

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.344
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-66-74>

Поступила в редакцию 09.06.2021
Received 09.06.2021

Т. В. Самович, Е. В. Вязов, Р. Г. Гончарик, Е. И. Печёнкина, Н. В. Козел

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

КАРОТИНОГЕНЕЗ В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ ИЗБЫТКА NaCl В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И СВЕТА ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Аннотация. Исследованы параметры роста и развития микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, а также процесс каротиногенеза, включая пигментный состав и экспрессию ключевых генов биосинтеза астаксантина, в клетках водоросли в условиях совместного действия света высокой интенсивности и избытка NaCl в среде культивирования. Установлено, что сочетание избытка NaCl в среде культивирования *Haematococcus pluvialis*, инициированного на стадии покоя микроводоросли, и действия света высокой интенсивности не является эффективным способом индукции накопления астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis*. Выявлено снижение уровня экспрессии одного из ключевых генов каротиногенеза, кодирующего фитоинсинтазу, в таких условиях. В то же время установлено, что совместное действие света высокой интенсивности и избытка NaCl приводит к повышению доли более ценных с точки зрения биотехнологии *cis*-изомеров астаксантина в общем пуле пигмента.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*, солевой стресс, свет высокой интенсивности, каротиногенез, астаксантин

Для цитирования: Каротиногенез в клетках *Haematococcus pluvialis* при совместном действии избытка NaCl в среде культивирования и света высокой интенсивности / Т. В. Самович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 66–74. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-66-74>

Tatsiana V. Samovich, Yauhen V. Viazau, Ruslan G. Goncharik, Elizaveta I. Pechenkina, Nikolai V. Kozel

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

CAROTENOGENESIS IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* CELLS UNDER THE COMBINED ACTION OF EXCESS OF NaCl IN THE CULTURE MEDIUM AND HIGH LIGHT INTENSITY

Abstract. The parameters of growth and development of the microalga *Haematococcus pluvialis*, as well as the process of carotenogenesis, including the pigment composition and expression of the key genes of astaxanthin biosynthesis, were studied in algal cells under the combined action of excess of NaCl in the culture medium and high light intensity. It was found that the combination of excess of NaCl in the culture medium for *Haematococcus pluvialis*, initiated at the resting stage of the microalga, and high light intensity is not an effective method for induction of the accumulation of astaxanthin in the cells of *Haematococcus pluvialis*. A decrease in the level of expression of one of the key genes of carotenogenesis – phytoene synthase gene, was revealed under such conditions. At the same time, it was found that the combined action of high light intensity and excess of NaCl led to an increase in the ratio of astaxanthin *cis*-isomers, which are more biotechnologically valuable, in the total pigment pool.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, salt stress, high light intensity, carotenogenesis, astaxanthin

For citation: Samovich T. V., Viazau Ya. V., Goncharik R. G., Pechenkina E. I., Kozel N. V. Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* cells under the combined action of excess of NaCl in the culture medium and high light intensity. *Vestsi Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 66–74 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-66-74>

Введение. Кетокаротиноид астаксантин – один из наиболее эффективных из известных на сегодняшний день природных антиоксидантов. Установлено, что его антиоксидантная активность в определенных условиях на порядок выше, чем у β -каротина и α -токоферола [1–3]. Астаксантин используется в пищевой и фармацевтической промышленности, а также в косметологии. В отличие от β -каротина, астаксантин не является провитамином А, поэтому норму его суточного потребления по медицинским показаниям можно увеличивать до 20 мг/сут без угрозы побочных эффектов, характерных для высоких концентраций витамина А [1, 4, 5]. Кроме того, астаксантин обладает ярко выраженным противовоспалительным действием, а также способно-

стью проникать через гематоэнцефалический барьер, что определяет его эффективность при профилактике и лечении заболеваний центральной нервной системы [1].

