

**Н. В. Шалыго**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

## **ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛИ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ДЕФИЦИТНЫХ ПО БИОГЕННЫМ ЭЛЕМЕНТАМ СРЕДАХ**

**Аннотация.** В клетках микроводоросли *Haematococcus pluvialis* (штамм IBCE H-17) изучено накопление каротиноидов (каротиногенез) при их культивировании на питательных средах, дефицитных по биогенным элементам – азоту (N) и калию совместно с фосфором (K + P). Показано, что при выращивании гематококка на среде, дефицитной по K + P, к 18-м суткам культивирования в клетках водоросли в основном накапливались астаксантин и β-каротин. Далее по уровню накопления, превышающему контроль (полная питательная среда), по убывающей следовали антераксантин, зеаксантин и виолаксантин, в то время как количество неоксантина и лютеина находилось на уровне контрольных значений. Каротиногенез в таких условиях протекал на фоне высокого содержания хлорофилла (*a + b*), сопоставимого с его уровнем в контроле. Напротив, при использовании питательной среды, дефицитной по N, накопление каротиноидов в клетках гематококка проходило на фоне снижающегося количества хлорофилловых пигментов. При этом к 18-м суткам культивирования в клетках водоросли накапливался преимущественно астаксантин, в меньшей степени – β-каротин. Содержание лютеина, антераксантина, зеаксантина и виолаксантина было ниже контрольных значений, а количество неоксантина находилось на уровне контроля. В целом накопление астаксантина в условиях дефицита N было более эффективным по сравнению с контролем (в 4,3 и 1,8 раза соответственно), а также при использовании питательной среды, дефицитной по K + P.

**Ключевые слова:** *Haematococcus pluvialis*, каротиногенез, биогенные элементы, дефицит азота, дефицит калия и фосфора, фотосинтетические пигменты, астаксантин

**Для цитирования:** Шалыго, Н. В. Пигментный состав клеток микроводоросли *Haematococcus pluvialis* при культивировании на дефицитных по биогенным элементам средах / Н. В. Шалыго // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 163–170. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-163-170>

**Nikolai V. Shalygo**

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

## **THE PIGMENT COMPOSITION OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* MICROALGAE CELLS UPON CULTIVATED ON BIOGENIC-DEFICIENT MEDIA**

**Abstract.** The accumulation of carotenoids (carotenogenesis) in the cells of *Haematococcus pluvialis* (strain IBCE H-17) upon cultivation in nutrient media deficient in nutrient elements (N and K + P) is shown. K and P deficiency in nutrient medium led to accumulation of astaxanthin, β-carotene, anteraxanthin, zeaxanthin and violaxanthin after 18 days of cultivation, while the amount of neoxanthin and lutein was at the control level. Carotenogenesis under such conditions was accompanied by high levels of chlorophyll (*a + b*). The use of nutrient medium deficient in N led to the accumulation of astaxanthin and, to a lesser extent, β-carotene in haematococcus cells, while lutein, anteraxanthin, zeaxanthin, violaxanthin and neoxanthin levels were lower or the same as control. N deficiency caused the decrease in amount of chlorophyll (*a + b*). Nitrogen deficiency was 4.3 times more effective than control medium and 1.8 times more effective than combined potassium and phosphorus deficiency in promoting astaxanthin accumulation.

**Keywords:** *Haematococcus pluvialis*, carotenogenesis, biogenic elements, nitrogen deficiency, potassium and phosphorus deficiency, photosynthetic pigments, astaxanthin

**For citation:** Shalygo N. V. The pigment composition of *Haematococcus pluvialis* microalgae cells upon cultivated on biogenic-deficient media. *Vesti Natsyynal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 163–170 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-2-163-170>

**Введение.** Клетки зеленой одноклеточной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) на стадии активного роста имеют овальную форму, подвижны, окрашены в зеленый цвет и содержат пигменты: хлорофилл *a*, хлорофилл *b*, β-каротин, лютеин, неоксантин, виолаксантин, а также следовые количества зеаксантина и феофитина *a*. В неблагоприятных для роста и развития условиях

эти клетки сначала приобретают пальмеллоидную структуру, т. е. теряют жгутики, округляются и увеличиваются в размерах, а затем образуют окруженные многослойной оболочкой цисты (апланоспоры) [1]. Насыщенный красный цвет апланоспор обусловлен пигментом астаксантином, который аккумулируется в липидных везикулах преимущественно в виде эфиров с полиненасыщенными жирными кислотами и защищает клетки гематококка от окислительного стресса, вызванного действием стрессоров разной природы [2–7].

