

СОДЕРЖАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ КАРОТИНОИДОВ В КЛЕТКАХ КРИОТОЛЕРАНТНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Chloromonas reticulata*

© 2024 О.В. Дымова*, В.С. Паршуков, И.В. Новаковская, Е.Н. Патова

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 167982 Сыктывкар, Республика Коми, Россия;
электронная почта: dymovao@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 30.09.2023

После доработки 30.05.2024

Принята к публикации 03.06.2024

Снежные (криотолерантные) водоросли часто образуют красные (розовые) пятна в горных экосистемах на снежниках по всему миру, однако об их физиологии и химическом составе мало известно. Нами изучен состав пигментов и содержание каротиноидов в зеленых (вегетативных) клетках *Chloromonas reticulata*, выращенных в лабораторных условиях, и в клетках, которые были собраны с поверхности красного снега на Приполярном Урале. В составе фотосинтетических пигментов среди каротиноидов присутствовали неоксантин, виолаксантин, антераксантин, зеаксантин, лютеин и β -каротин. Также был обнаружен кетокаротиноид астаксантин, обладающий способностью к высокой биологической активности. Установлено, что культивирование водоросли *C. reticulata* при низкой положительной температуре (6 °C) и умеренной освещенности 250 мкмоль квантов/(м²·с) способствовало накоплению всех идентифицированных каротиноидов, включая экстрапластидный астаксантин. В дополнение к пигментам в клетках водоросли накапливались жирные кислоты. Полученные данные дополняют эколого-физиологическую характеристику вида и позволяют рассматривать изученную микроводоросль как потенциально перспективный вид для получения каротиноидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Chloromonas reticulata*, зеленая микроводоросль, каротиноиды, астаксантин, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DOI: 10.31857/S0320972524070052 EDN: WNIBLN

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли – большая и разнообразная группа микроорганизмов, обитающих в самых разных местообитаниях, включая водоемы, почвы, каменистые субстраты и ледники [1, 2]. В природных экосистемах водоросли играют ключевую роль в качестве основных продуцентов органических веществ [3] и все больше привлекают внимание научного сообщества как возобновляемый источник биотоплива, водорода, омега-3 жирных кислот и других полезных соединений [4–7].

Фотосинтетические микроорганизмы очень эффективны в преобразовании солнечного света и обладают необыкновенной способностью адаптироваться к росту в различных условиях среды. Высокая фотосинтетическая активность микро-

водорослей вносит значительный вклад в обеспечение основных условий для жизни на нашей планете [8, 9]. Фотосинтез и направленность метаболизма и, следовательно, биохимический состав клеток сильно зависят от температуры и условий освещенности. По имеющимся в литературе данным, водоросли различаются по физиологическим и биохимическим реакциям на температуру, интенсивности и качеству света, а также источникам минерального питания [10–12].

Водоросли содержат различные пигменты, включая каротиноиды (Кар). Из 200 обнаруженных в водорослях природных Кар почти 30 вовлечены в процессы фотосинтеза [13]. Микроводоросли являются источниками таких Кар, как β -каротин (β -кар) и вторичные Кар, например, астаксантин (Аст). Так, β -кар впервые был получен про-

Принятые сокращения: Аст – астаксантин; Кар – каротиноиды; β -кар – β -каротин; ЖК – жирные кислоты; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ФАР – фотосинтетически активная радиация.

* Адресат для корреспонденции.

мышленным путем из микроводоросли *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco [4]. Yang et al. [14] исследовали антиоксидантные свойства астаксантина (каротиноида красного цвета), получаемого из зеленой водоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow. Было показано, что добавление богатого Аст экстракта в рацион мышей улучшает уровень холестерина и липидный обмен, а также смягчает прогрессирование атеросклероза. Водоросль *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová et Eliás также производит несколько вторичных кетокаротиноидов со значительной долей Аст и кантаксантина [15]. *Asterarcys quadricellularis* (Behre) E. Hegewald et A.W.F. Schmidt может продуцировать до 35 мкг Кар (β -кар, лютеин, Аст и кантаксантин) на мг сухой массы [16]. Согласно данным Chekanov et al. [17], в клетках водорослей *Bracteacoccus aggregatus* Tereg и *Coelastrella aeroterrestrica* Tschalkner, Gärtner & Kofler преобладают такие каротиноиды, как Аст и β -кар.