Астаксантин присутствует у многих ракообразных и рыб, окрашивая их в специфический цвет (лосось, форель, омары, креветки, крабы), а также продуцируется водорослями, грибами, бактериями и некоторыми высшими растениями. Однако наибольшее количество этого антиоксиданта содержится в клетках зеленой жгутиковой водоросли гематококка (*Haematococcus pluvialis*), составляя до 5 % от сухой массы. В нормальных условиях клетки гематококка имеют зеленую окраску и достаточно подвижны. Однако при попадании в неблагоприятные стрессовые условия, такие, например, как действие света высокой интенсивности или повышение концентрации соли в среде обитания водоросли, клетки гематококка прекращают рост, превращаясь в неподвижные цисты, и начинают накапливать астаксантин для защиты от окислительных повреждений, вызванных активными формами кислорода, повышение уровня которых обусловлено индуцированным стрессом. При этом клетки водоросли приобретают насыщенно-красный цвет. Отсюда водоросль и получила свое латинское название – *Haematococcus* (от греч. *haima* и *kokkos* – «кровавое семя»). В стрессовых условиях астаксантин накапливается в липидных везикулах в цитозоле – сначала вблизи ядра, а затем мигрируя на периферию клетки.

H. pluvialis выращивают во многих странах мира для получения каротиноидов – β -каротина и астаксантина [1, 3, 4]. Впервые его выращивание для получения астаксантина было налажено в Японии (Fuji Chemical Industry, 1997 г.) [6] и США (Cyanotech, 1998 г.) [7]. Кроме того, *H. pluvialis* внесен в список видов водорослей, разрешенных для непосредственного употребления в пищу практически во всех странах мира [8].

Себестоимость получения астаксантина из водорослей в настоящее время почти в 3 раза выше, чем синтетического продукта [9, 10]. Поэтому исследования, направленные на увеличение как продуктивности *H. pluvialis*, так и каротиногенеза в его клетках, являются весьма актуальными. В частности, ранее нами было показано, что избыток NaCl стимулирует накопление в клетках водоросли астаксантина [11]. Однако наблюдаемое при этом увеличение продукции этого каротиноида в таких условиях было не столь существенным, как при действии света высокой интенсивности [12]. Представляет большой интерес изучить сочетанное действие указанных выше стрессовых факторов на клетки гематококка.

В рамках данной работы были исследованы особенности роста и развития *H. pluvialis*, а также каротиногенеза в клетках водоросли в условиях совместного действия света высокой интенсивности и засоления питательной среды (избытка NaCl) с целью изучения перспектив получения биомассы гематококка, обогащенной антиоксидантом астаксантином.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служила альгологически чистая культура одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм ИВСЕ Н-17, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [13]. Клетки гематококка, взятые из альгологической коллекции, стерильно пересевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ВВМ, подращивали на свету в течение 7–10 сут при температуре 23 ± 2 °С, после чего смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика [14] и выращивали в накопительном режиме при освещении светом люминесцентных ламп Philips TD-36/765, освещенности 1500 лк и режиме 14 ч света – 10 ч темноты в световом периоде при температуре 23 ± 2 °С. Через 10–14 сут выращивания суспензию гематококка, содержащую около 80 % неподвижных клеток, использовали в экспериментах. Водоросли выращивали в стеклянных колбах объемом 50 мл (рабочий объем 40 мл) в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре 23 ± 1 °С и освещенности 2000 и 10 000 лк. Для создания избытка соли в питательную среду вносили NaCl до концентрации 100 мМ. В опытах использовали следующие варианты: 1 – стандартная среда, освещенность 2000 лк; 2 – среда с избытком NaCl, освещенность 2000 лк; 3 – стандартная среда, освещенность 10 000 лк; 4 – среда с избытком NaCl, освещенность 10 000 лк.

При постановке эксперимента и через 21 сут культивирования определяли количество клеток в суспензии, их размер и содержание астаксантина. Количество клеток в культуре водоросли оценивали при помощи камеры Горяева. Диаметр клеток гематококка определяли с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2, используя программное обеспечение NIS-Elements Advanced Solutions v. 4.40 (Nikon, Япония).

Качественную и количественную оценку содержания хлорофиллов и каротиноидов в образцах осуществляли 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). В основу метода выделения, разделения и идентификации пигментов были положены методики, описанные в работах [15–17]. Содержание пигментов определяли спектрофотометрически, используя детектор с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм (для фотосинтетических пигментов) и 475 нм (для астаксантина). Площади пиков хроматограммы, определенные с помощью программного обеспечения Shimadzu LC Solution, использовали для количественного определения пигментов. Фотосинтетические пигменты экстрагировали в ацетон, а астаксантин – в метанол. Астаксантин с жирными кислотами образует большое количество эфиров. В связи с этим для точного количественного определения последнего в метанольных экстрактах перед хроматографией проводили процедуру сапонификации: вносили 20 мкл 1 М КОН на 1 мл экстракта и инкубировали 6 ч при комнатной температуре. После сапонификации жирные кислоты отщеплялись и астаксантин выходил в виде нескольких стереоизомеров, среди которых преобладал транс-астаксантин [18].