Астаксантин (3,3'-дигидрокси-4,4'-дикето- $\beta$ -каротин), являясь производным  $\beta$ -каротина, отличается от последнего наличием двух атомов кислорода (в виде гидроксила и кетогруппы) в каждом из двух иононовых колец, что придает ему уникальные свойства. На сегодняшний день астаксантин считается одним из наиболее сильных антиоксидантов. Он используется в пищевой и фармацевтической промышленности, а также в косметологии [8–11]. Астаксантин обладает ярко выраженным противовоспалительным действием, а также способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, что определяет эффективность его использования в прикладной медицине для профилактики и лечения заболеваний центральной нервной системы. В отличие от  $\beta$ -каротина, астаксантин не является провитамином А, поэтому норму его суточного потребления по медицинским показаниям можно увеличивать до 20 мг/сут, не опасаясь побочных явлений, характерных для высоких концентраций витамина А. Астаксантин является важным компонентом кормов в аквакультуре для лососевых рыб (форели, лосося, семги) и ракообразных (креветок, омаров, лобстеров). Именно астаксантин определяет нормальный метаморфоз личинок, окраску их мышечных тканей и наружных покровов, а следовательно, товарный вид, вкусовые качества и другие потребительские свойства продуктов. Астаксантин используется в кормовых добавках для пигментации яичных желтков кур. Он также может быть использован для улучшения цвета и увеличения срока хранения различных продуктов растительного и животного происхождения: молочной продукции, майонезов, кондитерских кремов [12].

Астаксантин содержат и другие водоросли, а также грибы, бактерии и высшие растения. Однако наиболее высокое содержание астаксантина (до 7 % от сырой биомассы) регистрируется у *H. pluvialis* при культивировании водоросли в стрессовых условиях, таких как свет высокой интенсивности [3], добавление NaCl или этанола в питательную среду [7, 13], дефицит макроэлементов (N + P) в питательной среде [3, 4]. Биотехнологические компании имеют в своих альгологических коллекциях штаммы *H. pluvialis* – продуценты астаксантина. В Республике Беларусь также имеется коллекция водорослей, которая находится в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Коллекция содержит *H. pluvialis*, штамм IBCE Н-17 [14]. Указанный штамм гематококка в качестве продуцента астаксантина практически не изучен.

Цель работы – изучить пигментный состав клеток *H. pluvialis* (штамм IBCE Н-17) при культивировании водоросли в условиях стресса, создаваемого дефицитом биогенных элементов (N, K + P), для получения биомассы, обогащенной астаксантином.

**Объекты и методы исследования.** В работе использовали водоросль *H. pluvialis* (штамм IBCE Н-17) из альгологической коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [14]. Посевной материал водоросли готовили, как описано в статье [15], и выращивали на среде Рудика при освещении люминесцентными лампами Philips TD-36/765, освещенности 2000 лк и режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре  $23 \pm 2$  °С в световом периоде. В процессе выращивания посевного материала суспензию водоросли продували воздухом с помощью компрессора для аквариумов (HAILEA – АСО-09903), подающего 4,2 л воздуха в минуту. Через 4 сут культивирования клетки гематококка осаждали путем центрифугирования, промывали дистиллированной водой, после чего использовали в опыте. Для этого клеточную массу ресуспендировали в среде Рудика (контроль) либо в среде Рудика, дефицитной по N или K + P (опыт), доводя содержание клеток до  $1,8 \cdot 10^5$  в 1 мл. Для приготовления дефицитной по N среды из нее исключали  $\text{NaNO}_3$ . Для приготовления питательной среды, дефицитной по K + P, из среды Рудика исключали  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Суспензию гематококка культивировали в указанном выше режиме без барботажки, перемешивая вручную через каждые 2 ч в световом периоде. Пробы для анализа отбирали на 9-е и 18-е сутки культивирования.