В условиях высокой инсоляции и низких температур, которые наблюдаются на скоплениях снега и льда в высокогорьях, микроводоросли способны накапливать вторичные Кар, не участвующие в фотосинтезе, физиологическое значение которых изучено недостаточно. Полагают, что эти соединения могут выполнять ряд функций и в первую очередь защищать клетки микроводорослей от окислительного стресса, подавляя повреждение синглетным кислородом [18, 19]. Большинство из синтезируемых такими водорослями Кар являются высокоценными биологически активными соединениями, проявляющими свойства иммуностимуляторов, УФ- и радиопротекторов, антиканцерогенов, регуляторов деятельности нервной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем человека и животных [20–22]. В связи с этим проводятся активные исследования по поиску среди криотолерантных микроводорослей видов, перспективных для использования в биотехнологии. Особое внимание исследователей направлено на поиск продуцентов астаксантина (3,3'-дигидрокси-4,4'-диоксо- β -каротин) – красного пигмента из группы кислородсодержащих вторичных Кар. Наличие хромофорных групп (сопряженных двойных связей и хиноидных группировок в кольцах) придает пигменту красный цвет. По антиоксидантной активности Аст на порядок превышает в системах *in vivo* β -кар и α -токоферол [23]. Самым богатым источником природного Аст считается зеленая микроводоросль *H. pluvialis*, накапливающая до 3–5% от сухой массы при действии неблагоприятных условий окружающей среды [24]. Водоросли, обитающие в полярных и горных регионах, также способны синтезировать Аст [1, 18, 25–29]. Благодаря накоплению этого пигмента они при массовом развитии окрашивают поверх-

ность ледников и снежников в красный цвет. Такое явление получило название «красный снег» и встречается по всему миру [18, 25–30], включая северные регионы Урала [31]. В высокогорьях Урала наиболее часто это явление наблюдается в летний период. Нами неоднократно из проб окрашенного в красный цвет снега при культивировании в лабораторных условиях был выделен штамм зеленой водоросли *Chloromonas reticulata* (Goroschankin) Gobi [32].

Целью данной работы было изучить пигментный состав и содержание индивидуальных каротиноидов в клетках микроводоросли *C. reticulata*, выделенной из «красного» снега снежников Приполярного Урала. Полученные результаты позволят оценить способность клеток микроводорослей адаптироваться к изменениям условий обитания и выявить способы защиты фотосинтетического аппарата от стрессовых воздействий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования и условия культивирования микроводоросли. Использован штамм *C. reticulata* – одноклеточная, однопольная водоросль с эллипсоидными или яйцевидными клетками длиной 11–20 мкм и шириной 5–15 мкм, чашевидным хлоропластом с перфорациями, без пиреноида (рис. 1, а–в) из коллекции живых культур водорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН (SYKOA Ch-054-11). Водоросль была выделена в июле 2010 года из пробы, собранной с поверхности снега, окрашенного в красный цвет, на Приполярном Урале (65°13'45.5"с.ш., 60°13'19.4"в.д.). Пробы отбирали из верхнего слоя снега на глубине до 5 мм и помещали в стерильные пластиковые пробирки на 15 мл («Greiner Bio-One», Австрия). У штамма изучены морфологические, эколого-географические и молекулярно-генетические особенности [32]. Нуклеотидные последовательности представлены в GenBank под номерами KF361494 (18S рибосомальной РНК, кодируемой ядром) и MF033356 (ITS1-5.8S-SITS2 рРНК).

Эксперимент по изучению состава и содержания Кар в клетках микроводоросли *C. reticulata* при разных условиях культивирования состоял из трех этапов. На первом этапе наращивали биомассу водоросли. Для этого брали 1 мл культуры *C. reticulata* с поглощением при 680 нм, равным 0,4, и 100 мл питательной среды BG 11 (рН = 7,1) [33, 34]. Культивирование водоросли проводили в 250-мл флаконах («Greiner Bio-One») в течение двух недель на шейкере («Elmi», Латвия) со скоростью 150 об./мин при плотности потока фотосинтетически активной радиации (ФАР) 45 мкмоль/(м²·с) и температуре 22 °С. Соотноше-