Для определения уровня экспрессии генов *PSY* и *CHY*, кодирующих в клетках *H. phuvialis* ключевые ферменты биосинтеза астаксантина – фитоинсинтазу и β -каротингидроксилазу соответственно, выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzol (Applied Biosystems, Германия) и синтезировали кДНК с использованием ProtoScript II Reverse Transcriptase “BioLabs” в амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР-анализа в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием ген-специфических праймеров и гена-нормализатора, кодирующего актин. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 1 мкл кДНК, 10 пмоль каждого праймера, 4 мкл 2,5 \times реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии EvaGreen («Синтол», Россия) и воду. ПЦР-РВ проводили с использованием термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler с оптическим реакционным модулем CFX96 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: предварительная денатурация – 95 °С, 5 мин; плавление – 95 °С, 15 с; отжиг – 55–61 °С, 45 с. Количество циклов амплификации – 40. Для регистрации и анализа полученных кривых амплификации использовали программное обеспечение Bio-Rad CFX Maestro, с помощью которого рассчитывали относительную нормализованную экспрессию изучаемых генов по методу Ливак [19].

В работе приведены средние значения из 3–5 экспериментов и их стандартные отклонения. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2019, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследований были проанализированы продуктивность гематококка и морфометрические показатели клеток микроводоросли при совместном действии на них избытка NaCl в среде культивирования и света высокой интенсивности.

Поскольку для проведения экспериментов использовали культуру, прошедшую стадию активного роста и перешедшую в стадию покоя, количество подвижных клеток подсчитывали только при постановке эксперимента. В культуре при постановке экспериментов клетки были круглые, в основном неподвижные (подвижных не более 10–30 %).

Внешний вид суспензии гематококка спустя 21 сут культивирования водоросли на полной среде Рудика и среде Рудика с избытком NaCl показан на рис. 1. Заметно, что в вариантах 3 (10 000 лк, стандартная среда) и 4 (10 000 лк, избыток NaCl) наблюдалось существенное изменение окраски суспензии, очевидно связанное с изменением пигментного состава клеток водоросли.

Установлено, что через 21 сут эксперимента количество клеток в суспензии снижалось во всех вариантах. Наиболее значительное снижение отмечено в вариантах на среде Рудика с избытком NaCl вне зависимости от интенсивности освещения (рис. 2, а). В этих же вариантах наблюдали увеличение диаметра клеток (рис. 2, б), что является признаком стрессового состояния клеток водоросли [20]. В вариантах на стандартной среде Рудика количество клеток снижалось, а их диаметр также увеличивался по сравнению с начальным значением вне зависимости от освещения.



Рис. 1. Суспензия гематококка на стандартной среде Рудика (1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (2000 лк, варианты 1 и 2) и на свете высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Fig. 1. Suspension of *H. pluvialis* in standard Rudic medium (1, 3) and in Rudic medium with excess of NaCl (2, 4) after incubation for 21 days under normal light (2000 lx, variants 1 and 2) and under high-intensity light (10 000 lx, variants 3 and 4)

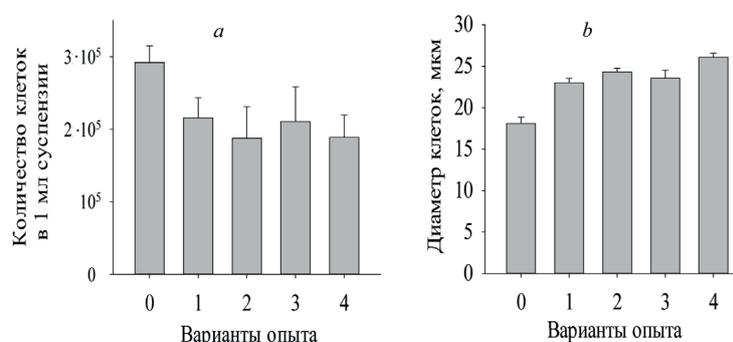


Рис. 2. Количество клеток *H. pluvialis* (a) и их диаметр (b) в начале (0) и через 21 сут (1–4) эксперимента на стандартной среде Рудика (0, 1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) при освещенности 2000 лк (1, 2) и 10 000 лк (3, 4)

