

ВЛИЯНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*¹

Е. И. ПЕЧЕНКИНА¹⁾, Т. В. САМОВИЧ¹⁾, Н. В. КОЗЕЛ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Установлена стимуляция синтеза астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis* светом высокой интенсивности в сочетании с действием фотосенсибилизатора бенгальского розового. Выявлено, что при использовании бенгальского розового в качестве дополнительного индуктора каротиногенеза на свету высокой интенсивности происходит увеличение сухого веса гематококка, а также диаметра клеток в суспензии по сравнению с эффектом действия на клетки водоросли только света высокой интенсивности. Наблюдаемые приросты сухого веса существенны: превышение над контролем достигает 40 %. Высказано предположение, что увеличение сухого веса, диаметра клеток гематококка и выхода астаксантина при добавлении в среду инкубации *H. pluvialis* фотосенсибилизатора на фоне действия света высокой интенсивности связано не с усилением стрессового воздействия (так как использованные концентрации бенгальского розового слишком малы для индукции фотоокислительного стресса), а с сигнальными свойствами генерируемого бенгальским розовым синглетного кислорода, который может являться первичным агентом в трансдукции сигнала, запускающего повышенный синтез астаксантина в клетках *H. pluvialis*.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*; каротиногенез; астаксантин; окислительный стресс; активные формы кислорода; бенгальский розовый; синглетный кислород.

¹⁾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:

Печенкина ЕИ, Самович ТВ, Козел НВ. Влияние фотосенсибилизатора бенгальского розового на продуктивность и пигментный состав *Haematococcus pluvialis*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1: 58–69.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-58-69>

For citation:

Pechenkina EI, Samovich TV, Kozel NV. The influence of Rose Bengal photosensitizer on the productivity and pigment composition of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;1:58–69. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-58-69>

Авторы:

Елизавета Ивановна Печенкина – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.
Татьяна Викторовна Самович – 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:

Elizaveta I. Pechenkina, junior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
eliza9214504@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0757-2872>
Tatyana V. Samovich, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
samovich77@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3469-3752>
Nikolay V. Kozel, PhD (biology); head of the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
kozel.mikalai@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

THE INFLUENCE OF ROSE BENGAL PHOTOSENSITIZER ON THE PRODUCTIVITY AND PIGMENT COMPOSITION OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

E. I. PECHENKINA^a, T. V. SAMOVICH^a, N. V. KOZEL^a

^aInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademicheskaya Street, Minsk 220072, Belarus
Corresponding author: N. V. Kozel (kozel.mikalai@gmail.com)

The stimulation of astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* cells under high-intensity light in the combined action of Rose Bengal photosensitizer has been established. It was revealed that when Rose Bengal was used as an additional inducer of carotenogenesis in high-intensity light, the dry weight of the *Haematococcus* and the diameter of the cells in suspension increase compared to the action of only high-intensity light on algae cells. The observed increases in dry weight are significant and reach 40 % excess over control. We suggest that the increase in dry weight, *Haematococcus* cell diameter and astaxanthin yield when *H. pluvialis* photosensitizer is added to the incubation medium against the background of high-intensity light is not associated with increased stress (since the used concentrations of Rose Bengal are too small to induce photo-oxidative stress), but the signaling properties of the generated Rose Bengal singlet oxygen, which may be the primary agent in the transduction of a signal that triggers increased synthesis of astaxanthin in *H. pluvialis* cells.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; carotenogenesis; astaxanthin; oxidative stress; reactive oxygen species; Rose Bengal; singlet oxygen.

Введение

Микроводоросль *Haematococcus pluvialis* является одним из наиболее перспективных натуральных источников кетокаротиноида астаксантина (3,3'-дигидрокси-β,β-каротин-4,4'-диона) – красного пигмента, широко используемого в сельском хозяйстве, пищевой и фармакологической промышленности, а также косметологии благодаря его чрезвычайно высокой антиоксидантной активности [1; 2]. Содержание астаксантина в клетках *H. pluvialis* составляет 2–5 % от сухой массы водоросли [3; 4]. Химически синтезированный астаксантин, представляющий собой смесь трех стереоизомеров, отличается от натурального структурно и обладает гораздо меньшей биоактивностью, чем природный пигмент [5–7]. Значительно возросший в последние годы интерес к *H. pluvialis* связан с его промышленным производством, поиском способов увеличения общей продуктивности и выхода астаксантина, а также с желанием познать природу механизмов, контролирующих эти процессы.

Астаксантин, один из наиболее эффективных среди известных на сегодняшний день природных антиоксидантов, относится к каротиноидам. Установлено, что антиоксидантная активность астаксантина в определенных условиях на порядок выше, чем у β-каротина и α-токоферола [2; 8; 9]. В отличие от β-каротина астаксантин не является провитамином А, поэтому норму его суточного потребления по медицинским показаниям можно увеличивать до 20 мг без угрозы побочных эффектов, характерных для высоких концентраций витамина А [2; 10; 11]. Кроме того, астаксантин обладает ярко выраженным противовоспалительным действием, а также способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, что определяет его эффективность при профилактике и лечении заболеваний центральной нервной системы [2].

В нормальных условиях клетки гематококка имеют зеленую окраску и являются достаточно подвижными. Однако при попадании в неблагоприятные, стрессовые условия они прекращают рост, превращаясь в неподвижные цисты, и начинают накапливать астаксантин для защиты от повышения внутриклеточного окислительного потенциала, которое обусловлено индуцированным стрессом. При этом клетки водоросли приобретают насыщенно-красный цвет. В нормальных условиях астаксантин накапливается в хлоропластах, в стрессовых условиях – в липидных везикулах в цитозоле.

