

## НАКОПЛЕНИЕ АСТАКСАНТИНА В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*, ИНДУЦИРОВАННОЕ ДЕФИЦИТОМ АЗОТА И СВЕТОМ ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ<sup>1</sup>

Т. В. САМОВИЧ<sup>1</sup>), Р. Г. ГОНЧАРИК<sup>1</sup>),  
Е. И. ПЕЧЕНКИНА<sup>1</sup>), Е. В. ВЯЗОВ<sup>1</sup>), Н. В. КОЗЕЛ<sup>1</sup>)

<sup>1</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,  
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Установлено, что азотная недостаточность, инициированная на стадии покоя *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*), в сочетании со светом высокой интенсивности не является эффективным стрессовым фактором для индукции накопления астаксантина в клетках водоросли. Содержание астаксантина в клетках *H. pluvialis* при отсутствии азота было ниже, чем в образцах, культивируемых на полной среде Рудика, независимо от интенсивности освещения. Данный факт указывает на необходимость наличия некоторого количества азота в среде для функционирования системы синтеза данного пигмента. Кроме того, низкий выход астаксантина в вариантах опыта с использованием неполной среды Рудика, помимо недостатка азота для его биосинтеза, связан также со снижением уровня экспрессии гена *PSY*, кодирующего ключевой фермент цепи биосинтеза каротиноидов – фитоенсинтазу.

**Ключевые слова:** *Haematococcus pluvialis*; свет высокой интенсивности; дефицит азота; астаксантин.

<sup>1</sup>Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

### Образец цитирования:

Самович ТВ, Гончарик РГ, Печенкина ЕИ, Вязов ЕВ, Козел НВ. Накопление астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis*, индуцированное дефицитом азота и светом высокой интенсивности. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:37–45.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-37-45>

### For citation:

Samovich TV, Goncharik RG, Pechenkina EI, Viazau YaV, Kozel NV. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* cells induced by nitrogen deficiency and high light intensity. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020; 3:37–45. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-37-45>

### Авторы:

**Татьяна Викторовна Самович** – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

**Руслан Геннадьевич Гончарик** – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

**Елизавета Ивановна Печенкина** – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

**Евгений Викторович Вязов** – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

**Николай Владимирович Козел** – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией биофизики и биохимии растительной клетки.

### Authors:

**Tatyana V. Samovich**, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.  
[samovich77@gmail.com](mailto:samovich77@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0002-3469-3752>

**Ruslan G. Goncharik**, junior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.  
[rusgon@mail.ru](mailto:rusgon@mail.ru)

<https://orcid.org/0000-0002-2839-5214>

**Elizaveta I. Pechenkina**, junior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.  
[eliza9214504@mail.ru](mailto:eliza9214504@mail.ru)

<https://orcid.org/0000-0003-0757-2872>

**Yauhen V. Viazau**, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.  
[viazau@yahoo.com](mailto:viazau@yahoo.com)

<https://orcid.org/0000-0001-9750-2792>

**Nikolay V. Kozel**, PhD (biology); head of the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.  
[kozelmikalai@gmail.com](mailto:kozelmikalai@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

## ASTAXANTHIN ACCUMULATION IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* CELLS INDUCED BY NITROGEN DEFICIENCY AND HIGH LIGHT INTENSITY

T. V. SAMOVICH<sup>a</sup>, R. G. GONCHARIK<sup>a</sup>,  
E. I. PECHENKINA<sup>a</sup>, Ya. V. VIAZAU<sup>a</sup>, N. V. KOZEL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,  
27 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: T. V. Samovich (samovich77@gmail.com)

It was established that nitrogen deficiency initiated at the resting phase of *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) is not an effective stress factor in combination with high light intensity to induce the accumulation of astaxanthin in algae cells. The amounts of astaxanthin in *H. pluvialis* cells in the absence of nitrogen were lower compared to those when complete Rudic medium was used, regardless of the light intensity. This fact indicates the need for a certain amount of nitrogen in the medium for the functioning of the astaxanthin synthesis system. In addition, the low yield of astaxanthin in the experimental variants cultivated on incomplete Rudic medium is associated with the insufficient amount of nitrogen for its biosynthesis and also with a decrease in the expression level of the *PSY* gene encoding a key enzyme of the carotenoid biosynthesis chain – phytoene synthase.