Fig. 2. The number of *H. pluvialis* cells (a) and their diameter (b) at the start (0) and after 21 days (1–4) of the experiment in standard Rudic medium (0, 1, 3) and in Rudic medium with excess of NaCl (2, 4) at illumination of 2000 lx (1, 2) and 10 000 lx (3, 4)

Анализ содержания фотосинтетических пигментов в клетках *H. pluvialis* с помощью ВЭЖХ позволил выявить в исследуемых препаратах наличие каротиноидов (неоксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина) и хлорофиллов *a* и *b*.

В клетках культуры гематококка, выращенной на среде Рудика при обычной интенсивности света, через 21 сут регистрировали снижение содержания каротиноидов (неоксантина – на 31 %, лютеина – на 61, каротина – на 49 %) и хлорофиллов *a* и *b* – на 60 и 65 % соответственно. В варианте опыта с избытком соли наблюдали не такое значительное снижение содержания каротиноидов – до 83,9 %, а содержание хлорофиллов *a* и *b* снизилось на 48 и 52 % соответственно. В культуре, помещенной в условия избыточного освещения, регистрировали значительное снижение содержания хлорофиллов *a* и *b* – до 12 и 18 % от контроля в обычной культуре и до 36 и 33 % от контроля в культуре с избытком соли. Большинство каротиноидов в культуре на стандартной среде Рудика и при ярком свете не детектировалось, а в культуре с избытком NaCl в таких условиях их содержание изменялось незначительно по сравнению с таковым при действии света нормальной интенсивности (табл. 1). Таким образом, избыток соли при интенсивном освещении культуры гематококка не приводил к заметным изменениям в пигментном составе по сравнению с культурой на нормальной среде Рудика в таких условиях. Соотношение фотосинтетических каротиноидов к хлорофиллу изменялось незначительно, оставаясь на уровне 0,17–0,25 в вариантах на стандартной среде Рудика. В клетках культуры на среде Рудика с избытком NaCl и повышенной интенсивностью света это соотношение увеличивалось в 1,4–2,1 раза (по сравнению с нормальной освещенностью и с начальной культурой).

Т а б л и ц а 1. Содержание фотосинтетических пигментов (пг на клетку) в клетках *H. pluvialis* на стандартной среде Рудика (1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (2000 лк, варианты 1 и 2) и на свету высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Table 1. Content of photosynthetic pigments in *H. pluvialis* cells in standard Rudic medium (1, 3) and in Rudic medium with an excess of NaCl (2, 4) after incubation for 21 days under normal light (2000 lx, variants 1 and 2) and under high-intensity light (10000 lx, variants 3 and 4)

Вариант опыта	Неоксантин	Виолаксантин	Лютеин	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофилл <i>a</i>	β-каротин	Сумма каротиноидов
Начальная культура	0,88 (100)	0,47 (100)	5,62 (100)	18,55 (100)	35,99 (100)	4,23 (100)	11,20 (100)
1	0,65 (69,10)	0,44 (86,75)	2,25 (39,29)	6,77 (34,97)	14,88 (39,86)	2,17 (50,26)	5,50 (49,1)
2	0,73 (82,41)	0,41 (82,75)	4,06 (70,94)	9,19 (48,43)	18,93 (51,97)	3,52 (83,93)	8,71 (77,6)
3	н. о.	н. о.	1,29 (23,13)	3,29 (18,13)	4,45 (12,37)	н. о.	1,29 (11,51)
4	0,56 (64,84)	0,34 (72,13)	3,74 (65,21)	6,18 (32,80)	13,25 (36,70)	3,77 (68,33)	8,41 (75,1)

Пр и м е ч а н и е. В скобках указан процент к контролю, н. о. – не обнаружено.

С целью изучения перспективности использования совместного действия избытка соли и света высокой интенсивности в качестве индуктора накопления астаксантина в клетках *H. pluvialis* на следующем этапе исследования определяли количество непосредственно накопившегося в клетках водоросли астаксантина.