Наиболее важной проблемой при культивировании гематококка в промышленных масштабах является повышение эффективности продукции клетками микроводоросли астаксантин. Есть два основных подхода к решению этой проблемы – изменение клеточного метаболизма путем генетической модификации (чаще всего речь идет о мутагенезе), а также увеличение выхода астаксантин за счет оптимизации условий культивирования водоросли с применением определенных химических агентов. Первый способ хотя и более эффективен, но крайне трудоемок и длителен, поэтому в своем исследовании

мы обратились к регуляции метаболизма клеток гематококка путем внесения в культуральную среду красителя-фотосенсибилизатора бенгальского розового (БР или RB), способного на свету генерировать молекулярный синглетный кислород [12] и тем самым вызывать накопление в клетках водоросли астаксантина [13]. Исследование этого процесса, а именно влияния фотосенсибилизатора БР на накопление астаксантина в клетках микроводоросли *H. pluvialis*, стало целью данной работы.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований служила альгологически чистая культура одноклеточной зеленой жгутиковой микроводоросли *H. pluvialis* (штамм IBCE H-17) из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [14]. Культуру гематококка стерильно пересевали на чашки Петри с твердой питательной средой ВВМ [15]. Чашки выносили на свет, подрашивали культуру гематококка в течение 5–7 дней при температуре (23 ± 2) °C. После этого клетки водоросли смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика [16] объемом 250–300 мл, выращивали в накопительном режиме при освещении светодиодными лампами белого дневного света (цветовая температура 4000 K) с интенсивностью 20 микромолей квантов на квадратный метр за секунду (далее – мкмоль · м⁻² · с⁻¹) и фотопериодом 14 ч света/10 ч темноты в течение суток. Температура в световом периоде (23 ± 1) °C. Культуру гематококка барботировали (продували воздухом) с помощью компрессора для аквариумов АСО-9903 (*Hailea*, Китай), подающего 4,2 л воздуха в минуту. Через 4–5 сут выращивания супензию гематококка, находящуюся в стадии активного роста и содержащую около 80 % подвижных клеток, использовали в экспериментах. Для подсчета количества клеток гематококка в супензии использовали камеру Горяева. Продуктивность *H. pluvialis* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию супензий водоросли в красной области спектра при 680 и 750 нм на спектрофотометре Solar PB 2201 (ЗАО «Солар», Беларусь). Поглощение при 680 нм соответствует максимуму поглощения хлорофиллов, а поглощение при 750 нм определяется в основном светорассеянием на клетках *H. pluvialis*. Для количественного расчета сухой массы *H. pluvialis* (в миллиграммах на миллилитр) использовали формулу, описанную Т. Кацудой (T. Katsuda) с соавторами в работе [17]:

$$\text{Сухой вес} = (3,04 \cdot \frac{\text{ОП}_{750} - \text{ОП}_{680}}{\text{ОП}_{680}} + 1,4) \cdot \text{ОП}_{680},$$

где ОП₆₈₀ и ОП₇₅₀ – оптическая плотность при 680 и 750 нм соответственно.

Отметим, что нами была проведена оценка корректности применения этой формулы для исследуемого штамма *H. pluvialis* и спектрофотометра Solar PB 2201, заключавшаяся в сопоставлении расчетных величин и фактических значений сухой массы *H. pluvialis* после высушивания водоросли. Проведенный анализ подтвердил высокую точность расчета сухого веса водоросли согласно такому подходу. Диаметр клеток гематококка определяли на персональном компьютере программным методом с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2 (после проведения предварительной калибровки), используя программное обеспечение *NIS-Elements v.4.40* (Nikon, Япония). Для получения статистически достоверных значений устанавливали диаметр не менее 50 клеток, после чего рассчитывали среднее арифметическое и стандартное отклонение среднего арифметического.

Пигментный состав клеток *H. pluvialis* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ или HPLC), модифицированным в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси согласно работам [17–21].

При проведении ВЭЖХ использовали следующие реагенты и растворы: 100 % ацетон; раствор *A*, содержащий 90 % ацетонитрила, 9,9 % фильтрованной дистиллированной воды (фильтр – нейлоновая мембрана с диаметром пор $d = 0,45$ мкм), 0,1 % триэтиламина; раствор *B*, представляющий собой 100 % этилацетат. ВЭЖХ осуществляли с помощью хроматографа серии LC-20 Prominence (*Shimadzu*, Япония), используя хроматографическую колонку типа C18 Nucleodur C18 Gravity (размер частиц 5 мкм, длина колонки 15 см) производства компании *Macherey-Nagel* (Германия).

Для извлечения фотосинтетических пигментов клетки *H. pluvialis* осаждали 10 мин при 17 000 g на центрифуге Heraeus Pico 17 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, США). Осадок помещали в охлажденные (4 °C) фарфоровые ступки, добавляли 100 мг кварцевого песка, приливали 0,5 мл 100 % ацетона и растирали до гомогената. Полученный гомогенат переносили в эпандорфы объемом 2 мл. Ступки смывали 1,5 мл 100 % ацетона. Если объем супернатанта был менее 2 мл, то его доводили до 2 мл 100 % ацетоном. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 17 000 g. Супернатант переносили в мерные пробирки. Осадок ресусцидировали с ацетоном и центрифугировали 10 мин при 17 000 g. Процедуру повторяли до получения бесцветного супернатанта и осадка. Фиксировали конечный объем раствора пигментов.

