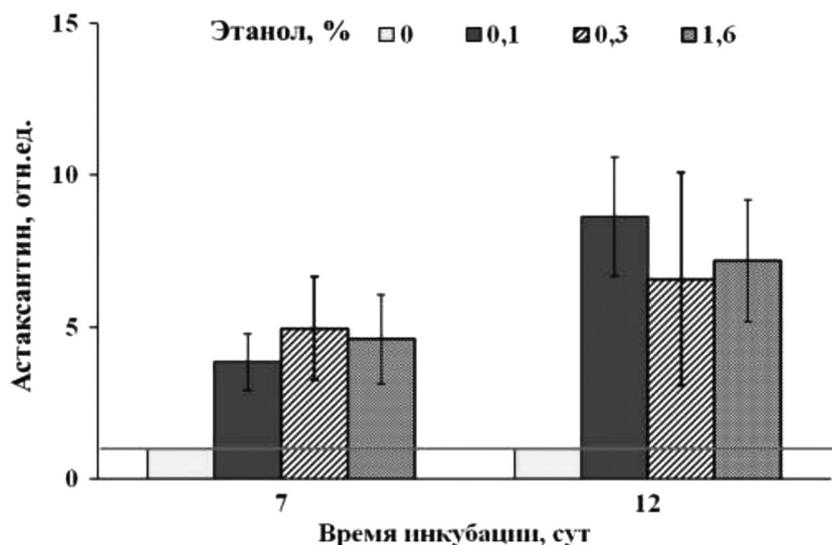


Рис. 4. Содержание астаксантина в клетках водоросли *H. pluvialis* в контрольной и опытных культурах, выращиваемых в течение 7 и 12 сут на среде Рудика с добавлением этанола (0,1; 0,3 и 1,6 %). Линия на рисунке показывает содержание пигментов в контрольной культуре

Fig. 4. Astaxanthin content in the *H. pluvialis* algae cells of the control and experimental cultures grown for 7 and 12 days in Rudik medium with the addition of ethanol (0.1; 0.3 and 1.6 %). The line in the figure shows the content of pigments in the control culture

Заклучение. Таким образом, выращивание культуры клеток водоросли гематококка в присутствии 0,1; 0,3 и 1,6 % этанола стимулировало деление клеток и накопление сухой биомассы, повышало в клетках содержание фотосинтетических пигментов – Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов в течение 3–15 сут выращивания. При этом возрастание внутриклеточного уровня АФК свидетельствовало о повышении окислительного потенциала и приводило к увеличению содержания накопленного астаксантина. В работе Z. Wen с соавт. [16] отмечено, что при выращивании культуры клеток *H. pluvialis* в присутствии 3 % этанола содержание астаксантина возрастало в 2 раза по сравнению с контролем и достигало 11,26 мг/л суспензии. Авторы отметили повышение экспрессии гена изопентенилдифосфат (IPP)-изомеразы (*ipi*) – фермента, катализирующего образование диметилаллилдифосфата (DMAPP) из IPP. Последующая конденсация этих двух веществ приводит к образованию C₁₀-соединения – геранилдифосфата, являющегося источником всех изопренои-

дов (терпеноидов), в том числе и каротиноидов. Таким образом, предполагается, что одним из механизмов действия этанола является активация первичных реакций ацетатно-мелавонатного пути биосинтеза изопреноидов, ведущего к образованию астаксантина. В целом полученные результаты указывают на то, что этанол имеет огромный потенциал для использования как в качестве эффективного индуктора накопления астаксантина в клетках гематококка, так и в качестве активного стимулятора продуктивности водоросли.

Список использованных источников

1. Shimidzu, N. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms / N. Shimidzu, M. Goto, W. Miki // *Fisheries Science*. – 1996. – Vol. 62, N 1. – P. 134–137. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.134>
2. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition / G. Hussein [et al.] // *J. Nat. Products*. – 2006. – Vol. 69, N 3. – P. 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354>
3. Johnson, E. A. Microbial carotenoids / E. A. Johnson, W. A. Schroeder // *Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids* / ed. A. Fiechter. – Berlin, 1995. – P. 119–178.
4. Krishna, K. B. Secondary carotenoid production in green algae / K. B. Krishna, P. Mohanty // *J. Sci. Industr. Res.* – 1998. – Vol. 57. – P. 51–63.
5. Guerin, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition / M. Guerin, M. E. Huntley, M. Olazola // *Trends Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, N 5. – P. 210–216. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)
6. Higuera-Ciajara, I. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications / I. Higuera-Ciajara, L. Félix-Valenzuela, F. Goycoolea // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2006. – Vol. 46, N 2. – P. 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
7. Yuan, J.-P. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection / J.-P. Yuan, F. Chen // *Biotechnol. Techniques*. – 1997. – Vol. 11, N 7. – P. 455–459. <https://doi.org/10.1023/A:1018441411746>
8. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions / A. Cifuentes [et al.] // *Biol. Res.* – 2003. – Vol. 36, N 3–4. – P. 343–357. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602003000300006>
9. Aburai, N. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) / N. Aburai, D. Sumida, K. Abe // *Algal Res.* – 2015. – Vol. 8. – P. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.005>
10. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae) / Y. Li [et al.] // *J. Phycol.* – 2009. – Vol. 45, N 3. – P. 635–641. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x>
11. He, P. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters / P. He, J. Duncan, J. Barber // *J. Integr. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 49, N 4. – P. 447–451. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00468.x>
12. Study on the effect of salt concentration on growth and astaxanthin accumulation of microalga *Haematococcus pluvialis* as the initial basis for two phase culture of astaxanthin production / L.T. Tam [et al.] // *Tap Chi Sinh Hoc.* – 2012. – Vol. 34, N 2. – P. 964. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v34n2.964>
13. Kobayashi, M. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress / M. Kobayashi, Y. Kurimura, Y. Tsuji // *Biotechnol. Lett.* – 1997. – Vol. 19, N 6. – P. 507–509.
14. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions / B. Cordero [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 1996. – Vol. 18, N 2. – P. 213–218. <https://doi.org/10.1007/BF00128682>
15. Effect of flashing light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* / T. Katsuda [et al.] // *J. Biosci. Bioeng.* – 2006. – Vol. 102, N 5. – P. 442–446. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.442>
16. Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* / Z. Wen [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.010>
17. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 101 с.
18. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на продуктивность и пигментный состав водоросли *Haematococcus pluvialis* / Н. Г. Аверина [и др.] // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 4. – С. 21–32.
19. Jambunathan, N. Determination and detection of reactive oxygen Species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants / N. Jambunathan // *Plant stress tolerance. Methods and protocols* / ed. R. Sunkar. – London ; N. Y., 2010. – P. 291–297.
20. Yuan, J.-P. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification / J.-P. Yuan, F. Chen // *J. Agric. Food Chem.* – 1999. – Vol. 47, N 1. – P. 31–35. <https://doi.org/10.1021/jf980465x>
21. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – 3-е изд., испр. – Минск : Вышэйш. шк., 1973. – 318 с.