Содержание хлорофилла ( $a + b$ ) и каротиноидов в образцах оценивали с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа (Shimadzu Prominence LC 20, Япония) с колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey–Nagel (Германия). Экстракцию фотосинтетических пигментов из клеток водоросли осуществляли с помощью щелочного ацетона (100 % ацетона + 0,4 % водного  $\text{NH}_3$  в соотношении 9:1 по объему), как описано в работе [15]. Для разделения пигментов в хроматографической колонке использовали растворы А (90 % ацетонитрила, 9,9 %  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 % триэтиламина) и В (100 % этилацетата), скорость потока которых, согласно описанной в работе [16] программе, была 0,5 мл/мин. Объем инъекции составлял 20 мкл. Пигменты регистрировали спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония) в диапазоне 200–800 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм. Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы. Расчет содержания пигментов производили по формуле

$$C_{\text{пигм}} = S_{440} F_{\text{пигм}} V / V_{\text{инъекц}} m,$$

где  $C_{\text{пигм}}$  – содержание пигмента, мкг/г сухой массы;  $S_{440}$  – площадь пика поглощения при 440 нм;  $F_{\text{пигм}}$  – фактор (коэффициент) для расчета, полученный исходя из стандартов разделяемых веществ;  $V$  – объем супернатанта;  $V_{\text{инъекц}}$  – объем инъекции;  $m$  – масса навески, г.

Количество астаксантина в клетках гематококка определяли также с помощью хроматографии высокого давления. Для этого клетки гематококка осаждали при 12 000 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл 4 н HCl. Полученную суспензию нагревали при 70 °C в течение 5 мин, после чего центрифугировали при указанных выше условиях, а затем дважды промывали осадок 2 мл дистиллированной воды, чтобы удалить остатки кислоты. После каждой промывки суспензию центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин. Для извлечения пигментов промытый осадок ресуспендировали в 0,5 мл метанола, встряхивали в течение 30 мин на шейкере и центрифугировали при 12 000 g в течение 10 мин. Процедуру экстрагирования пигментов в 0,5 мл метанол повторяли еще раз. Для разрушения эфирных связей 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 проведения хроматографии. Объем инъекции составлял 20 мкл. Разделение пигментов в колонке производили так же, как описано выше для хлорофилла и каротиноидов. Пигменты регистрировали детектором с диодной матрицей по спектрам поглощения в диапазоне 200–800 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 475 нм. Площадь под пиком 475 нм хроматограммы использовали для количественного определения пигментов.

Количество клеток в суспензии водоросли оценивали при помощи камеры Горяева, используя микроскоп Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2 (Япония), и построенной калибровочной кривой, как это описано в работе [15].

В работе приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки, полученные в ходе трех независимых опытов.

**Результаты и их обсуждение.** Изменение пигментного состава клеток гематококка в опытных вариантах, особенно на дефицитной по N среде, становилось визуально заметным уже на 3-и сутки культивирования. На это указывало появление розово-красного оттенка окрашенной в зеленый цвет суспензии водоросли, что свидетельствовало об активации каротиногенеза. К 9-м суткам выращивания суспензия водоросли в контроле оставалась зеленой, но имела слегка розово-красный оттенок, который при дефиците K + P был более выражен, а при дефиците N суспензия приобретала отчетливый розово-красный цвет. К 18-м суткам культивирования суспензия гематококка контрольного и опытного вариантов (дефицит K + P) становилась оранжево-красной, а суспензия водоросли, культивируемой на дефицитной по N среде, имела насыщенный розово-красный цвет.