**Keywords:** *Haematococcus pluvialis*; high light intensity; nitrogen deficiency; astaxanthin.

### Введение

Микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) рассматривается как наиболее эффективный продуцент каротиноида астаксантина: ее клетки способны накапливать данный пигмент в крайне высоких количествах (до 5 % от сухой массы) [1]. Астаксантин широко используется в сельском хозяйстве, пищевой и фармакологической промышленности, а также косметологии благодаря его антиоксидантным свойствам [2]. Сегодня значительная доля коммерческого астаксантина имеет искусственное происхождение, однако химически синтезированный пигмент представляет собой смесь из трех стереоизомеров и отличается от натурального гораздо меньшей биоактивностью [3; 4]. Существенно возросший в последние годы интерес к *H. pluvialis* связан с активизацией его промышленного производства в качестве источника натурального астаксантина. Более десятка крупных биотехнологических компаний по всему миру наладили получение этого антиоксиданта из клеток *H. pluvialis*. Но себестоимость выделения астаксантина из водорослей в настоящее время почти в 3 раза выше, чем затраты на выпуск синтетического продукта [5]. Поэтому исследования, направленные на увеличение как продуктивности *H. pluvialis*, так и каротиногенеза в его клетках, являются весьма актуальными. Большой интерес представляет познание природы механизмов, контролирующих процесс биосинтеза каротиноидов в клетках *H. pluvialis*.

В нормальных условиях клетки *H. pluvialis* имеют зеленую окраску, они подвижны и содержат небольшое количество астаксантина. Накопление этого пигмента в клетках водоросли происходит при воздействии на них неблагоприятных для роста факторов (свет высокой интенсивности, дефицит элементов минерального питания, высокая температура и др.) [6; 7]. В таких условиях клетки *H. pluvialis* переходят в состояние цисты, формирование которой сопровождается редукцией фотосинтетического аппарата, утолщением клеточной стенки и появлением в цитоплазме липидных включений, содержащих астаксантин в форме эфиров с жирными кислотами.

При культивировании *H. pluvialis* возникает ряд трудностей. В их числе низкий выход пигмента, невысокая скорость роста, неустойчивость существующих штаммов к контаминациям [6]. В связи с этим усилия ученых направлены на получение новых штаммов и исследование возможности повысить количество накапливаемого астаксантина, создавая условия с разными комбинациями и интенсивностью стрессовых факторов [6; 8].

В ряде работ показано, что свет высокой интенсивности в сочетании с азотным голоданием вызывает существенное увеличение содержания астаксантина в клетках *H. pluvialis* [9; 10]. Однако во всех подобных исследованиях азотную недостаточность инициировали на стадии активного роста культуры, что приводило к полному прекращению деления клеток и, соответственно, увеличения биомассы водоросли [9; 10]. Гораздо более эффективной с точки зрения выхода астаксантина является схема индукции

каротиногенеза, состоящая из двух стадий. На первой стадии (стадия активного роста) добиваются максимального прироста биомассы водоросли при нормальных условиях культивирования с последующим переходом клеток в неподвижное состояние. На второй стадии (стадия покоя) полученную культуру выносят на свет высокой интенсивности для индукции накопления астаксантина в клетках водоросли. В настоящем исследовании в дополнение к воздействию света высокой интенсивности на второй стадии была инициирована азотная недостаточность.

Таким образом, цель данной работы – выявление особенностей каротиногенеза в клетках гематококка (*H. pluvialis*, штамм IBCE H-17) при совместном действии двух стрессовых факторов – дефицита азота и света высокой интенсивности.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали альгологически чистую культуру одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis* (штамм IBCE H-17) из коллекции микроводорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [11]. Клетки гематококка, взятые из альгологической коллекции, стерильно пересеивали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ВВМ, подращивали на свету в течение 7–10 сут при температуре  $(23 \pm 2)$  °С, после чего смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика [12] и выращивали в накопительном режиме при освещении люминесцентными лампами Philips TL-D 36W/54-765 (освещенность 1500 лк, 14 ч света/10 ч темноты при температуре в световом периоде  $(23 \pm 2)$  °С). Через 10–14 сут выращивания суспензию гематококка, содержащую около 80 % неподвижных клеток, использовали в экспериментах. При этом часть клеток переводили на свежую среду Рудика, остальные – на среду Рудика без азота и культивировали оба варианта при нормальном освещении (1500 лк) и освещении высокой интенсивности (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 с помощью камеры Горяева. Диаметр клеток гематококка определяли с использованием микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2, а также программного обеспечения *NIS-Elements Advanced Solutions v. 4.40* (Nikon, Япония).