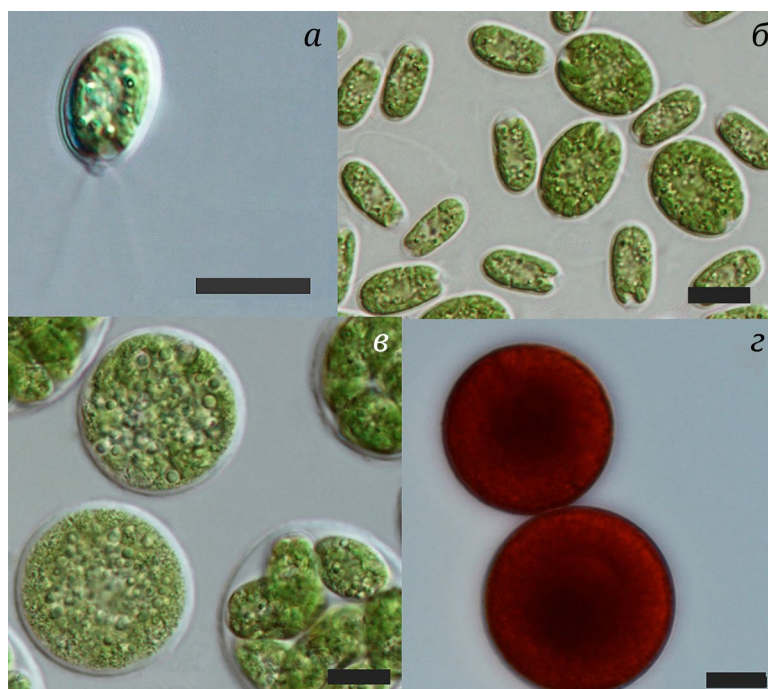


Рис. 1. Клетки водоросли *Chloromonas reticulata* и клетки, собранные с поверхности окрашенного снега на Приполярном Урале: а – подвижная клетка *C. reticulata* со жгутиками, масштабная линейка – 10 мкм; б – вегетативные клетки *C. reticulata*, масштабная линейка – 10 мкм; в – старые клетки *C. reticulata*, масштабная линейка – 10 мкм; з – красные клетки, собранные со снежной поверхности, масштабная линейка – 10 мкм. Фото И.В. Новаковской

ние день/ночь – 12/12 ч. По достижении поглощения, равного 0,4 при 680 нм, проводили отбор проб культуры для анализа пигментов в качестве контроля.

На втором этапе культуру, выращенную на первом этапе, охлаждали до +6 °С и продолжали культивировать при постоянном барботировании среды отфильтрованным атмосферным воздухом с помощью компрессора OXYBoost APR-150 («Aquael», Польша) в режиме 2,0 литр/мин при плотности потока ФАР 50 мкмоль/(м²·с). Объем питательной среды в культуре перед вторым этапом эксперимента доводили до 100 мл. Инкубацию в таких условиях проводили в течение 4 суток, после этого отбирали пробы.

Известно, что для поддержания выработки Аст требуется свет, хотя он также может накапливаться в темноте, но с меньшей скоростью [25, 35]. Поэтому на третьем этапе эксперимента клетки водоросли продолжали культивировать в 100 мл среды при более высокой плотности потока ФАР – 250 мкмоль/(м²·с) и температуре 6 °С в течение 10 суток, после чего вновь отбирали пробы. Экспериментальная установка (рис. 2) состояла из компрессора (1), трубки (2), колбы с водой (3), колбы с микроводорослями (4), источников света (5): светодиодные лампы LED-A60-15W/SPSB/E27/CL PLP30WH 50 мкмоль/(м²·с) и LED-A60-15W/SPSB/E27/CL PLP30GR (Китай) 250 мкмоль/(м²·с). На всех

трех этапах эксперимента использовали одну и ту же культуру водоросли, но во избежание стресса клеток от нехватки основных минеральных элементов перед каждым этапом доводили количество питательной среды в колбе до 100 мл.

Дополнительно был проведен анализ состава Кар в «красных» клетках (рис. 1, з), собранных с поверхности «окрашенного» снега на Приполярном Урале (в месте отбора пробы, из которой была выделена *C. reticulata*). Следует отметить, что в современной альгологии, изучающей водоросли снега и льда, существует проблема выделения живых культур из покоящихся клеток, и для некоторых недавно описанных видов (например, виды рода *Sanguina*) неизвестны вегетативные стадии [36].

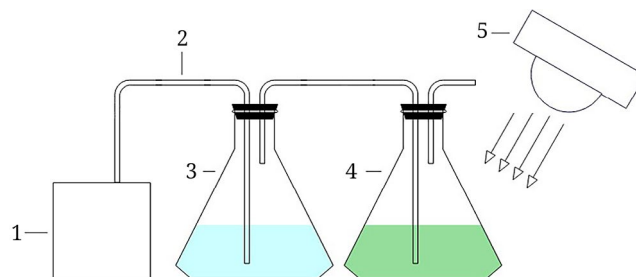


Рис. 2. Схема установки. 1 – компрессор; 2 – трубка соединительная; 3 – колба с водой; 4 – колба с микроводорослями; 5 – источники света: лампы LED-A60-15W/SPSB/E27/CL PLP30WH 50 мкмоль/(м²·с) и LED-A60-15W/SPSB/E27/CL PLP30GR (Китай) 250 мкмоль/(м²·с)

При отборе проба была заморожена в холодильной установке при температуре -20°C и в замороженном виде транспортирована в лабораторию для дальнейшего анализа.