Для извлечения астаксантина клетки *H. pluvialis* осаждали 10 мин при 17 000 g на центрифуге Heraeus Pico 17. Осадок ресуспенсировали с добавлением кварцевого песка и 2 мл метанола в течение 5 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 17 000 g. Процедуру повторяли до получения бесцветного супернатанта и осадка. Фиксировали конечный объем раствора пигментов. Астаксантин с жирными кислотами образует большое количество эфиров, в связи с чем для количественного определения пигмента требуется проведение процедуры сапонификации. После сапонификации жирные кислоты отщепляются и астаксантин выходит в виде нескольких стереоизомеров, среди которых преобладает транс-астаксантин [22]. Для сапонификации к 1,0 мл суммарного экстракта добавляли 20 мкл 1 моль/л KOH и оставляли в темноте на 6 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт использовали для хроматографии.

В виалы для хроматографии вносили по 0,5 мл супернатанта и помещали их в камеру хроматографа. Объем инъекции составлял 50 мкл. Разделение пигментов в колонке проводили с использованием растворов *A* и *B* с потоком 0,5 мл/мин согласно программе (табл. 1).

Таблица 1

**Программа изменения концентрации растворителей
для разделения фотосинтетических пигментов
на хроматографической колонке Nucleodur C18 Gravity**

Table 1

**The program for changing of the concentration
of solvents for separation of photosynthetic pigments
on a Nucleodur C18 Gravity chromatographic column**

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	Раствор <i>A</i> , %	Раствор <i>B</i> , %	Режим
0,01	0,5	100	0	Линейный градиент
15,0	0,5	0	100	Изократический режим
18,0	0,5	0	100	Линейный градиент
19,0	0,5	100	0	Изократический режим
25,0	0,5	100	0	Остановка

Пигменты регистрировали спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей SPD-M20A (*Shimadzu*) в диапазоне 200–800 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 и 650 нм (для фотосинтетических пигментов), а также 475 нм (для астаксантина). Для количественного определения пигментов применяли стандарты пигментов неоксантина, виолаксантина, лютеина, астаксантина, β -каротина, хлорофилла *a* и хлорофилла *b*.

В работе были использованы следующие реагенты: ацетон «х. ч.» ($\geq 99,8\%$) производства АО «Экос-1» (Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$) и этилацетат для ВЭЖХ ($\geq 99,7\%$) компании *Honeywell* (Германия), триэтиламин ($\geq 99,5\%$) фирмы *AppliChem* (Германия), стандарты фотосинтетических пигментов производства *Sigma-Aldrich* (Германия). В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее, стандартное отклонение среднего. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$) и соответствующего числа степеней свободы. Представлены результаты 3 опытов в 3-кратной биологической повторности. При проведении морфометрических исследований и определении сухого веса количество независимых повторностей было больше десяти. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ *Excel 2019*, *SigmaPlot 12.0* и статистические методы, принятые в области биологических исследований [23].

Результаты и их обсуждение

Как известно, БР имеет один из самых высоких квантовых выходов генерации синглетного кислорода среди существующих фотосенсибилизаторов и при этом наиболее благоприятный с точки зрения индукции фотоокислительного стресса в растительных системах спектр поглощения с максимумом в зеленой области. Однако в предварительных экспериментах по индукции каротиногенеза этим фотосенсибилизатором было установлено, что высокие концентрации БР в среде инкубации водоросли, вызывающие фотоокислительный стресс, приводят не только к индукции синтеза астаксантинов в клетках гематококка, но и к существенному уменьшению количества клеток. Такая стимуляция каротиногенеза оказалась менее эффективной по сравнению с наиболее распространенным способом – действием

света высокой интенсивности (более $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Однако нами было также выявлено, что использование малых концентраций фотосенсибилизатора на фоне действия света высокой интенсивности ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) приводит к увеличению продукции астаксантином гематококком, что видно по интенсивности окраски суспензии водоросли (рис. 1). В последующих экспериментах исследовали именно такой способ запуска синтеза астаксантином в клетках гематококка, выдвинув предположение, что стимуляция накопления каротиноидов связана не с фототоксичными свойствами БР, а с сигнальной функцией синглетного кислорода, который эффективно генерируется на свету в присутствии фотосенсибилизатора.

Для индукции накопления астаксантином в клетках гематококка мы использовали схему, состоящую из двух этапов. На первом этапе добивались максимального прироста биомассы водоросли при нормальных условиях культивирования с последующим переходом клеток в неподвижное состояние (стадия активного роста). На втором этапе выносили полученную культуру на свет высокой интенсивности для индукции накопления астаксантином в клетках водоросли. Фотосенсибилизатор вводили непосредственно в суспензию перед помещением культуры на свет высокой интенсивности. Контролем служила культура с фотосенсибилизатором или без него, находившаяся под нормальным освещением, либо культура без фотосенсибилизатора, выращенная на свету высокой интенсивности.

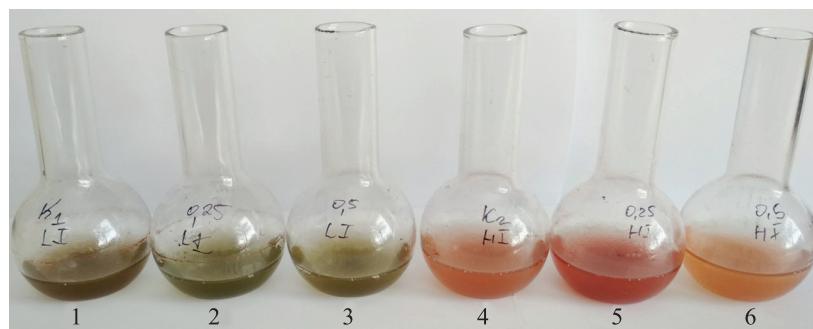


Рис. 1. Суспензия *H. pluvialis* после инкубации на свету высокой интенсивности ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, варианты 4–6) и при нормальном освещении (варианты 1–3) с предварительным добавлением в культуральную среду фотосенсибилизатора БР в разной концентрации: варианты 1 и 4 – 0 мкмоль/л (контроль); варианты 2 и 5 – 0,25 мкмоль/л; варианты 3 и 6 – 0,5 мкмоль/л