Качественную и количественную оценку содержания хлорофиллов и каротиноидов в образцах проводили с помощью хроматографа высокого давления LC-20 Prominence (*Shimadzu*, Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (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 [13; 14]. Содержание пигментов определяли спектрофотометрически, применяя 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, найденные с помощью программного обеспечения *Shimadzu LC Solution*, использовали для количественного определения пигментов. Астаксантин с жирными кислотами образует большое количество эфиров. В связи с этим для точного количественного определения последнего проводили процедуру сапонификации. После сапонификации жирные кислоты отщепляются и астаксантин выходит в виде нескольких стереоизомеров, среди которых преобладает трансастаксантин [15].

Для определения уровня экспрессии генов *PSY* и *CHY*, кодирующих в клетках *H. pluvialis* ключевые ферменты биосинтеза каротиноидов – фитоенсинтазу и β-каротингидроксилазу соответственно, выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzol G™ (*AppliChem*, Германия), синтезировали кДНК с использованием ProtoScript II Reverse Transcriptase (*New England BioLabs*, США) в амплификаторе MJ Mini (*Bio-Rad*, США). Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР-анализа в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением генспецифических праймеров и гена-нормализатора, кодирующего актин. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 1 мкл кДНК, 10 пмоль каждого праймера, 4 мкл 2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EvaGreen («Синтол», Россия) и воду. ПЦР-РВ проводили с помощью термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler с оптическим реакционным модулем CFX96 (*Bio-Rad*, США) по следующей схеме: предварительная денатурация – 95 °С, 5 мин; плавление – 95 °С, 15 с; отжиг – 55–61 °С, 45 с. Количество циклов амплификации – 40. Обработка полученных результатов выполнялась в программе *Bio-Rad CFX Maestro* [16].

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

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы были проанализированы продуктивность *H. pluvialis* и морфометрические показатели клеток микроводоросли при совместном действии на них дефицита азота в среде культивирования и света высокой интенсивности.

Установлено, что через 21 сут эксперимента количество клеток в суспензии уменьшилось во всех опытных вариантах. Более значительное снижение отмечено в образцах, культивируемых на полной среде Рудика, вне зависимости от интенсивности освещения (рис. 1, а). В этих же образцах наблюдалось увеличение диаметра клеток водоросли, что является признаком стрессового состояния последних [17]. В вариантах эксперимента на среде Рудика без азота количество клеток несколько снижалось, но их диаметр не изменялся по сравнению с начальными значениями (см. рис. 1, б).