Анализ состава каротиноидов методом ВЭЖХ. До идентификации состава Кар зафиксированные пробы хранили в жидком азоте при -80°C . Экстракцию замороженного осадка клеточной суспензионной культуры проводили с использованием диметилсульфоксида, осадок осаждали центрифугированием. Супернатант, содержащий экстракт хлорофиллов и Кар из клеток микроводорослей, инкубировали в течение 15 мин при 60°C и непрерывном перемешивании. Подготовленный таким образом экстракт анализировали методом ВЭЖХ с обращенной фазой в соответствии с модифицированным методом [37] на жидкостном хроматографе («Knauer», Германия). Хроматографическая система включала: детектор Knauer Smartline UV Detector 2500, насос Knauer Smartline Pump 1000. Для разделения использовали хроматографическую колонку $4,0 \times 250$ мм с сорбентом Диасфер-110-C18NT («БиоХимМак», Россия) с размером пор 5 мкм. Пигменты элюировали при градиентном режиме в течение 38 мин в системе растворителей А (ацетонитрил/метанол/вода в соотношении 75/12/4) и В (метанол/этилацетат в соотношении 68/32) со скоростью потока элюента по программе градиента: 0 мин – элюент А ($1\text{ см}^3/\text{мин}$); 16 мин – элюент А ($2\text{ см}^3/\text{мин}$); 21 мин – элюент В ($2\text{ см}^3/\text{мин}$); 28 мин – элюент А ($2\text{ см}^3/\text{мин}$). Температура колонки составляла 25°C . Пигменты детектировали путем регистрации поглощения элюата при 440 нм. Для расчета количественного состава пигментов использована абсолютная градуировка (метод внешнего стандарта). Кар идентифицировали, используя стандарты и времена удержания. Прием и обработку хроматографических данных выполняли с помощью компьютерной программы «EuroChrom for Windows». Стандарты чистых веществ (фотосинтетических пигментов) были получены от фирм «Sigma» и «Fluka» (США).

Анализ состава жирных кислот (ЖК) выполнен методом газовой хроматографии в ЦКП «Хроматография» ИБ Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар). ЖК определяли в виде их метиловых эфиров после проведения кислотного метанолиза липидов с последующей этерификацией выделившихся кислот по следующей методике: в стеклянную виалу (15 см^3) с анализируемым образцом (100–200 мг) вносили 5 см^3 метанола и $0,7\text{ см}^3$ соляной кислоты (36,5%). Вials герметично закрывали винтовыми крышками и выдерживали в термостате в течение 1,5 ч при температуре 95°C , после чего охлаждали до комнатной температуры. После охлаждения в каждую виалу добавляли

5 см^3 дистиллированной воды, $0,5\text{ см}^3$ толуола, содержащего внутренний стандарт ($0,1\text{ мг}/\text{см}^3$ гептакозана) и экстрагировали в течение 5 мин. Полученный экстракт анализировали на газовом хроматографе «Кристалл-5000.2» с пламенно-ионизационным детектором («Хроматэк», Россия), используя кварцевую капиллярную колонку HP-FFAP («Agilent», США) $30\text{ м} \times 0,32\text{ мм} \times 0,25\text{ мкм}$; газ-носитель – гелий (ос.ч.); давление газа-носителя на входе колонки – 60 кПа; программирование температуры колонки: $110^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}/\text{мин} - 260^{\circ}\text{C}$; скорость потока водорода – $20\text{ см}^3/\text{мин}$; скорость потока воздуха – $200\text{ см}^3/\text{мин}$; деление потока – 1/30. Температура детектора 250°C , испарителя – 280°C . Количественное определение индивидуальных кислот проводили методом внутреннего стандарта с использованием смеси FAME Mix («Supelco», США), содержащей 26 метиловых эфиров ЖК. Погрешность измерения содержания кислот для достоверной вероятности $P = 0,95$ составляла 15–20%.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены с трехкратной биологической и двукратной аналитической повторами. Статистическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 10 («Statsoft Inc.», США) с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Р-Величину рассчитывали при заданном уровне значимости $\alpha = 0,05$. Результаты представляют среднее значение (M) $\pm$ стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что фотосинтетический аппарат зеленых одноклеточных водорослей аналогичен таковому высших растений. Хроматографическое разделение экстрактов зеленых клеток *C. reticulata* (рис. 1, б), выращенных в лабораторных условиях, и красных (покоящихся) клеток (рис. 1, г), собранных с поверхности «цветущего» снега на Приполярном Урале, показало, что в составе фотосинтетических Кар были обнаружены неоксантин, виолаксантин, антераксантин, лютеин, β -каротин и следовые количества зеаксантина (табл. 1; рис. 3, а). При этом β -кар преобладал и в покоящихся клетках (до 90%), и в зеленых клетках *C. reticulata* (до 38%). Пигментный состав клеток *C. reticulata* сходен с другими зелеными водорослями [38–40].

В составе вторичных (нефотосинтетических) Кар был обнаружен астаксантин – пигмент, ответственный за красный цвет (рис. 3, б). Известно, что в природе АСТ может присутствовать в клетках не только в свободной форме, но и в форме ди- и моноэфиров (в водорослях – до 70% в виде

Таблица 1. Содержание индивидуальных каротиноидов в зеленых (I) и красных (II) клетках *Chloromonas reticulata*, мкг/г сухой массы (n = 4–6)

Клетки	Пигменты							
	Нео	Вио	Ант	Лют	Зеа	β-кар	Аст	Сумма Кар
I	223 ± 15 ^a	168 ± 10 ^a	48 ± 3 ^a	210 ± 37 ^a	39 ± 9 ^a	450 ± 132 ^a	37 ± 5 ^a	1174 ± 145 ^a
II	9 ± 3 ^b	9 ± 3 ^b	7 ± 1 ^b	60 ± 9 ^b	2 ± 1 ^b	840 ± 129 ^b	22 ± 7 ^b	946 ± 148 ^b

Примечание. Обозначения: Нео – неоксантин; Вио – виолаксантин; Ант – антераксантин; Лют – лютеин; Зеа – зеаксантин; β-кар – β-каротин; Аст – астаксантин; Кар – каротиноиды; I – зеленые клетки *C. reticulata*, выращенные в лабораторных условиях; II – красные (покоящиеся) клетки, собранные с поверхности «цветущего» снега на Приполярном Урале.