Fig. 1. Suspension of *H. pluvialis* after incubation under high-intensity light ($120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, options 4–6) and under normal lighting (options 1–3) with preliminary addition of RB photosensitizer in different concentrations to the culture medium: options 1 and 4 – 0 $\mu\text{mol/L}$ (control); options 2 and 5 – 0.25 $\mu\text{mol/L}$; options 3 and 6 – 0.5 $\mu\text{mol/L}$

Далее при исследовании действия БР как индуктора накопления астаксантином в клетках гематококка определяли количество и размер клеток *H. pluvialis*, а также сухой вес водоросли. Экспериментальные данные представлены в табл. 2. Выявлено увеличение сухого веса гематококка при использовании фотосенсибилизатора БР в качестве дополнительного к свету высокой интенсивности индуктора каротиногенеза. Превышение над контролем варьировало в зависимости от концентрации фотосенсибилизатора и количества клеток в исходной суспензии от 21 до 41 % (см. табл. 2).

Таблица 2

Влияние БР на продуктивность, диаметр и количество клеток микроводоросли *H. pluvialis*

Table 2

The effect of RB on the productivity, diameter and number of cells of the microalgae *H. pluvialis*

Варианты опыта	Интенсивность света	Концентрация БР, мкмоль/л	Сухой вес, мг/мл	Количество клеток, тыс. ед./мл	Диаметр клеток, мкм
Начало эксперимента	Низкая	–	0,47	$491,89 \pm 39,76$	$17,97 \pm 0,37$
1	Низкая	0 (контроль)	$0,37 \pm 0,02$	$320,95 \pm 17,27$	$24,74 \pm 0,34$
2	Низкая	0,25	$0,37 \pm 0,01$ (100)	$314,33 \pm 21,03$ (98)	$22,63 \pm 0,29^*$ (92)
3	Низкая	0,5	$0,36 \pm 0,04$ (97)	$335,65 \pm 50,72$ (105)	$24,34 \pm 0,32$ (98)

Окончание табл. 2
Ending table 2

Варианты опыта	Интенсивность света	Концентрация БР, мкмоль/л	Сухой вес, мг/мл	Количество клеток, тыс. ед./мл	Диаметр клеток, мкм
4	Высокая	0 (контроль)	0,24 ± 0,03	249,33 ± 35,28	26,44 ± 0,42
5	Высокая	0,25	0,34 ± 0,03* (141)	235,17 ± 14,90 (94)	27,34 ± 0,44* (103)
6	Высокая	0,5	0,29 ± 0,05* (121)	225,28 ± 31,99 (90)	24,18 ± 0,30* (92)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$. В скобках указан процент к контролю.

Установлено увеличение размера клеток *H. pluvialis* в процессе культивирования как при низкой, так и при высокой освещенности, что указывает на переход их в стадию образования цист. Из особенностей стоит отметить несколько меньшие размеры клеток водоросли при использовании БР на свету низкой интенсивности относительно соответствующего контроля и разнонаправленное изменение диаметра клеток для разных концентраций фотосенсибилизатора на свету высокой интенсивности (добавление 0,25 мкмоль/л БР приводило к достоверному увеличению диаметра клеток, а 0,5 мкмоль/л – к уменьшению (см. табл. 1)). Достоверного изменения количества клеток в опытных вариантах по сравнению с контролем не установлено (см. табл. 1).

Таким образом, исследование влияния БР на сухой вес и морфометрические показатели клеток водоросли дает основания считать целесообразным использование данного фотосенсибилизатора для повышения продукции астаксантина клетками гематококка. Об этом свидетельствует увеличение под действием БР сухого веса и диаметра клеток в суспензии. Отметим, что наблюдаемый при добавлении фотосенсибилизатора на свету высокой интенсивности эффект указывает не на усиление стрессового воздействия через индукцию БР фотоокислительного стресса, а на сигнальные свойства синглетного кислорода, который, видимо, является первичным агентом в трансдукции сигнала, запускающего защитные механизмы в клетках водоросли.

Далее из клеток в полученных суспензиях извлекли фотосинтетические пигменты, разделили последние с помощью ВЭЖХ и определили их содержание. Анализ пигментных экстрактов позволил выявить в клетках исходной культуры *H. pluvialis* наличие пигментов, участвующих в фотосинтезе, – неоксантина, виолаксантина, лютеина, хлорофиллов *a* и *b*, β -каротина. На рис. 2 представлена хроматограмма экстракта пигментов суспензии *H. pluvialis*, выращенной в нормальных условиях освещения без добавления фотосенсибилизатора, с ярко выраженным пиками неоксантина (пик 1), виолаксантина (пик 2), лютеина (пик 3), хлорофилла *b* (пик 4), хлорофилла *a* (пик 5) и β -каротина (пик 6).

На рис. 3 представлены нормированные на единицу спектры выделенных пигментов, зарегистрированные спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей.

Хроматограммы экстрактов пигментов из клеток гематококка, накопивших астаксантин, существенно отличаются от таковых для исходной культуры как до сапонификации (рис. 4), так и после нее (рис. 5). Исходя из первой хроматограммы, до сапонификации пики, принадлежащие эфирам астаксантина, накладываются на пики хлорофилловых пигментов. На второй хроматограмме видны две формы астаксантина (*транс*-, *цис*-) и β -каротин.

Для более точного определения содержания хлорофиллов *a* и *b* в условиях повышенного накопления астаксантина, эфиры которого экранируют хлорофилл, дополнительно проводили визуализацию пики хроматограммы при 650 нм, исключая таким образом из профиля хроматограммы каротиноиды, которые в этой области не поглощают свет (рис. 6). На рис. 6 видны только две полосы, принадлежащие хлорофиллу *b* (время удержания 7,90 мин) и хлорофиллу *a* (время удержания 8,55 мин). Пигменты были идентифицированы по спектрам поглощения (см. рис. 3).