Количественный анализ пигментного состава показал, что содержание хлорофилла ( $a + b$ ) в клетках гематококка при дефиците N снижалось и через 9 и 18 сут культивирования составило

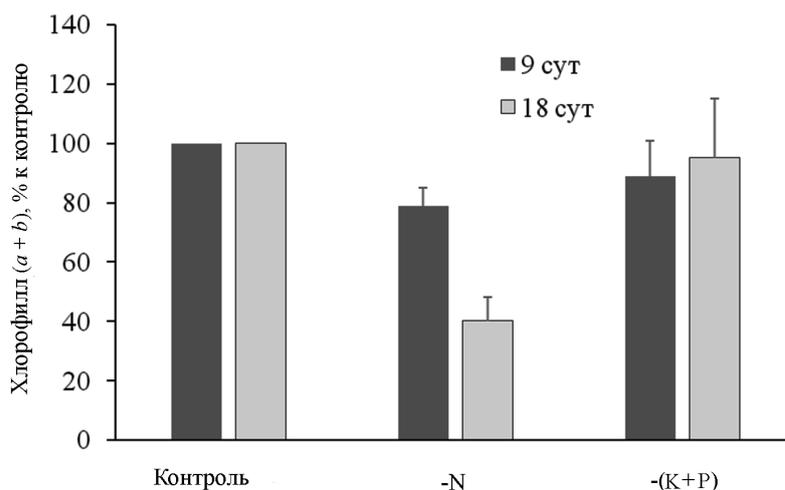


Рис. 1. Содержание хлорофилла ( $a + b$ ) в клетках гематококка при культивировании в течение 9 и 18 сут в полной питательной среде Рудика (контроль), в среде Рудика, дефицитной по азоту ( $-N$ ), а также по калию совместно с фосфором ( $-(K + P)$ )

Fig. 1. Chlorophyll ( $a + b$ ) content in haematococcus cells cultivated for 9 and 18 days in complete Rudic culture medium (control) and in Rudic media deficient in nitrogen ( $-N$ ) and potassium and phosphorus ( $-(K + P)$ )

79 и 40 % соответственно по сравнению с контролем. Напротив, количество хлорофилла ( $a + b$ ) в клетках водоросли, выращиваемой в течение 18 сут в дефицитной по  $K + P$  среде, достоверно не отличалось от контроля (рис. 1).

Выявленное снижение уровня хлорофилловых пигментов в клетках гематококка при культивировании в питательной среде, дефицитной по азоту, вполне объяснимо. Азот необходим для синтеза структурных белков фотосинтетического аппарата и ферментов, участвующих в биосинтезе хлорофилла, а в виде пиррола является неотъемлемой частью молекулы хлорофилла. Поэтому закономерно, что дефицит  $N$  в питательной среде приводит к снижению количества хлорофилла. Однако факт отсутствия снижения уровня хлорофилла ( $a + b$ ) в клетках гематококка при выращивании в среде, дефицитной по важным для растительной клетки биогенным элементам –  $K + P$ , заслуживает особого внимания. Аналогичная картина наблюдалась нами ранее в опытах с зеленой водорослью *Dunaliella salina* [17]. Так, установлено, что при выращивании дуналиеллы в течение 1 мес. на среде, дефицитной по  $K + P$ , содержание хлорофилла ( $a + b$ ) в ее клетках не снижалось, а превышало контрольные значения на 30 % и только при более длительном культивировании (в течение 2 мес.) фиксировалось резкое снижение количества хлорофилловых пигментов. Известно, что содержание калия в клетках растений существенно выше, чем других катионов, а фосфор запасается в растительных организмах в виде неорганических и органических фосфатов, поэтому клетки относительно длительное время не испытывают недостатка в этих биогенах [18]. Можно предположить, что создаваемый в наших опытах дефицит калия и фосфора, а также продолжительность культивирования гематококка не были критичными для процесса биосинтеза хлорофилла, а при более длительном выращивании водоросли на дефицитной по  $K + P$  среде могло бы быть зарегистрировано и снижение количества хлорофилла ( $a + b$ ).