^{a,b} Достоверность изменений параметра между вариантами клеток I и II (ANOVA, тест Дункана, α = 0,05).

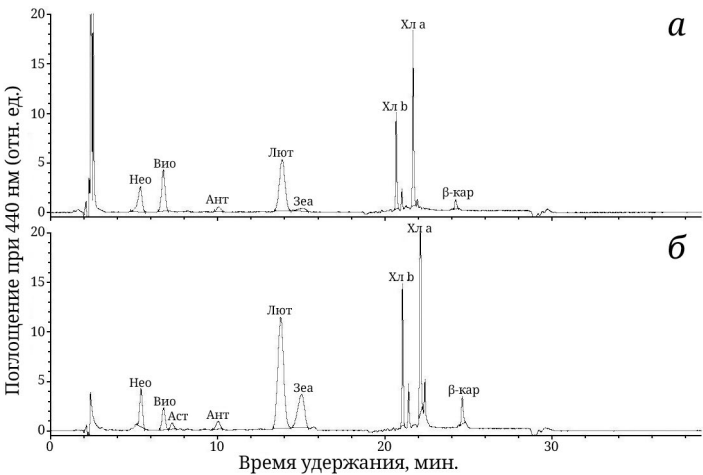


Рис. 3. Профиль элюции при ВЭЖХ-разделении пигментов, экстрагированных из вегетативных (зеленых) клеток *Chloromonas reticulata*. Варианты: *a* – низкая температура и свет 50 мкмоль/(м²·с); *б* – низкая температура и свет 250 мкмоль/(м²·с). Пигменты: Нео – неоксантин; Вио – виолаксантин; Аст – астаксантин; Ант – антераксантин; Лют – лютеин; Зеа – зеаксантин; β-кар – β-каротин; Хл *a* – хлорофилл *a*; Хл *b* – хлорофилл *b*. Детекция осуществлялась путем регистрации поглощения подвижной фазы при 440 нм

моноэфира) [41]. Большое количество свободного и этерифицированного АСТ находится в цитоплазматических липидных глобулах [25, 42]. По мнению Ben-Amotz et al. [43], β-кар, который накапливался в липидных глобулах, также можно рассматривать как вторичный Кар. Преобладание β-кар в красных клетках согласуется с данными других авторов [43–45] о накоплении этого пигмента при воздействии стрессовых условий на микроводоросли.

Пик вторичных Кар (Аст) был идентифицирован при удержании на 7–8 мин прохождения хроматограммы (рис. 3, б; рис. 4). Присутствие Аст было обнаружено как в покоящихся красных, так и в зеленых клетках *C. reticulata* (табл. 1). Наличие в красных клетках большого количества β-кар указывает на способность этого каротиноида накапливаться в качестве предшественника синтеза Аст в природных условиях. Так, достаточно высокое для продуцентов Аст содержание β-кар было отмечено у *Scenedesmus rubescens*, что, по мнению Челебиевой [46], является характерной

чертой стресс-реакции некоторых видов микроводорослей.

При пониженной температуре на фоне умеренной освещенности в клетках *C. reticulata* отме-

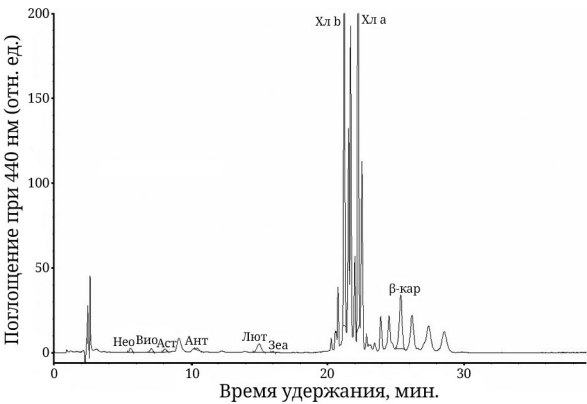


Рис. 4. Профиль элюции при ВЭЖХ-разделении пигментов, экстрагированных из покоящихся (красных) клеток *Chloromonas reticulata*. Остальные обозначения, как на рис. 3

Таблица 2. Относительное содержание каротиноидов (%) в клетках *Chloromonas reticulata* при 22 °C и 45 мкмоль/(м²·с) – контроль; при 6 °C и 50 мкмоль/(м²·с) – опыт 1; при 6 °C и 250 мкмоль/(м²·с) – опыт 2