Анализ содержания фотосинтетических пигментов в клетках гематококка показал, что на свету низкой интенсивности добавление БР в концентрации 0,25 и 0,5 мкмоль/л (в среде инкубации) приводит к увеличению содержания практических всех фотосинтетических пигментов – хлорофилла и каротиноидов (табл. 3). Однако на свету высокой интенсивности мы наблюдали противоположный результат: введение БР в среду инкубации вызывало существенное снижение количества хлорофилла и каротиноидов (см. табл. 3). Причем наибольшее (для некоторых пигментов 3-кратное) снижение мы наблюдали при использовании БР в концентрации 0,25 мкмоль/л. В литературе есть многочисленные сведения, указывающие на редукцию фотосинтетических пигментов, таких как хлорофилл, ксантофилловые каротиноиды неоксантин, виолаксантин и лютеин, а также β -каротин, в ответ на запуск сверхпродукции клетками водоросли астаксантина. Поэтому далее мы проанализировали содержание в экспериментальных образцах разных изомеров астаксантина.

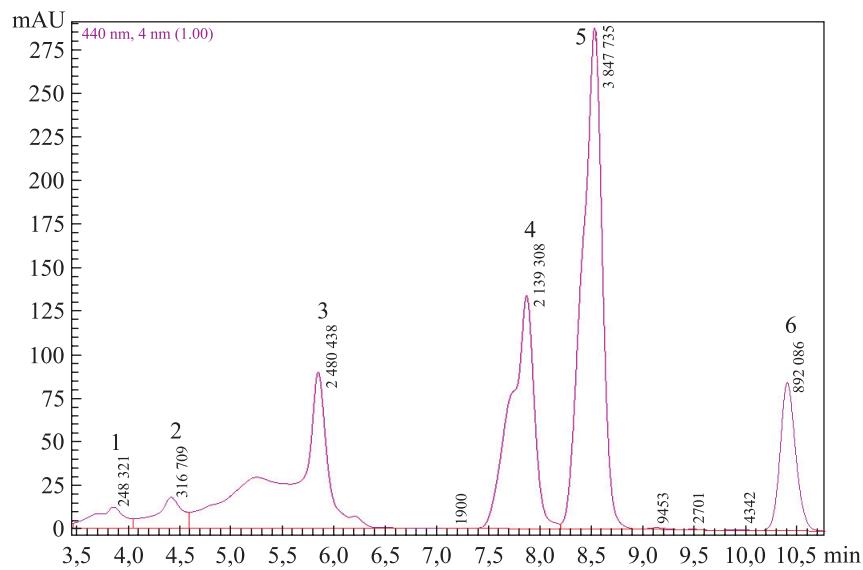


Рис. 2. Хроматограмма экстракта пигментов супензии *H. pluvialis* (исходная культура):
 пик 1 – неоксантин (время удержания 3,90 мин); пик 2 – виолаксантин (время удержания 4,45 мин);
 пик 3 – лютеин (время удержания 5,90 мин); пик 4 – хлорофилл b (время удержания 7,90 мин);
 пик 5 – хлорофилл a (время удержания 8,55 мин); пик 6 – β-каротин (время удержания 10,45 мин)

Fig. 2. Chromatogram an extract of pigments of a suspension of *H. pluvialis* (source culture):
 peak 1 – neoxanthin (retention time 3.90 min); peak 2 – violaxanthin (retention time 4.45 min);
 peak 3 – lutein (retention time 5.90 min); peak 4 – chlorophyll b (retention time 7.90 min);
 peak 5 – chlorophyll a (retention time 8.55 min); peak 6 – β-carotene (retention time 10.45 min)

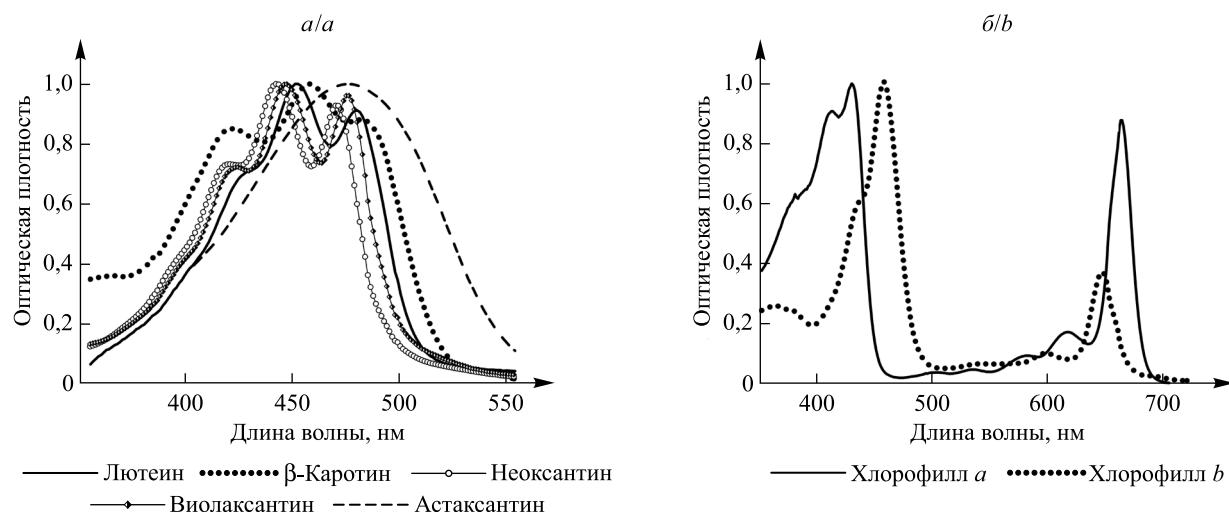


Рис. 3. Спектры поглощения пигментов, выделенных из клеток *H. pluvialis*
 (спектры нормированы на единицу по основному максимуму поглощения)