В исходной культуре (начало эксперимента) были зарегистрированы следовые количества астаксантина. В клетках культуры гематококка, выращенной на среде Рудика при обычной интенсивности света, через 21 сут регистрировали увеличение содержания астаксантина – как транс-изомеров, так и 9-цис- и 13-цис-изомеров (рис. 3). Причем содержание всех форм астаксантина было бóльшим в вариантах опыта на обычной среде Рудика по сравнению с вариантами на среде Рудика с избытком NaCl вне зависимости от интенсивности освещения. Так, приняв значения содержания астаксантина (в отн. ед. на клетку) в вариантах на среде Рудика и действии нормального света за 100 %, общее содержание астаксантина в таком же варианте на свету высокой интенсивности составило 225 %, в варианте на нормальном свете с избытком соли – 88, в варианте с избытком соли на свету высокой интенсивности – 187 %. Таким образом, избыток соли в условиях интенсивного освещения культуры гематококка не приводил к увеличению содержания астаксантина по сравнению с культурой на нормальной среде Рудика в таких условиях. Интересно, что соотношение транс-/цис-изомеров астаксантина при увеличении интенсивности света снижалось на 5 и 19 % в вариантах на нормальной среде и среде с избытком соли соответственно. По-видимому, избыток NaCl способствовал усилению транс-/цис-изомеризации атак-

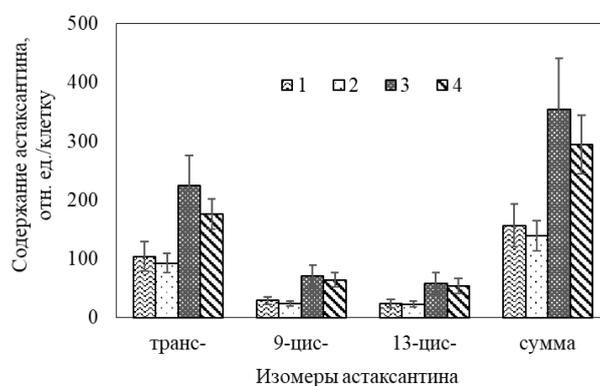


Рис. 3. Количество астаксантина в клетках *H. pluvialis* через 21 сут эксперимента на стандартной среде Рудика (1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) при освещенности 2000 лк (1, 2) и 10 000 лк (3, 4)

Fig. 3. Content of astaxanthin in *H. pluvialis* cells after 21 days of the experiment in standard Rudic medium (1, 3) and in Rudic medium with excess of NaCl (2, 4) at illumination of 2000 lx (1, 2) and 10 000 lx (3, 4)

сантина, которая обычно наблюдается в условиях действия света высокой интенсивности либо высокой температуры [21, 22]. Несмотря на меньшее суммарное количество астаксантина при совместном действии света и NaCl, увеличение доли цис-изомеров в указанных условиях является преимуществом такого метода индукции накопления астаксантина, так как по целому ряду биотехнологически значимых свойств цис-астаксантин превосходит транс-астаксантин. Так, цис-астаксантин характеризуется более сильной антиоксидантной активностью и противвоспалительным эффектом, большей биодоступностью и экстрагируемостью [22–25].

Результаты исследования уровня экспрессии генов *PSY* и *CHY*, кодирующих ферменты биосинтеза астаксантина – фитоинсинтазу и β-каротингидроксилазу соответственно, в клетках *H. pluvialis* при совместном действии света высокой интенсивности и избытка NaCl в среде культивирования в культуре водоросли, выращенной в указанных условиях в течение 7 сут, приведены в табл. 2.

Катализируемая фитоинсинтазой конденсация двух молекул геранилгеранилпирофосфата с образованием фитоина может являться лимитирующей стадией биосинтеза каротиноидов, поскольку это первая реакция, характерная исключительно для пути синтеза данных соединений. Фитоинсинтаза – это ассоциированный с мембраной белок, для функционирования которого важны ионы двухвалентных металлов. Он кодируется ядерным геномом и имеет пластидную сигнальную последовательность, которая содержит фрагмент, отвечающий за взаимодействие с другими белками биосинтеза каротиноидов [26, 27].

β-Каротингидроксилаза осуществляет одну из реакций превращения β-каротина в астаксантин – реакцию присоединения гидроксигруппы после образования кетогруппы в β-иононовом кольце. Есть сведения, что регуляция синтеза астаксантина у гематококка может контролироваться путем изменения уровня экспрессии гена β-каротингидроксилазы [27].