Вариант	Нео	Вио	Аст	Ант	Лют	Зеа	β-кар	DEPS
Контроль	8,5 ± 2,8 ^a	13,8 ± 4,3 ^a	–	2,4 ± 1,0 ^a	50,1 ± 15,8 ^a	1,1 ± 0,5 ^a	24,1 ± 8,8 ^a	13 ± 3 ^a
Опыт 1	6,4 ± 0,3 ^a	18,1 ± 0,4 ^b	2,8 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	48,0 ± 1,0 ^a	1,8 ± 0,1 ^a	20,0 ± 0,3 ^a	15 ± 1 ^a
Опыт 2	7,5 ± 1,8 ^b	4,6 ± 1,4 ^a	3,8 ± 0,8 ^b	2,0 ± 0,8 ^b	47,4 ± 11,3 ^b	15,0 ± 8,4 ^b	20,0 ± 5,0 ^b	72 ± 6 ^b

Примечание. Обозначения пигментов, как в табл. 1; DEPS – величина степени дезоксидации (%); знак «–» – не обнаружено. Разные надстрочные символы (a, b) обозначают достоверность изменений параметра между контрольным и опытными вариантами культивирования (ANOVA, тест Дункана, $\alpha = 0,05$; $n = 4-6$).

чали значительное накопление пластидных Кар, и особенно зеаксантина (до 50% от суммы Кар), и внепластидного Аст (до 4% от суммы Кар) (табл. 2; рис. 3, б). Например, штамм зеленой каротиногенной микроводоросли *Bracteacoccus aggregatus* BM5/15 может продуцировать до 13,1% β-кар и 47,9% Аст от сухой массы клеток [39]. Виды рода *Coelastrella* способны накапливать Аст, кантаксантин и ЖК до ~30% от сухой массы (содержание Аст в зависимости от вида и условий культивирования может быть от 0,20 ± 0,03 до 7,95 ± 0,85 мг/г) [40]. На примере зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus* [47], накапливающей зеаксантин, было показано, что этот ксантофилл в светособирающем комплексе II фотосинтетического аппарата (ССКII ФСА) способен замещать виолаксантин и лютеин [48].

Как установлено в работе Chekanov et al. [38], клетки зеленой микроводоросли *H. pluvialis* на вегетативной (зеленой) стадии культивирования накапливали Аст на уровне 4% от сухой массы клеток, достигая при длительном стрессе 5,5%. Аст накапливался преимущественно в виде моно- и диэфиров ЖК семейств C16 и C18.

Низкотемпературный стресс для водорослей является одной из эффективных стратегий увеличения полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). При адаптации к низкой температуре микроводоросли увеличивают выработку ПНЖК для поддержания текучести мембраны [11, 49]. В нашей работе характеристика *C. reticulata* была дополнена изучением состава ЖК липидной фракции зеленых (ЗК) и красных (КК) клеток. В ЖК-профиле экстракта ЗК преобладали из насыщенных ЖК: пальмитиновая (C16:0) – 32%; из ненасыщенных: олеиновая (C18:1) – 22%; линолевая (C18:2) и линоленовая (C18:3) кислоты – до 40%. ЖК-спектр экстракта КК отличался накоплением ненасыщенных ЖК: олеиновой (C18:1), линолевой (C18:2) и линоленовой (C18:3) – 36%. Для отдела Chloropyta характерно высокое содержание ненасыщенных ЖК. Преобладание олеиновой кислоты (C18:1) в лабораторных культурах и в полевых цистах [50], по-видимому, отражает

ее важность как предшественника в синтезе ПНЖК (например, линолевой и/или α-линоленовой кислот). Это означает, что выработка ПНЖК определяется присутствием олеиновой кислоты. Линоленовая (C18:3), наряду с линолевой (C18:2), являются незаменимыми ЖК, их получают только из пищи. Наличие этих ненасыщенных ЖК, особенно в КК, важно для биотехнологических целей с применением в фармацевтической и пищевой отраслях. Снежные водоросли также служат питанием для адаптированных к холоду организмов.

Полученные на примере *C. reticulata* данные свидетельствуют о возможном функционировании двух механизмов фотопротекции. Зеаксантин-зависимый механизм участвует в тепловой диссипации избыточно поглощенной (не использованной на фотосинтез из-за пониженной температуры) световой энергии [51]. Другой механизм – накопление Аст – обеспечивает снижение поступления энергии к хлоропласту путем его экранирования [52, 53]. Так, вторичные Кар могут обеспечивать фотозащиту, пассивно поглощая фотоны до того, как они достигнут фотосинтетических пигментов. Этот способ защиты требует, чтобы Кар были расположены между источником света и фотосинтетическим аппаратом, т.е. во внетилакоидном пространстве. Еще одним условием эффективности вторичных Кар в качестве фотозащитных средств является то, что они одновременно поглощают свет при той же длине волны, используемой для возбуждения фотосенсибилизатора [54]. Следует отметить, что участие виолаксантинового цикла в индукции нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла ФСII (NPQ) в гематоцистах *H. pluvialis*, образовавшихся при комбинированном стрессе с высоким освещением и недостатком питательных веществ, остается под вопросом, хотя при стрессе с высоким освещением у *H. pluvialis* была зарегистрирована значительная повышенная регуляция этого механизма [55].