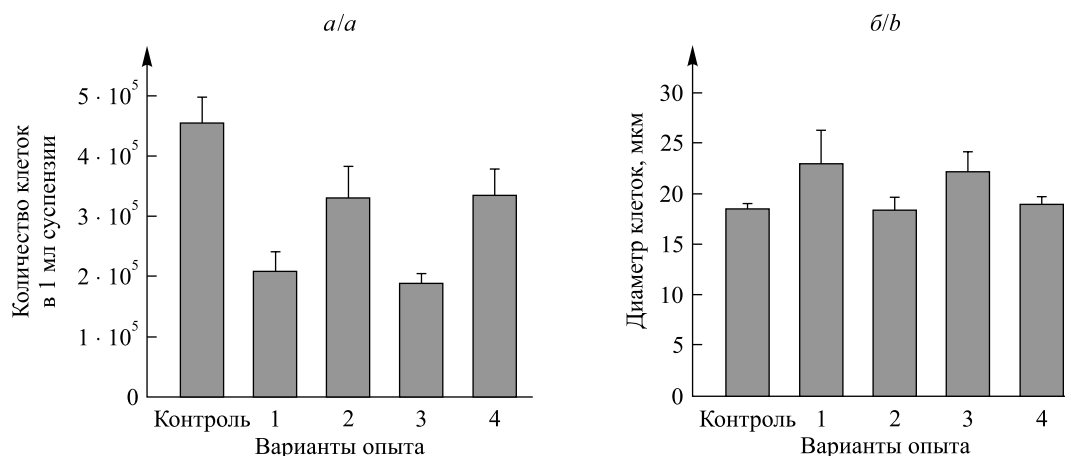


Рис. 1. Количество (а) и диаметр (б) клеток *H. pluvialis* в начале (контроль) и через 21 сут эксперимента на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4) при освещенности 1500 лк (варианты 1, 2) и 10 000 лк (варианты 3, 4)

Fig. 1. The number of *H. pluvialis* cells in 1 ml of suspension (а) and their diameter (б) at the beginning (control) and after 21 d of the experiment in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and in Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4) with illuminance of 1500 lx (cultures 1, 2) and 10 000 lx (cultures 3, 4)

Содержание хлорофилла и каротиноидов в клетках *H. pluvialis* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ пигментных экстрактов суспензии *H. pluvialis* позволил выявить в исследуемых препаратах наличие каротиноидов (неоксантина, виолаксантина, лютеина и β-каротина) и хлорофиллов *a* и *b* (табл. 1).

Показано, что через 21 сут эксперимента во всех опытных вариантах происходило существенное снижение содержания как хлорофиллов *a* и *b*, так и каротиноидов по сравнению с исходной культурой (см. табл. 1). Однако наибольшая убыль пигментов была зафиксирована для вариантов с дефицитом азота. Так, если в образцах, культивируемых на полной среде Рудика, через 21 сут содержание фотосинтетических пигментов снижалось в 3–4 раза по сравнению с исходной культурой, то в образцах, культивируемых на среде, дефицитной по азоту, – в 5–7 раз.

Таблица 1

Содержание пигментов в клетках *H. pluvialis* на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (1500 лк, варианты 1 и 2) и свету высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4), мкг на 1 мл суспензии

Table 1

The pigment content in *H. pluvialis* cells in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4) after incubation for 21 d under normal light (1500 lx, cultures 1 and 2) and in high-intensity light (10 000 lx, cultures 3 and 4), μg in 1 mL of suspension

Пигменты	Исходная культура	Варианты опыта			
		1	2	3	4
Неоксантин	0,150 ± 0,006	0,043 ± 0,004	0,035 ± 0,001	0,056 ± 0,021	0,027 ± 0,004
Виолаксантин	0,091 ± 0,022	0,037 ± 0,006	0,032 ± 0,005	0,046 ± 0,022	0,023 ± 0,006

Окончание табл. 1  
Ending table 1

Пигменты	Исходная культура	Варианты опыта			
		1	2	3	4
Лютеин	1,001 ± 0,068	0,210 ± 0,021	0,216 ± 0,008	0,344 ± 0,163	0,204 ± 0,013
Хлорофилл <i>b</i>	3,252 ± 0,420	0,733 ± 0,130	0,467 ± 0,013	0,712 ± 0,330	0,428 ± 0,065
Хлорофилл <i>a</i>	6,223 ± 0,310	1,503 ± 0,245	1,049 ± 0,031	1,691 ± 0,737	0,886 ± 0,129
β-Каротин	0,600 ± 0,012	0,373 ± 0,218	0,100 ± 0,004	0,186 ± 0,084	0,088 ± 0,016
Сумма хлорофиллов	9,475 ± 0,738	2,237 ± 0,374	1,515 ± 0,044	2,403 ± 1,063	1,315 ± 0,195
Сумма каротиноидов	1,841 ± 0,085	0,663 ± 0,223	0,383 ± 0,015	0,631 ± 0,290	0,343 ± 0,036
Отношение каротиноидов к хлорофиллам	0,19	0,29	0,25	0,26	0,26