Т а б л и ц а 2. Относительная нормализованная экспрессия генов фитоинсинтазы и β-каротингидроксилазы (отн. ед.) в клетках *H. pluvialis* на стандартной среде Рудика (1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) после инкубации в течение 7 сут на нормальном свете (2000 лк, варианты 1 и 2) и на свете высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Table 2. Relative normalized expression of phytoene synthase and β-carotene hydroxylase genes (rel. units) in *H. pluvialis* cells in standard Rudic medium (1, 3) and in Rudic medium with excess of NaCl (2, 4) after incubation for 7 days under normal light (2000 lx, variants 1 and 2) and under high-intensity light (10,000 lx, variants 3 and 4)

Вариант	<i>PSY</i>	<i>CHY</i>
Начальная культура	0,093 (100)	0,617 (100)
1	1,961 (2108)	0,718 (116)
2	0,973 (1046)	3,000 (486)
3	0,596 (640)	0,299 (48)
4	0,097 (104)	1,391 (225)

Примечание. В скобках указан процент к контролю.

Данные по уровню экспрессии гена *CHY* на 7-е сутки эксперимента показали заметное превышение исходного значения в вариантах опыта с избытком NaCl, причем наибольшая экспрессия данного гена была выявлена на нормальном свете.

Экспрессия *PSY* повышалась во всех вариантах опыта. В вариантах на нормальном свете она значительно превышала начальную. Так, в контрольном варианте (выращивание на обычной среде Рудика) уровень экспрессии этого фермента превышал опытный вариант (среда с избытком NaCl) более чем в 2 раза (варианты 1 и 2 соответственно). Подобные результаты получены для вариантов на ярком свете, однако в этом случае регистрировалось превышение уже в 6 раз (варианты 3, 4).

Таким образом, экспрессия ключевых генов каротиногенеза усиливается по мере культивирования культуры на свете нормальной интенсивности. В то же время эффект избытка NaCl в питательной среде оказывается различным для генов фитоинсинтазы и β-каротингидроксилазы –

он приводит к ослаблению экспрессии *PSY* и к усилению экспрессии *CHY*. Снижение экспрессии *PSY* может быть лимитирующим фактором, определяющим снижение выхода астаксантина при засолении.

Заключение. Установлено, что избыток NaCl в среде культивирования *H. pluvialis*, инициированный на стадии покоя водоросли, не является эффективным стрессовым фактором в сочетании с действием света высокой интенсивности для индукции накопления астаксантина в клетках *H. pluvialis*. При этом важно отметить, что количество астаксантина в клетках водоросли при избытке NaCl было несколько ниже, чем в вариантах с использованием стандартной среды Рудика независимо от интенсивности освещения. Несмотря на положительное влияние избытка NaCl на экспрессию одного из ключевых генов пути биосинтеза астаксантина, кодирующего β -каротингидроксилазу, в таких условиях наблюдалось ослабление экспрессии гена фитинсинтазы – фермента, катализирующего один из начальных этапов всего каротиногенеза в целом, с чем, по-видимому, и связан низкий выход астаксантина в вариантах опыта, когда водоросли культивировали на среде Рудика с избытком NaCl. В то же время повышение доли цис-изомеров (обладающих большей хозяйственной ценностью, чем транс-изомеры) в общем пуле астаксантина в клетках *H. pluvialis* в условиях совместного действия света высокой интенсивности и избытка NaCl в питательной среде указывает на целесообразность дальнейшей модификации данного метода индукции накопления астаксантина с целью повышения его выхода.

Благодарности. Работа финансирована в рамках Государственной программы научных исследований «Биотехнологии» (задание 1.42, 2019–2020 гг.).

Acknowledgements. This work was supported by the State Program of Scientific Research “Biotechnologies” (grant 1.42, 2019–2020).