В ходе исследования впервые получены сведения о составе каротиноидов в красных клетках,

вызывающих цветение снега на Приполярном Урале. В таких клетках сумма Кар достигала 950 мкг/г сухой массы. Из них преобладающим был β -каротин (до 90%). При этом в зеленых клетках штамма *C. reticulata* (SYKOA Ch-054-11), который ранее был выделен из красного снега на Приполярном Урале, в условиях культивирования при температуре 6 °C и интенсивности освещения 250 мкмоль квантов/(м²·с) концентрация Кар повышалась до 2000 мкг/г сухой массы, что в 3,5 раза выше, чем в контроле, и на полтора порядка выше по сравнению с показателями, полученными в эксперименте с низкой освещенностью. В дополнение к пигментам изученный вид накапливает полиненасыщенные жирные кислоты. С физиологической точки зрения, приспособленность *C. reticulata* к обитанию на снежниках Приполярного Урала остается неизвестной, а низкое содержание Аст в клетках из проб красного снега, по-видимому, можно объяснить их невысокой способностью поглощать УФ-излучение и экранировать избыточную радиацию. С практической точки зрения, способность к индукции синтеза Кар, включая Аст, указывает на биотехнологический потенциал исследуемого штамма. В целом, результаты работы дополняют современные представления о пигментном составе и некоторых осо-

бенностях вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей сведениями о ранее не исследовавшемся в данном аспекте виде *C. reticulata*. Дальнейшие исследования будут направлены на подбор условий, обеспечивающих рост культуры и индуцирующих накопление каротиноидов и других биологически активных соединений (содержания липидного состава, полифенолов) в клетках данного вида микроводорослей.

Вклад авторов. О.В. Дымова, Е.Н. Патова – концепция и руководство работой, обсуждение результатов исследования и написание текста; В.С. Паршуков, И.В. Новаковская – проведение экспериментов и обработка результатов исследования.

Финансирование. Финансирование исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственных заданий Института биологии Коми НЦ УрО РАН (№№ 122040600021-4 и 122040600026-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hoffmann, L. (1989) Algae of terrestrial habitats, *Bot. Rev.*, **55**, 77-105.
- AlgaeBase. In World-Wide Electronic Publication; National University of Ireland: Galway, Ireland, 2023, URL: <https://www.algaebase.org>.
- Masojídek, J., Torzillo, G., and Koblížek, M. (2013) Photosynthesis in microalgae, in *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 2nd ed (Richmond, A., and Hu, Q., eds) Chichester, Wiley-Blackwell, Chap. 2, pp. 21-35, <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>.
- Borowitzka, M. A. (2013) High-value products from microalgae – their development and commercialisation, *J. Appl. Phycol.*, **25**, 743-756, <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>.
- Mulders, K. J. M., Lamers, P. P., Martens, D. E., and Wijffels, R. H. (2014) Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities, *J. Phycol.*, **50**, 229-242, <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>.
- Solovchenko, A. E. (2013) Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae, *Russ. J. Plant Physiol.*, **60**, 1-13, <https://doi.org/10.1134/s1021443713010081>.
- Puchkova, T. V., Khapchaeva, S. A., Zotov, V. S., Lukyanov, A. A., and Solovchenko, A. E. (2021). Marine and freshwater microalgae as sustainable source cosmeceuticals, *Marine Biol. J.*, **6**, 67-81, <https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.1.06>.
- Chen, H., Qiu, T., Rong, J., He, C., and Wang, Q. (2015) Microalgal biofuel revisited: an informatics-based analysis of developments to date and future prospects, *Appl. Energy*, **155**, 585-598, <https://doi.org/10.1016/wj.apenergy.2015.06.055>.
- Vecchi, V., Barera, S., Bassi, R., and Dall'Osto, L. (2020) Potential and challenges of improving photosynthesis in Algae, *Plants*, **9**, 67, <https://doi.org/10.3390/plants9010067>.
- Remias, D., Lütz-Meindl, U., and Lütz, C. (2005) Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*, *Eur. J. Phycol.*, **40**, 259-268, <https://doi.org/10.1080/09670260500202148>.
- Prochazkova, L., Remias, D., Holzinger, A., Resanka, T., and Nedbalova, L. (2021) Ecophysiological and ultrastructural characterisation of the circumpolar orange snow alga *Sanguina aurantia* compared to the cosmopolitan red snow alga *Sanguina nivaloides* (Chlorophyta), *Polar Biol.*, **44**, 105-117, <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02778-0>.