Fig. 3. Absorption spectra of pigments extracted from *H. pluvialis* cells
 (the spectra are normalized according to the main absorption maximum)

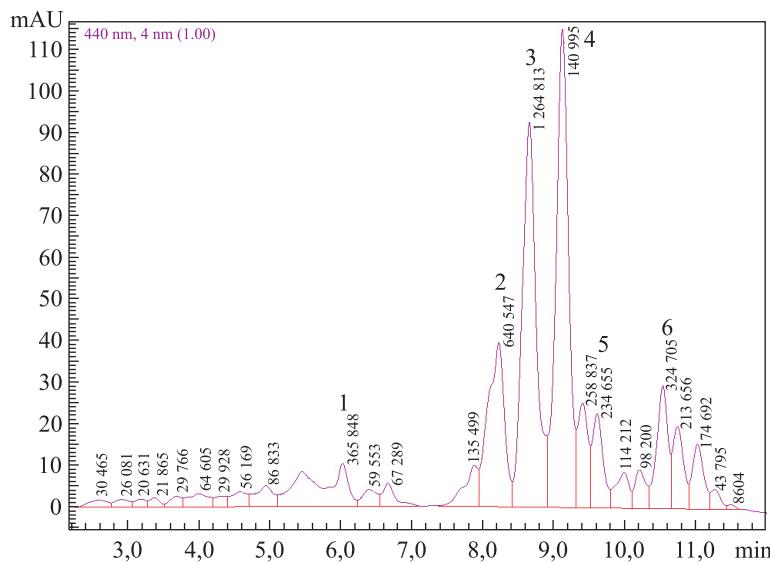


Рис. 4. Хроматограмма экстракта пигментов из клеток *H. pluvialis* до сапонификации:
пик 1 – лютеин (время удержания 5,90 мин); пик 2 – хлорофилл *b* (время удержания 7,90 мин);
пик 3 – хлорофилл *a* (время удержания 8,55 мин); пики 4–6 – эфиры астаксантин

Fig. 4. Chromatogram of the extract of pigments from *H. pluvialis* cells before saponification:
peak 1 – lutein (retention time 5.90 min); peak 2 – chlorophyll *b* (retention time 7.90 min),
peak 3 – chlorophyll *a* (retention time 8.55 min); peaks 4–6 – astaxanthin esters

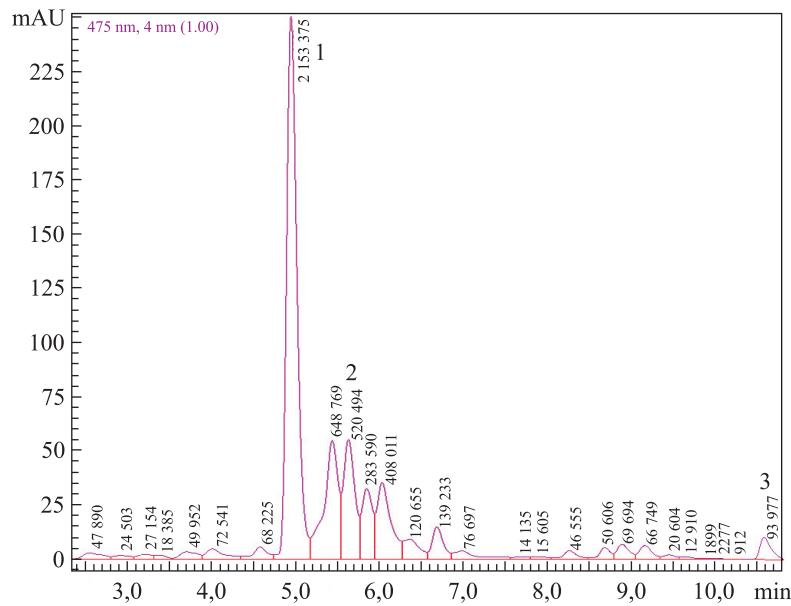


Рис. 5. Хроматограмма экстракта пигментов из клеток *H. pluvialis* после сапонификации:
пик 1 – *транс*-астаксантин (время удержания 4,95 мин);
пик 2 – *цис*-астаксантин (время удержания 5,45; 5,65; 5,85 и 6,10 мин);
пик 3 – β -каротин (время удержания 10,45 мин)

Fig. 5. Chromatogram of the extract of pigments from *H. pluvialis* cells after saponification:
peak 1 – *trans*-astaxanthin (retention time 4.95 min);
peak 2 – *cis*-astaxanthin (retention time 5.45; 5.65; 5.85 and 6.10 min);
peak 3 – β -carotene (retention time 10.45 min)

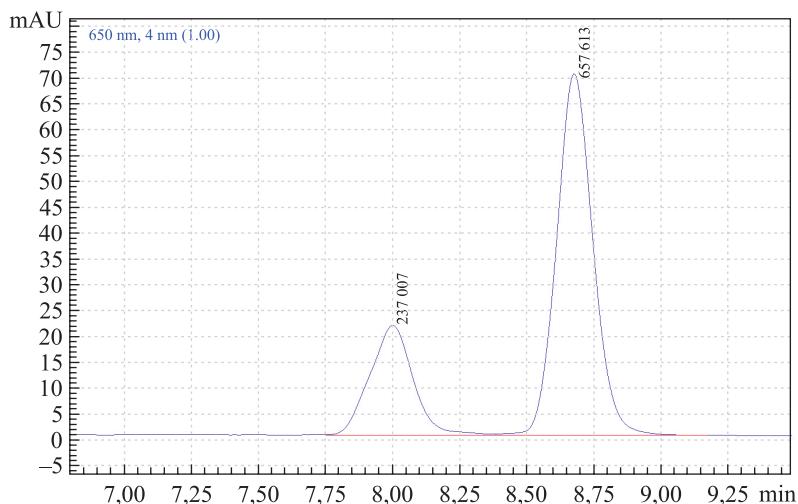


Рис. 6. Хроматограмма экстракта пигментов из клеток *H. pluvialis* до сапонификации, визуализированная при 650 нм