При исследовании эффективности каротиногенеза в клетках *H. pluvialis* важным является показатель, отражающий отношение общего содержания каротиноидов к общему содержанию хлорофиллов. В наших экспериментах мы зарегистрировали увеличение данного показателя на 30–50 % в зависимости от условий культивирования по сравнению с исходной культурой (см. табл. 1). Поддержание примерно постоянного значения отношения каротиноидов к хлорофиллам в нормальных условиях культивирования *H. pluvialis* объясняется тем, что в норме в клетках присутствуют только каротиноиды, ассоциированные с фотосинтетическим аппаратом пластид в пигмент-белковых комплексах. Между различными компонентами пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата соблюдается строгая стехиометрия, за счет чего сохраняется соотношение пигментов [18; 19]. Индукция формирования гематоцист, сопровождающаяся индукцией синтеза астаксантина, структурно и функционально не связанного с фотосинтетическим аппаратом (т. е. соответствующего определению вторичных каротиноидов), приводит к нарушению стехиометрии между пигментами, в результате чего отношение каротиноидов к хлорофиллам возрастает, что также подтверждается литературными данными [20].

В целях исследования перспективности использования сочетанного действия дефицита азота и света высокой интенсивности в качестве индуктора накопления астаксантина в клетках *H. pluvialis* определяли количество непосредственно накопившегося в клетках водоросли пигмента. В исходной культуре (начало эксперимента) были зарегистрированы следовые количества астаксантина. Однако после 21 сут культивирования в вариантах опыта на полной среде Рудика как на ярком свете, так и при нормальном освещении выявлено значительное накопление этого пигмента в клетках *H. pluvialis* (рис. 2). В вариантах эксперимента, полностью лишенных азота, содержание астаксантина в клетках было существенно ниже (более чем в 5 раз) по сравнению с опытными вариантами на полной среде Рудика независимо от интенсивности освещения, что видно в том числе и по окраске культуры (рис. 3). Данный факт указывает на необходимость наличия некоторого количества азота в среде для функционирования системы синтеза астаксантина, что подтверждается литературными данными [8].

Также нами было проведено исследование уровня экспрессии генов *PSY* и *CHY*, кодирующих ферменты биосинтеза астаксантина – фитоенсинтазу и β-каротингидроксилазу соответственно, в клетках *H. pluvialis* при совместном действии дефицита азота в среде культивирования и света высокой интенсивности в течение 21 сут. Последовательности праймеров, специфичных к генам *PSY* и *CHY*, а также к гену, кодирующему актин (ген-нормализатор), рассчитывали и оптимизировали в указанных условиях, используя литературные данные [21] (табл. 2). Праймеры синтезировали в лаборатории ДНК-праймеров Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

В вариантах опыта на среде Рудика без азота независимо от интенсивности освещения мы регистрировали существенное снижение в клетках *H. pluvialis* уровня экспрессии гена *PSY* относительно контроля (табл. 3). При этом экспрессия гена *CHY* была значительно выше в вариантах опыта, лишенных азота, вне зависимости от интенсивности освещения (см. табл. 3). Отметим, что катализируемая фитоенсинтазой конденсация двух молекул геранилгеранилпирофосфата с образованием фитоена может являться лимитирующей стадией биосинтеза каротиноидов, поскольку этот фермент есть только у *de novo* синтезирующих каротиноиды организмов. Снижение уровня экспрессии гена *PSY* может быть причиной низкого выхода астаксантина в вариантах опыта с азотной недостаточностью.

Таблица 2

Характеристики используемых праймеров

Table 2

Characteristics of the primers used

Гены	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Температура отжига, °С	Длина продукта, п. н.
<i>CHY</i>	FW – CTACACCACAGCGGCAAGTA	55	521
	RV – GCCTCACCTGATCCTACCAA		
<i>PSY</i>	FW – ATGTACCATCCCAAGGCAAC	60	402
	RV – CTGGACCAGGCCTACGAC		
Ген актина (нормализатор)	FW – AGCGGGAGATAGTGCGGGACA RV – ATGCCACCGCCTCCATGC	61	200

Примечание. FW – прямой праймер; RV – обратный праймер; п. н. – пар нуклеотидов.