References

1. Shimidzu N., Goto M., Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*, 1996, vol. 62, no. 1, pp. 134–137. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.134>
2. Hussein G., Sankava U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 2006, vol. 69, no. 3, pp. 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354>

3. Johnson E. A., Schroeder W. A. Microbial carotenoids. *Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids*. Berlin, Springer, 1995, pp. 119–178.
4. Krishna K. B., Mohanty P. Secondary carotenoid production in green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 1998, vol. 57, pp. 51–63.
5. Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. Review. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnology*, 2003, vol. 21, no. 5, pp. 210–216. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)
6. Higuera-Ciajara I., Félix-Valenzuela L., Goycoolea F. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, vol. 46, no. 2, pp. 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
7. Yuan J.-P., Chen F. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques*, 1997, vol. 11, no. 7, pp. 455–459. <https://doi.org/10.1023/A:1018441411746>
8. Cifuentes A., González M., Vargas S., Hoeneisen M., González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 2003, vol. 36, no. 3–4, pp. 343–357. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602003000300006>
9. Aburai N., Sumida D., Abe K. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). *Algal Research*, 2015, vol. 8, pp. 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.005>
10. Li Y., Huang J., Sandmann G., Chen F. High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 2009, vol. 45, no. 3, pp. 635–641. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x>
11. He P., Duncan J., Barber J. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, vol. 49, no. 4, pp. 447–451. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00468.x>
12. Tam L. T., Hoang D. D., Mai D. T. N., Thu N. T. H., Anh H. T. L., Hong D. D. Study on the effect of salt concentration on growth and astaxanthin accumulation of microalga *Haematococcus pluvialis* as the initial basis for two phase culture of astaxanthin production. *Tap Chi Sinh Hoc*, 2012, vol. 34, no. 2, p. 964. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v34n2.964>
13. Kobayashi M., Kurimura Y., Tsuji Y. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology Letters*, 1997, vol. 19, no. 6, pp. 507–509.
14. Cordero B., Otero A., Patiño M., Arredondo B. O., Fabregas J. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnology Letters*, 1996, vol. 18, no. 2, pp. 213–218. <https://doi.org/10.1007/BF00128682>
15. Katsuda T., Shimahara K., Shiraiishi H., Yamagami K., Ranjbar R., Katoh S. Effect of flashing light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2006, vol. 102, no. 5, pp. 442–446. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.442>
16. Wen Z., Liu Z., Hou Y., Liu C., Gao F., Zheng Y., Chen F. Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, vol. 78, pp. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.010>
17. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A., Shalygo N. V. *Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
18. Averina N. G., Kozel N. V., Shcherbakov R. A., Radyuk M. S., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Influence of 5-aminolevulinic acid on the production and pigment composition of algae *Haematococcus pluvialis*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 21–32 (in Russian).
19. Jambunathan N. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Plant stress tolerance. Methods and protocols*. London, New York, 2010, pp. 291–297.
20. Yuan J.-P., Chen F. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, no. 1, pp. 31–35. <https://doi.org/10.1021/jf980465x>
21. Rokitskii P. F. *Biological statistics. 3rd ed.* Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973, pp. 28–50 (in Russian).

Информация об авторах

Аверина Наталья Георгиевна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: averina_ng@tut.by

Козел Николай Владимирович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

Шербаков Ростислав Александрович – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sherbakov@ibp.org.by

Information about the authors

Nataliya G. Averina – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: averina_ng@tut.by

Nikolai V. Kozel – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

Rostislav A. Shcherbakov – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sherbakov@ibp.org.by

Радюк Мечислав Степанович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: radmes@mail.ru

Мананкина Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: room454@mail.ru

Гончарик Руслан Геннадьевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rusgon@mail.ru

Шалыго Николай Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shalygo@ibp.org.by

Mechislav S. Radyuk – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: radmes@mail.ru

Elena E. Manankina – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: room454@mail.ru

Ruslan G. Goncharik – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rusgon@mail.ru

Nikolai V. Shalygo – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Assistant Professor. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shalygo@ibp.org.by