Fig. 6. Chromatogram of the extract of pigments from *H. pluvialis* cells before saponification, visualized at 650 nm

Таблица 3

Влияние БР на содержание фотосинтетических пигментов в клетках *H. pluvialis*

Table 3

Effect of RB on the content of photosynthetic pigments in *H. pluvialis* cells

Пигменты	Содержание в опытных образцах, мкг/мл					
	Свет низкой интенсивности			Свет высокой интенсивности		
	0 мкмоль/л БР (контроль)	0,25 мкмоль/л БР	0,5 мкмоль/л БР	0 мкмоль/л БР (контроль)	0,25 мкмоль/л БР	0,5 мкмоль/л БР
Неоксанチン	0,011 ± 0,004	0,051 ± 0,012* (464)	0,046 ± 0,011* (418)	0,017 ± 0,001	н. о.	н. о.
Виолаксантин	0,010 ± 0,005	0,039 ± 0,009* (390)	0,026 ± 0,007* (260)	0,017 ± 0,003	н. о.	н. о.
Лютейн	0,258 ± 0,061	0,340 ± 0,017* (132)	0,430 ± 0,021* (167)	0,245 ± 0,061	0,112 ± 0,018* (46)	0,227 ± 0,100 (93)
Хлорофилл <i>b</i>	0,374 ± 0,054	0,482 ± 0,022* (129)	0,626 ± 0,034* (167)	0,313 ± 0,038	0,111 ± 0,002* (32)	0,266 ± 0,101 (85)
Хлорофилл <i>a</i>	1,248 ± 0,201	1,632 ± 0,218* (131)	1,985 ± 0,166* (159)	1,133 ± 0,111	0,381 ± 0,018* (36)	0,950 ± 0,344 (84)
β-Каротин	0,266 ± 0,053	0,217 ± 0,044 (82)	0,390 ± 0,032* (146)	0,313 ± 0,031	0,162 ± 0,076* (52)	0,248 ± 0,104 (73)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$; н. о. – не обнаружено. В скобках указан процент к контролю.

Анализ содержания астаксантина в клетках *H. pluvialis* показал существенное увеличение количества этого пигмента только при использовании света высокой интенсивности. Установлено, что в данном случае добавление фотосенсибилизатора БР обеспечивает повышение продукции астаксантина клетками гематококка примерно на 20 %. В то время как применение БР на свету низкой интенсивности лишь уменьшало содержание этого каротиноида в клетках водоросли относительно контроля (сuspension без БР), что соответствует увеличению в них хлорофилла и других фотосинтетических пигментов и подтверждает предположение об отсутствии токсичного действия БР в используемых концентрациях на клетки *H. pluvialis*. Результаты исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты проведения ВЭЖХ пигментов *H. pluvialis* после воздействия
на клетки водоросли света высокой интенсивности
в присутствии фотосенсибилизатора БР и без него (контроль)

Table 4

The results of the HPLC of *H. pluvialis* pigments after exposure to light algae cells
of high intensity in the presence of RB photosensitizer and without RB (control)

Концентрация БР, мкмоль/л	Содержание пигментов, мкг/мл			
	транс-Астаксантин	цик-Астаксантин	Суммарный астаксантин	β-Каротин
0 (контроль)	3,99 ± 0,15 (100)	1,09 ± 0,06 (100)	5,08 ± 0,21 (100)	0,033 ± 0,002 (100)
0,25	5,00 ± 0,21* (125,2)	1,23 ± 0,02* (113,0)	6,23 ± 0,23* (122,6)	0,041 ± 0,005* (122,8)
0,5	4,36 ± 0,12* (109,3)	1,14 ± 0,03 (105,3)	5,51 ± 0,15* (108,4)	0,044 ± 0,006* (133,3)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$. В скобках указан процент к контролю.

Заключение

Таким образом, установлена 20 % стимуляция синтеза астаксантина в клетках *H. pluvialis* штамма IBCE H-17 светом высокой интенсивности в сочетании с действием фотосенсибилизатора БР. Выявлено, что при использовании БР в качестве дополнительного индуктора каротиногенеза на свету высокой интенсивности происходит увеличение сухого веса гематококка, а также диаметра клеток в суспензии по сравнению с результатом воздействия на клетки водоросли только света высокой интенсивности. Наблюдаемые приросты сухого веса существенны и достигают 40 % по отношению к контролю. Мы предполагаем, что увеличение сухого веса, диаметра клеток гематококка, а также выхода астаксантина при добавлении в среду инкубации *H. pluvialis* фотосенсибилизатора на фоне действия света высокой интенсивности связано не с усилением стрессового воздействия (так как использованные концентрации БР слишком малы для индукции фотоокислительного стресса), а с сигнальными свойствами генерируемого БР синглетного кислорода, который может являться первичным агентом в трансдукции сигнала, запускающего повышенный синтез астаксантина в клетках *H. pluvialis*.