Анализ каротиноидного комплекса позволил установить, что в варианте с использованием питательной среды, дефицитной по калию и фосфору, содержание астаксантина и  $\beta$ -каротина в 9-суточной культуре было близким к контролю, однако через 18 сут культивирования в таких условиях количество этих пигментов превысило контрольные значения в 2,2 и 2,4 раза соответственно (табл. 1, рис. 2). Содержание неоксантина и лютеина в клетках гематококка через 18 сут выращивания находилось на уровне контроля, а количество антераксантина, зеаксантина и виолаксантина превышало контрольные значения в 2,0; 1,5 и 1,3 раза соответственно.

При культивировании на питательной среде, дефицитной по азоту, клетки гематококка накапливали преимущественно астаксантин. Так, в 9-суточной суспензии его уровень составил 120 отн. ед/мл, а к 18-м суткам выращивания – почти 520 отн. ед/мл (рис. 2).  $\beta$ -Каротин при

дефиците азота накапливался в меньшей степени, его уровень в 9-дневной культуре превышал контрольные значения в 1,2 раза, а через 18 сут культивирования – в 1,6 раза (см. табл. 1). Содержание других каротиноидов в клетках гематококка, культивируемых на дефицитной по азоту питательной среде, было ниже контроля. В частности, количество неоксантина, лютеина, антраксантина, зеаксантина и виолаксантина через 18 сут культивирования составило 68, 71, 59, 82 и 70 % от контроля.

Таблица 1. Содержание каротиноидов (мкг/мл суспензии) в клетках гематококка при культивировании в течение 9 и 18 сут на полной питательной среде Рудика (контроль), а также на среде Рудика, дефицитной по N и K + P

Table 1. The content of carotenoids (µg/ml suspension) in haematococcus cells cultivated for 9 and 18 days in complete Rudic culture medium (control) and in Rudic media deficient in N and K + P

Каротиноиды	9 сут			18 сут		
	Контроль	-N	-(K + P)	Контроль	-N	-(K + P)
Неоксантин	23,3 ± 1,6 (100)	15,6 ± 0,9 (67)	26,0 ± 1,7 (112)	22,4 ± 2,8 (100)	15,3 ± 1,2 (68)	27,0 ± 1,4 (121)
Виолаксантин	14,6 ± 1,5 (100)	8,6 ± 0,8 (59)	10,6 ± 0,9 (73)	14,8 ± 1,8 (100)	8,0 ± 0,4 (54)	19,0 ± 1,3 (128)
Антраксантин	16,2 ± 1,5 (100)	7,2 ± 0,6 (44)	9,0 ± 0,5 (56)	10,5 ± 2,1 (100)	6,2 ± 0,8 (59)	20,6 ± 1,7 (196)
Лютеин	38,1 ± 3,8 (100)	29,0 ± 1,3 (76)	31,6 ± 2,6 (83)	39,0 ± 4,1 (100)	27,7 ± 2,4 (71)	40,3 ± 3,3 (103)
Зеаксантин	33,9 ± 3,1 (100)	20,5 ± 2,2 (60)	19,9 ± 1,5 (59)	23,8 ± 2,7 (100)	19,6 ± 2,0 (82)	35,4 ± 4,1 (149)
β-Каротин	20,1 ± 2,5 (100)	23,7 ± 1,4 (118)	24,5 ± 1,8 (122)	20,0 ± 1,6 (100)	32,7 ± 3,0 (164)	65,2 ± 5,5 (325)

Примечание. Здесь и в табл. 2 скобках указан % к контролю.

Сопоставительный анализ пигментного состава клеток гематококка, культивируемых на дефицитной по калию и фосфору питательной среде, показывает, что каротиногенез в таких условиях протекает на фоне высокого уровня хлорофилловых пигментов. В целом каротиногенез (если оценивать по накоплению астаксантина) для 16-дневной культуры в клетках гематококка при