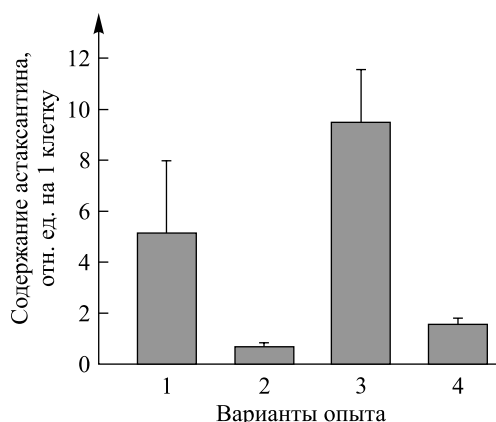


Рис. 2. Количество астаксантина в клетках *H. pluvialis* через 21 сут эксперимента на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4), при освещенности 1500 лк (варианты 1, 2) и 10 000 лк (варианты 3, 4)

Fig. 2. The amount of astaxanthin in *H. pluvialis* cells after 21 d of the experiment in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and in Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4), with illumination of 1500 lx (cultures 1, 2) and 10 000 lx (cultures 3, 4)



Рис. 3. Суспензия *H. pluvialis* на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (1500 лк, варианты 1 и 2) и свету высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Fig. 3. Suspension of *H. pluvialis* in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and in Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4) after incubation for 21 d under normal light (1500 lx, cultures 1 and 2) and in high-intensity light (10 000 lx, cultures 3 and 4)

Таблица 3

Экспрессия генов β-каротингидроксилазы и фитоенсиназы в клетках *H. pluvialis* на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (1500 лк, варианты 1 и 2) и свету высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Table 3

Expression of the β-carotene hydroxylase and phytoene synthase genes in *H. pluvialis* cells in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and in Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4) after incubation for 21 d in normal light (1500 lx, cultures 1 and 2) and in high-intensity light (10 000 lx, cultures 3 and 4)

Варианты опыта	Фитоенсиназа	β-Каротингидроксилаза
1	2,62 ± 1,84	1,2 ± 0,21
2	0,71 ± 0,44	20,6 ± 8,19
3	4,39 ± 2,79	2,03 ± 1,04
4	0,15 ± 0,06	6,27 ± 1,75

### Заклучение

Таким образом, установлено, что азотная недостаточность, инициированная на стадии покоя *H. pluvialis*, в сочетании со светом высокой интенсивности не является эффективным стрессовым фактором для индукции астаксантина в клетках водоросли. При этом важно отметить, что количества астаксантина в клетках *H. pluvialis* при отсутствии азота были ниже, чем в образцах, культивируемых на полной среде Рудика, независимо от интенсивности освещения. Этот факт указывает на необходимость наличия некоторого количества азота в среде для функционирования системы синтеза астаксантина, что подтверждается литературными данными. Кроме того, низкий выход астаксантина в вариантах эксперимента с использованием неполной среды Рудика, помимо недостатка азота для его биосинтеза, связан также со снижением уровня экспрессии гена *PSY*, кодирующего ключевой фермент цепи биосинтеза каротиноидов – фитоенсиназу.

### Библиографические ссылки

1. Hagen C, Grünewald K, Schmidt S, Müller J. Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *European Journal of Phycology*. 2000;35(1):75–82. DOI: 10.1080/09670260010001735651.
2. Shimidzu N, Goto M, Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*. 1996;62(1):134–137. DOI: 10.2331/fishsci.62.134.
3. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(5):210–216. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00078-7.
4. Yuan J-P, Chen F. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques*. 1997;11(7):455–459. DOI: 10.1023/A:1018441411746.
5. Carlsson AS, van Beilen JB, Möller R, Clayton D. *Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project*. Bowles D, editor. Newbury: CPL Press; 2007. 86 p.
6. Han D, Li Y, Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*. 2013;28(2):131–147. DOI: 10.4490/algae.2013.28.2.131.
7. Imamoglu A, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*. 2009;26(3–4):199–204. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.08.007.
8. Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*. 2005;96(3):373–378. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.04.006.
9. Dong Q, Zhao X, Xing X, Hu J, Gong J. Concomitant NH<sub>4</sub><sup>+</sup> secretion during astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* under high irradiance and nitrogen deficient conditions. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2007;15(2):162–166. DOI: 10.1016/S1004-9541(07)60052-4.
10. Scibilia L, Girolomoni L, Berteotti S, Alboresi A, Ballottari M. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*. 2015;12:170–181. DOI: 10.1016/j.algal.2015.08.024.