Список использованных источников

1. Astaxanthin, a carotenoid with potential 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+>
2. Lorenz, R. T. Commercial potential for *Haematococcus pluvialis* 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)
3. Naguib, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids / Y. M. A. Naguib // J. Agr. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, N 4. – P. 1150–1154. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
4. del Campo, J. A. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives / J. A. del Campo, M. García-González, M. G. Guerrero // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 74, N 6. – P. 1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>
5. Spiller, G. A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial / G. A. Spiller, A. Dewell // J. Med. Food. – 2003. – Vol. 6, N 1. – P. 51–56. <https://doi.org/10.1089/109662003765184741>
6. Our history [Electronic resource] // AstaReal. – Mode of access: <https://www.astareal.com/en/history/>. – Date of access: 20.04.2021.
7. Cyanotech – Whole Health through Hawaiian microalgae [Electronic resource] // Cyanotech. – Mode of access: www.cyanotech.com. – Date of access: 20.04.2021.
8. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс / Г. С. Минюк [и др.] // Мор. экол. журн. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 5–23.
9. Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project / A. S. Carlsson [et al.]. – Chippenham : CPL Press, 2007. – 86 p.
10. Commercial applications of microalgae / P. Spolaore [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – Vol. 101, N 2. – P. 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
11. Влияние NaCl на продуктивность водоросли *Haematococcus pluvialis* и содержание в ее клетках фотосинтетических пигментов, активных форм кислорода и астаксантина / Н. Г. Аверина [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 263–275.
12. Печенкина, Е. И. Влияние фотосенсибилизатора бенгальского розового на продуктивность и пигментный состав *Haematococcus pluvialis* / Е. И. Печенкина, Т. В. Самович, Н. В. Козел // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2021. – № 1. – С. 58–69.
13. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 101 с.
14. Rudic, V. Process for cultivation of green alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow) / V. Rudic, T. Dudnicenco. – 2000. – MD Patent Nr. a 2000 0154.
15. Rodriguez-Amaya, D. B. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis / D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura. – Washington : HarvestPlus, 2004. – 63 p.
16. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies / S. V. Milenković [et al.] // Adv. Technol. – 2012. – Vol. 1. – P. 16–24.

17. Forni, E. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas / E. Forni, M. Ghezzi, A. Polesello // *Chromatography*. – 2012. – Vol. 26. – P. 120–124. <https://doi.org/10.1007/BF02268135>
18. Yuan, J.-P. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification / J.-P. Yuan, F. Chen // *J. Agr. Food Chem.* – 1999. – Vol. 47, N 1. – P. 31–35. <https://doi.org/10.1021/jf980465x>
19. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25, N 4. – P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
20. Kakizono, T. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* / T. Kakizono, M. Kobayashi, S. Nagai // *J. Ferment. Bioeng.* – 1992. – Vol. 74, N 6. – P. 403–405. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90041-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90041-R)
21. Lerfall, J. Effect of high pressure processing on astaxanthin stability / J. Lerfall, S. Birkeland // *Int. J. Food Sci. Tech.* – 2014. – Vol. 49, N 1. – P. 294–297. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12271>
22. Efficient and environmentally friendly method for carotenoid extraction from *Paracoccus carotinifaciens* utilizing naturally occurring Z-isomerization-accelerating catalysts / M. Honda [et al.] // *Process Biochem.* – 2019. – Vol. 89. – P. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.005>
23. Rapid and efficient conversion of all-E-astaxanthin to 9Z- and 13Z-isomers and assessment of their stability and antioxidant activities / C. Yang [et al.] // *J. Agr. Food Chem.* – 2017. – Vol. 65, N 4. – P. 818–826. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04962>
24. Anti-inflammatory effects of different astaxanthin isomers and the roles of lipid transporters in the cellular transport of astaxanthin isomers in Caco-2 cell monolayers / C. Yang [et al.] // *J. Agr. Food Chem.* – 2019. – Vol. 67, N 22. – P. 6222–6231. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02102>
25. Improved carotenoid processing with sustainable solvents utilizing z-isomerization-induced alteration in physico-chemical properties: a review and future directions / M. Honda [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, N 11. – P. 2149. <https://doi.org/10.3390/molecules24112149>
26. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) / Y. Li [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 165, N 17. – P. 1783–1797. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.007>
27. Steinbrenner, J. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis* / J. Steinbrenner, H. Linden // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 125, N 2. – P. 810–817. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.810>