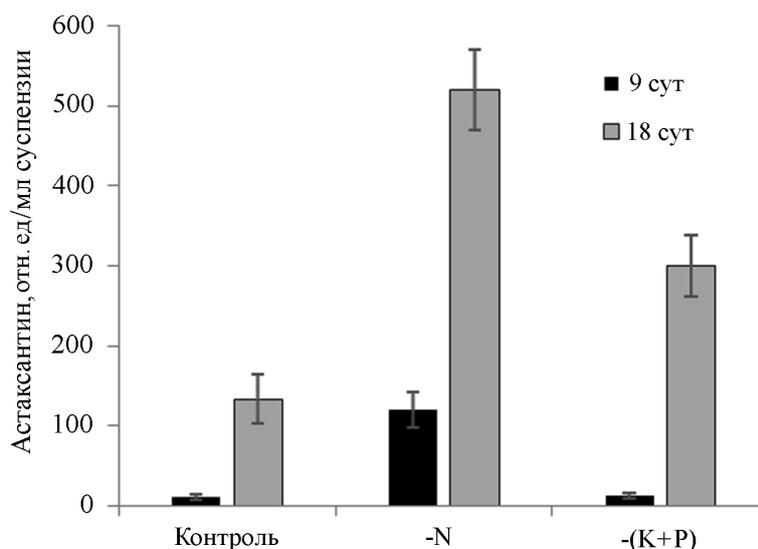


Рис. 2. Содержание астаксантина в клетках гематококка при культивировании в течение 9 и 18 сут на полной питательной среде Рудика и на среде Рудика, дефицитной по N либо по K + P

Fig. 2. Astaxanthin content in haematococcus cells cultivated for 9 and 18 days in complete Rudic culture medium and in Rudic media deficient in nitrogen (-N) or potassium and phosphorus (-(K + P))

использовании питательной среды, дефицитной по N и K + P, был в 3,9 и 2,5 раза более эффективным по сравнению с контролем и в 1,73 раза более эффективным при дефиците азота, чем при использовании среды, дефицитной по K + P.

Использование дефицитных по N и K + P сред приводило к снижению количества клеток в суспензии (табл. 2). В частности, если количество клеток в опытном варианте принять за 100 %, то при дефиците N и K + P эти значения в 9-суточной культуре составят 90 и 93 % соответственно. К 18-м суткам выращивания количество клеток при всех изученных вариантах снижалось, однако отмеченное выше соотношение между контролем и опытными вариантами сохранялось. Таким образом, если накопление астаксантина рассчитывать с учетом количества клеток, то отмеченная выше эффективность каротиногеназа изменяется, но не столь существенно. Так, количество астаксантина в клетках гематококка при дефиците азота превышало контрольное значение в 4,3 раза, при использовании дефицитной по K + P среды – в 1,8 раза.

Т а б л и ц а 2. Количество клеток в суспензии гематококка при культивировании в течение 9 и 18 сут на полной питательной среде Рудика и на среде Рудика, дефицитной по N либо K + P

T a b l e 2. Number of cells in haematococcus suspension cultivated for 9 and 18 days in complete Rudic culture medium and in Rudic media deficient in N or K + P

Вариант	К-во клеток, тыс/мл суспензии	
	9 сут культивир.	18 сут культивир.
Контроль	243 ± 21 (100)	225 ± 25 (100)
–N	219 ± 18 (90)	203 ± 19 (90)
–(K + P)	226 ± 20 (93)	209 ± 21 (93)

**Заключение.** Таким образом, установлено, что при выращивании гематококка на среде, дефицитной по азоту, каротиногенез протекал на фоне снижающегося количества хлорофилла (*a* + *b*). К 18-м суткам культивирования в клетках водоросли в таких условиях накапливался преимущественно кетокаротиноид астаксантин, в меньшей степени – β-каротин. Содержание лютеина, антраксантина, зеаксантина и виолаксантина в клетках гематококка, выращиваемого на дефицитной по азоту среде, было ниже контроля (полная питательная среда), а количество неоксантина практически не отличалось от контрольных значений. При использовании питательной среды, дефицитной по калию и фосфору, к 18-м суткам культивирования в клетках гематококка накапливались в основном астаксантин и β-каротин. Далее по уровню накопления, превышающему контроль, по убывающей следовали антраксантин, зеаксантин и виолаксантин, а количество неоксантина и лютеина в клетках гематококка находилось на уровне контроля. Показано, что каротиногенез в таких условиях протекал на фоне высокого уровня хлорофилловых пигментов. В целом, если оценивать каротиногенез по накоплению астаксантина в клетках гематококка, то более эффективным (в 1,7 раза) он был при культивировании водоросли на питательной среде, дефицитной по азоту, чем на среде, дефицитной по K + P.