11. Мельников СС, Мананкина ЕЕ, Будакова ЕА, Шальго НВ, составители. *Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей*. Минск: Белорусская наука; 2011. 101 с.
12. Imamoglu E, Vardar Sukan F, Conk Dalay M. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Science*. 2007;1(3):05–09.
13. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 58 p. (HarvestPlus technical monograph. Series 2).
14. Milenković SM, Zvezdanović JB, Anđelković TD, Marković DZ. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*. 2012;1(1):16–24.
15. 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;47(1):31–35. DOI: 10.1021/jf980465x.
16. Доманская ИН, Радюк МС, Будакова ЕА, Самович ТВ, Спивак ЕА, Шальго НВ. *Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе*. Минск: Право и экономика; 2011. 31 с.
17. 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 fermentation and bioengineering*. 1992;74(6):403–405. DOI: 10.1016/0922-338X(92)90041-R.
18. Dainese P, Bassi R. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll *a/b* binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(13):8136–8142.
19. Peter GF, Thornber JP. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(25):16745–16754.
20. Solovchenko AE, Chivkunova OB, Maslova IP. Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011;58(1):9–17. DOI: 10.1134/S1021443710061056.
21. Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green algae *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(6):1409–1418. DOI: 10.1093/jxb/ern048.

## References

1. Hagen C, Grünewald K, Schmidt S, Müller J. Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *European Journal of Phycology*. 2000;35(1):75–82. DOI: 10.1080/09670260010001735651.
2. Shimidzu N, Goto M, Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*. 1996;62(1):134–137. DOI: 10.2331/fishsci.62.134.
3. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(5):210–216. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00078-7.
4. Yuan J-P, Chen F. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques*. 1997;11(7):455–459. DOI: 10.1023/A:1018441411746.
5. Carlsson AS, van Beilen JB, Möller R, Clayton D. *Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project*. Bowles D, editor. Newbury: CPL Press; 2007. 86 p.
6. Han D, Li Y, Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*. 2013;28(2):131–147. DOI: 10.4490/algae.2013.28.2.131.
7. Imamoglu A, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*. 2009;26(3–4):199–204. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.08.007.
8. Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*. 2005;96(3):373–378. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.04.006.
9. Dong Q, Zhao X, Xing X, Hu J, Gong J. Concomitant  $\text{NH}_4^+$  secretion during astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* under high irradiance and nitrogen deficient conditions. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2007;15(2):162–166. DOI: 10.1016/S1004-9541(07)60052-4.
10. Scibilia L, Girolomoni L, Berteotti S, Alboresi A, Ballottari M. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*. 2015;12:170–181. DOI: 10.1016/j.algal.2015.08.024.
11. Mel'nikov SS, Manankina EE, Budakova EA, Shalygo NV, compilers. *Katalog geneticheskogo fonda khozyaistvenno poleznykh vidov vodoroslei* [Catalogue of the genetic fund of economically useful species of algae]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2011. 101 p. Russian.
12. Imamoglu E, Vardar Sukan F, Conk Dalay M. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Science*. 2007;1(3):05–09.
13. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 58 p. (HarvestPlus technical monograph. Series 2).
14. Milenković SM, Zvezdanović JB, Anđelković TD, Marković DZ. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*. 2012;1(1):16–24.
15. 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;47(1):31–35. DOI: 10.1021/jf980465x.
16. Domanskaya IN, Radyuk MS, Budakova EA, Samovich TV, Spivak EA, Shalygo NV. *Tekhnologiya DNK-tipirovaniya genov ustoichivosti yachmenya k zasukhe* [DNA typing technology for genes of barley resistance to drought]. Minsk: Pravo i ekonomika; 2011. 31 p. Russian.
17. 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 fermentation and bioengineering*. 1992;74(6):403–405. DOI: 10.1016/0922-338X(92)90041-R.



18. Dainese P, Bassi R. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll *a/b* binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(13):8136–8142.
19. Peter GF, Thornber JP. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(25):16745–16754.
20. Solovchenko AE, Chivkunova OB, Maslova IP. Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011;58(1):9–17. DOI: 10.1134/S1021443710061056.
21. Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green algae *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(6):1409–1418. DOI: 10.1093/jxb/ern048.

Статья поступила в редколлегию 30.06.2020.  
Received by editorial board 30.06.2020.