References

1. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 2008, vol. 69, no. 3, pp. 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354+>
2. Lorenz R. T., Cysewski G. R. Commercial potential for *Haematococcus pluvialis* 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)
3. Naguib Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, vol. 48, no. 4, pp. 1150–1154. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
4. del Campo J. A., García-González M., Guerrero M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 74, no. 6, pp. 1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>
5. Spiller G. A., Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *Journal of Medicinal Food*, 2003, vol. 6, no. 1, pp. 51–56. <https://doi.org/10.1089/109662003765184741>
6. *Our history (2021)*. Available at: <https://www.astareal.com/en/history/> (accessed 20.04.2021).
7. Cyanotech – Whole Health through Hawaiian microalgae (2021). Available at: <http://www.cyanotech.com> (accessed 20.04.2021).
8. Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N., Terent'eva N. V. Unicellular algae as a renewable resource. *Morskoi ekologicheskii zhurnal* [Marine ecological journal], 2008, vol. 7, no. 2, pp. 5–23 (in Russian).
9. Carlsson A. S., van Beilen J. B., Möller R., Clayton D. *Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. outputs from epobio project*. Chippenham, CPL Press, 2007. 86 p.
10. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, vol. 101, no. 2, pp. 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
11. Averina 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 astaxanthin. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 263–275 (in Russian).
12. Pechenkina E. I., Samovich T. V., Kozel N. V. The influence of Rose Bengal photosensitizer on the productivity and pigment composition of *Haematococcus pluvialis*. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* [Journal of the Belarusian State University. Biology], 2021, no. 1, pp. 58–69 (in Russian).
13. Melnikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A., Shalygo N. V. *Catalogue of the genetic fund of economically useful algae species*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
14. Rudic V., Dudnicenco T. *Process for cultivation of green alga Haematococcus pluvialis (Flotow)*. 2000. MD Patent Nr. a 2000 0154.

15. Rodriguez-Amaya D. B., Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington, HarvestPlus, 2004. 63 p.
16. Milenković S. V., Zvezdanović J. B., Anđelković T. D., Marković D. Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced Technologies*, 2012, vol. 1, pp. 16–24.
17. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatography*, 2012, vol. 26, pp. 120–124. <https://doi.org/10.1007/BF02268135>
18. 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>
19. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
20. Kakizono T., Kobayashi M., Nagai S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1992, vol. 74, no. 6, pp. 403–405. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90041-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90041-R)
21. Lerfall J., Birkeland S. Effect of high pressure processing on astaxanthin stability. *International Journal of Food Science and Technology*, 2014, vol. 49, no. 1, pp. 294–297. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12271>
22. Honda M., Kageyama H., Hibino T., Sowa T., Kawashima Y. Efficient and environmentally friendly method for carotenoid extraction from *Paracoccus carotinifaciens* utilizing naturally occurring Z-isomerization-accelerating catalysts. *Process Biochemistry*, 2019, vol. 89, pp. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.005>
23. Yang C., Zhang L., Zhang H., Sun Q., Liu R., Li J., Wu L., Tsao R. Rapid and efficient conversion of all-E-astaxanthin to 9Z- and 13Z-isomers and assessment of their stability and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, vol. 65, no. 4, pp. 818–826. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04962>
24. Yang C., Hassan Y. I., Liu R., Zhang H., Chen Y., Zhang L., Tsao R. Anti-Inflammatory Effects of different astaxanthin isomers and the roles of lipid transporters in the cellular transport of astaxanthin isomers in Caco-2 cell monolayers. *Agricultural and Food Chemistry*, 2019, vol. 67, no. 22, pp. 6222–6231. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02102>
25. Honda M., Kageyama H., Hibino T., Zhang Y., Diono W., Kanda H., Yamaguchi R., Takemura R., Fukaya T., Goto M. Improved carotenoid processing with sustainable solvents utilizing Z-isomerization-induced alteration in physicochemical properties: a review and future directions. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 11, p. 2149. <https://doi.org/10.3390/molecules24112149>
26. Li Y., Sommerfeld M., Chen F., Hu Q. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Plant Physiology*, 2008, vol. 165, no. 17, pp. 1783–1797. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.007>
27. Steinbrenner J., Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*, 2001, vol. 125, no. 2, pp. 810–817. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.810>

Информация об авторах

Самович Татьяна Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: samovich77@gmail.com

Вязов Евгений Викторович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yauhen.viazau@gmail.com

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

Печёнкина Елизавета Ивановна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: eliza9214504@mail.ru

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

Information about the authors

Tatsiana V. Samovich – 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: samovich77@gmail.com

Yauhen V. Viazau – 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: yauhen.viazau@gmail.com

Ruslan G. Goncharik – 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

Elizaveta I. Pechenkina – 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: eliza9214504@mail.ru

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