**Благодарности.** Работа финансирована в рамках Государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Биотехнологии» (грант 1.04, 2016–2018 гг.).

**Acknowledgements.** This work was supported by the State Program of Scientific Research of the Republic of Belarus “Biotechnology” (grant 1.04, 2016–2018).

### Список использованных источников

1. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis* / M. Kobayashi [et al.] // J. Ferment. Bioeng. – 1997. – Vol. 84, N 1. – P. 94–97. [https://doi.org/10.1016/s0922-338x\(97\)82794-8](https://doi.org/10.1016/s0922-338x(97)82794-8)
2. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Navada, USA) under laboratory conditions / A. Cifuentes [et al.] // Biol. Res. – 2003. – Vol. 36, N 3–4. – P. 343–357. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602003000300006>
3. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* / A. Domínguez-Bocanegra [et al.] // Bioresource Technol. – 2004. – Vol. 92, N 2. – P. 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>

4. Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for carbon partitioning under nitrogen starvation in the green algae *Haematococcus pluvialis* / L. Recht [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, N 44. – P. 30387–30403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.555144>

5. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation / M. Wan [et al.] // *Bioresource Technol.* – 2014. – Vol. 167. – P. 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.030>

6. Combination of blue, red, white, and ultraviolet lights for increasing carotenoids and biomass of Microalga *Haematococcus pluvialis* / E. A. Suyono [et al.] // *Procedia Environmental Sci.* – 2015. – Vol. 28. – P. 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.049>

7. Влияние NaCl на продуктивность водоросли *Haematococcus pluvialis* и содержание в ее клетках фотосинтетических пигментов, активных форм кислорода и астаксантина / Н. Г. Аверина [и др.] // *Вест. Нац. акад. Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2018. – № 3. – С. 263–275.

8. 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)

9. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition / G. Hussein [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 2006. – Vol. 69, N 3. – P. 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354+>

10. Pashkow, F. J. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease / F. J. Pashkow, D. G. Watumull, C. L. Campbell // *Am. J. Cardiol.* – 2008. – Vol. 101, N 10. – P. S58–S68. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.010>

11. Шальго, Н. Медицинские аспекты альгологии / Н. Шальго // *Наука и инновации.* – 2018. – № 2. – С. 20–23.

12. Lorenz, R. T. Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin / R. T. Lorenz, G. R. Cysewski // *Trends Biotechnol.* – 2000. – Vol. 18, N 4. – P. 160–167. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01433-5)

13. Ethanol induced astaxanthin accumulation and transcriptional expression of carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* / Z. Wen [et al.] // *Enzyme Microbiol. Technol.* – 2015. – Vol. 78. – P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.010>

14. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 100 с.

15. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на продуктивность и пигментный состав водоросли *Haematococcus pluvialis* / Н. Г. Аверина [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 4. – С. 21–32.

16. Продуктивность и пигментный комплекс сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis* при частичной замене бикарбоната натрия на гидроксид натрия в среде культивирования / Е. В. Вязов [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 4. – С. 7–12.

17. Сафонова, О. Ю. Накопление пигментов в клетках *Dunaliella salina* при дефиците азота, калия и фосфора в среде культивирования / О. Ю. Сафонова, М. С. Радюк, Н. В. Шальго // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : материалы междунар. науч. конф. ; Тринадцатый съезд Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков, 27–29 июня 2018 г., Минск, Беларусь : тез. докл. / редкол. : И. Д. Вологовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – С. 127.*

18. Loewus, F. A. Myo-inositol metabolism in plants / F. A. Loewus, P. N. Murthy // *Plant Sci.* – 2000. – Vol. 150, N 1. – P. 1–19. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00150-8](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00150-8)