Библиографические ссылки

1. 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.
2. 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;69(3):443–449. DOI: 10.1021/np050354+.
3. Johnson EA, Schroeder WA. Microbial carotenoids. In: Fiechter A, editor. *Downstream processing biosurfactants/carotenoids*. Berlin: Springer-Verlag; 1996. p. 119–178. (Advances in biochemical engineering/biotechnology; volume 53). DOI: 10.1007/BFb0102327.
4. Krishna KB, Mohanty P. Secondary carotenoid production in green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 1998; 57(2):51–63.
5. 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.
6. Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006;46(2):185–196. DOI: 10.1080/10408690590957188.
7. 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.
8. Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*. 2000;18(4):160–167. DOI: 10.1016/s0167-7799(00)01433-5.
9. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(4):1150–1154. DOI: 10.1021/jf991106k.
10. Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(6):1163–1174. DOI: 10.1007/s00253-007-0844-9.
11. Spiller GA, Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *Journal of Medicinal Food*. 2003;6(1):51–56. DOI: 10.1089/109662003765184741.

12. Gandin E, Lion Y, Van de Vorst A. Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives. *Photochemistry and Photobiology*. 1983;37(3):271–278. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x.
13. Козел НВ. Исследование возможности использования фотосенсибилизатора бенгальского розового в качестве индуктора накопления астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis*. В: Волотовский ИД, редактор. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Международная научная конференция, Тринадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: тезисы докладов; 27–29 июня 2018 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2018. с. 116.
14. Мельников СС, Мананкина ЕЕ, Будакова ЕА, Шалыго НВ. *Каталог генетического фонда хозяйствственно полезных видов водорослей*. Минск: Беларуская наука; 2011. 101 с.
15. Nichols HW, Bold HC. *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*. 1965;1(1):34–38. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x.
16. Rudic V, Dudnicenco T, inventors; Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of Moldova, Moldova State University, assignees. Process for cultivation of green alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow). Moldova patent a 2000 0154. 2000 September 28.
17. Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, Yamagami K, Ranjbar R, Katoh S. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;102(5):442–446. DOI: 10.1263/jbb.102.442.
18. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 63 p. (HarvestPlus technical monograph; 2).
19. Milenković SM, Zvezdanović JB, Andelković 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.
20. Forni E, Ghezzi M, Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatographia*. 1988;26(1):120–124. DOI: 10.1007/BF02268135.
21. Olajire AA, Ameen AB, Abdul-Hammed M, Adekola FA. Occurrence and distribution of metals and porphyrins in Nigerian coal minerals. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*. 2007;35(6):641–647. DOI: 10.1016/S1872-5813(08)60001-8.
22. 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.
23. Рокицкий ПФ. *Биологическая статистика*. 3-е издание. Минск: Вышэйшая школа; 1973. 320 с.

References

1. 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.
2. 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;69(3):443–449. DOI: 10.1021/np050354+.
3. Johnson EA, Schroeder WA. Microbial carotenoids. In: Fiechter A, editor. *Downstream processing biosurfactants/carotenoids*. Berlin: Springer-Verlag; 1996. p. 119–178. (Advances in biochemical engineering/biotechnology; volume 53). DOI: 10.1007/BFb0102327.
4. Krishna KB, Mohanty P. Secondary carotenoid production in green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 1998;57(2):51–63.
5. 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.
6. Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006;46(2):185–196. DOI: 10.1080/10408690590957188.
7. 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.
8. Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*. 2000;18(4):160–167. DOI: 10.1016/s0167-7799(00)01433-5.
9. Naguib YM. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(4):1150–1154. DOI: 10.1021/jf991106k.
10. Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(6):1163–1174. DOI: 10.1007/s00253-007-0844-9.
11. Spiller GA, Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *Journal of Medicinal Food*. 2003;6(1):51–56. DOI: 10.1089/109662003765184741.
12. Gandin E, Lion Y, Van de Vorst A. Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives. *Photochemistry and Photobiology*. 1983;37(3):271–278. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x.
13. Козел НВ. [Investigation of the possibility of using Rose Bengal photosensitizer as an inducer of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* cells]. In: Volotovskii ID, editor. *Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniya biosistem. Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya, Trinadtsatyi s'ezd Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov: tezisy dokladov; 27–29 iyunya 2018 g.; Minsk, Belarus'* [Molecular, membrane and cellular foundations of the functioning of biosystems. International scientific conference, Thirteenth congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists: abstracts; 2018 June 27–29; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2018. p. 116. Russian.
14. Mel'nikov SS, Manankina EE, Budakova EA, Shalygo NV. *Katalog geneticheskogo fonda khozyaistvenno poleznykh vidov vodoroslei* [Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2011. 101 p. Russian.
15. Nichols HW, Bold HC. *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*. 1965;1(1):34–38. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x.
16. Rudic V, Dudnicenco T, inventors; Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of Moldova, Moldova State University, assignees. Process for cultivation of green alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow). Moldova patent a 2000 0154. 2000 September 28.

17. Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, Yamagami K, Ranjbar R, Katoh S. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;102(5): 442–446. DOI: 10.1263/jbb.102.442.
18. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 63 p. (HarvestPlus technical monograph; 2).
19. Milenković SM, Zvezdanović JB, Andelković 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.
20. Forni E, Ghezzi M, Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatographia*. 1988;26(1):120–124. DOI: 10.1007/BF02268135.
21. Olajire AA, Ameen AB, Abdul-Hammed M, Adekola FA. Occurrence and distribution of metals and porphyrins in Nigerian coal minerals. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*. 2007;35(6):641–647. DOI: 10.1016/S1872-5813(08)60001-8.
22. 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.
23. Rokitskii PF. *Biologicheskaya statistika* [Biological statistics]. Minsk: Vyshjejshaja shkola; 1973. 320 p. Russian.

Статья поступила в редакцию 31.08.2020.
Received by editorial board 31.08.2020.