## References

1. Kobayashi M., Kurimura Y., Kakizono N., Nishio N., Tsuji Y. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, vol. 84, no. 1, pp. 94–97. [https://doi.org/10.1016/s0922-338x\(97\)82794-8](https://doi.org/10.1016/s0922-338x(97)82794-8)

2. Cifuentes A., Gonzáles M., Vargas S., Hoeneisen M., Gonzáles N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Navada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, 2003, vol. 36, no. 3–4, pp. 343–357. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602003000300006>

3. Domínguez-Bocanegra A. R., Guerrero Legarreta I., Martínez Jerónimo F., Tomasini Campocósio A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 2004, vol. 92, no. 2, pp. 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>

4. Recht L., Töpfer N., Batushansky A., Sikron N., Gibon Y., Fait A., Nikoloski Z., Boussiba S., Zarka A. Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for carbon partitioning under nitrogen starvation in the green algae *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol. 289, no. 44, pp. 30387–30403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.555144>

5. Wan M., Zhang J., Hou D., Fan J., Li Y., Huang J., Wang J. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. *Bioresource Technology*, 2014, vol. 167, pp. 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.030>

6. Suyono E., Aminin, Pradani L., Mu'avatun U., Habiba R., Ramdaniyah, Rohma E. Combination of blue, red, white, and ultraviolet lights for increasing carotenoids and biomass of Microalga *Haematococcus pluvialis*. *Procedia Environmental Sciences*, 2015, vol. 28, pp. 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.049>

7. Aверина N. G., Kozel N. V., Shcherbakov R. A., Radyuk M. S., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Effect of NaCl on *Haematococcus pluvialis* productivity and content in its cells of photosynthetic pigments, active oxygen forms and

astaxanthine. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, no. 3, pp. 263–275 (in Russian).

8. Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends in 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)

9. Hussein G., Sankawa 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+>

10. Pashkow F. J., Watumull D. G., Campbell C. L. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *American Journal of Cardiology*, 2008, vol. 101, no. 10, pp. S58–S68. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.010>

11. Shalygo N. Medical aspects of algology. *Nauka i innovatsii* [Science and innovation], 2018, no. 2, pp. 20–23 (in Russian).

12. Lorenz R. T., Cysewski G. R. Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 2000, vol. 18, no. 4, pp. 160–167. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01433-5)

13. Wen Z., Liu Z., Hou Y., Liu C., Gao F., Zhenq 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>

14. Mel'nikov S. S., Manankina E. E., Shalygo N. V., Budakova E. A. *Catalogue of the genetic fund of economically useful species of algae*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 100 p. (in Russian).

15. Averina N. G., Shcherbakov R. A., Kozel N. V., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Effect of 5-amino-levulinic acid on the productivity and pigment composition of the 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).

16. Vyazov Y. V., Manankina E. E., Filipchik E. A., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Productivity and pigment complex of blue-green alga *Spirulina platensis* upon partial substitution of sodium bicarbonate for sodium hydroxide in culture medium. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 7–12 (in Russian).

17. Safonova O. Y., Radyuk M. S., Shalygo N. V. Accumulation of pigments in *Dunaliella salina* cells with nitrogen, potassium and phosphorus deficiency in the culture medium. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniya biosistem: mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya; Trinadtsatyi s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov: tezisy dokladov (Belarus', Minsk, 27–29 iyunya 2018 goda)* [Molecular, membrane and cellular principles of the functioning of biosystems: international scientific conference; Thirteenth congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists: abstracts (Belarus, Minsk, June 27–29, 2018)]. Minsk, 2018, p. 127 (in Russian).

18. Loewus F., Murthy P. Myo-inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 2000, vol. 150, no. 1, pp. 1–19. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(99\)00150-8](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(99)00150-8)

### Информация об авторе

Шальго Николай Владимирович – член-корреспондент НАН Беларуси, д-р биол. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai\_shalygo@yahoo.com

### Information about the author

Nikolai V. Shalygo – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai\_shalygo@yahoo.com