12. Holzinger, A., and Karsten, U. (2013) Dessication stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms, *Front. Plant Sci.*, **4**, 327, <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00327>.
13. Gong, M., and Bassi, A. (2016) Carotenoids from microalgae: a review of recent developments, *Biotechnol. Adv.*, **34**, 1396-1412, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>.
14. Yang, Y., Seo, J. M., Nguyen, A., Pham, T. X., Park, H. J., Park, Y., Kim, B., Bruno, R. S., and Lee, J. (2011) Astaxanthin rich extract from the green alga *Haematococcus pluvialis* lowers plasma lipid concentrations and enhances antioxidant defense in apolipoprotein E knockout mice, *J. Nutr.*, **141**, 1611-1617, <https://doi.org/10.3945/jn.111.142109>.
15. Minyuk, G., Chelebieva, E., Chubchikova, I., Dantsyuk, N., Drobetskaya, I., Sakhon, E., Chekanov, K., and Solovchenko, A. (2017) Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids, *Algae*, **32**, 245-259, <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6>.
16. Singh, D. P., Khattar, J. S., Rajput, A., Chaudhary, R., and Singh, R. (2019) High production of carotenoids by the green microalga *Asterarcys quadricellulare* PUMCC 5.1.1 under optimized culture conditions, *PLoS One*, **14**, e0221930, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221930>.
17. Chekanov, K., Fedorenko, T., Kublanovskaya, A., Litvinov, D., and Lobakova, E. (2019) Diversity of carotenogenic microalgae in the White Sea polar region, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **96**, fiz183, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz183>.
18. Wang, B., Zarka, A., Trebst, A., and Boussiba, S. (2003) Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance, *J. Phycol.*, **39**, 1116-1124, <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x>.
19. Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., and Florou-Paneri, P. (2013) Functional properties of carotenoids originating from algae, *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 5-11, <https://doi.org/10.1002/jsfa.5902>.
20. Palozza, P., and Krinsky, N. I. (1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model, *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 291-295, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90675-m](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90675-m).
21. Lorenz, R. T., and Cysewski, G. R. (2000) Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin, *Trends Biotechnol.*, **18**, 160-167, [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01433-5).
22. Guerin, M., Huntley, M., and Olaizola, M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition, *Trends Biotechnol.*, **21**, 210-216, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7).
23. Naguib, Y. (2000) Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1150-1154, <https://doi.org/10.1021/jf991106k>.
24. Lemoine, Y., and Schoefs, B. (2010) Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress, *Photosynth. Res.*, **106**, 155-177, <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3>.
25. Boussiba, S. (2000) Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response, *Physiol. Plant.*, **108**, 111-117, <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x>.
26. Williams, W. E., Gorton, H. L., and Vogelmann, T. C. (2003) Surface gas-exchange processes of snow algae, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 562-566, <https://doi.org/10.1073/pnas.02355601>.
27. Hoham, R. W., Berman, J. D., Rogers, H. S., Felio, J. H., Ryba, J. B. and Miller, P. R. (2006) Two new species of green snow algae from Upstate New York, *Chloromonas chenangoensis* sp. nov. and *Chloromonas tughillensis* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae) and the effects of light on their life cycle development, *Phycologia*, **45**, 319-330, <https://doi.org/10.2216/04-103.1>.
28. Hoham, R. W., and Remias, D. (2020) Snow and glacial algae: a review, *J. Phycol.*, **56**, 264-282, <https://doi.org/10.1111/jpy.12952>.
29. Zheng, Y., Xue, C., Chen, H., He, C., and Wang, Q. (2020) Low-temperature adaptation of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* is associated with the photosynthetic system regulatory process, *Front. Microbiol.*, **11**, 1233, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01233>.
30. Suzuki, P., Detain, A., Park, Y., Viswanath, K., Wijffels, R. H., Leborgne-Castel, N., Procházková, L., Hulatt, C. J. (2023) Phylogeny and lipid profiles of snow-algae isolated from Norwegian red-snow microbiomes, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **99**, 1-18, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad057>.
31. Новаковская И. В., Патова Е. Н., Макеева Е. Г. (2022) Снежные водоросли и цианобактерии ряда районов Урала и Западного Саяна, *Теор. Прикл. Экол.*, **3**, 149-156, <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-3-149-156>.
32. Novakovskaya, I. V., Patova, E. N., Boldina, O. N., Patova, A. D., and Shadrin D. M. (2018) Molecular phylogenetic analyses, ecology and morphological characteristics of *Chloromonas reticulata* (Goroschankin) Gobi which causes red blooming of snow in the Subpolar Urals, *Cryptogamie, Algologie*, **39**, 199-213, <https://doi.org/10.7872/crya/v39.iss2.2018.199>.
33. Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel M., and Cohen-Bazire G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales), *Bacteriol. Rev.*, **35**, 171-205, <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>.

34. Andersen, R. A. (2005) *Algal Culturing Techniques*, Elsevier, New York, NY, USA, pp. 589.
35. Droop, M. R. (1955) Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*, *Nature*, **175**, 42, <https://doi.org/10.1038/175042A0>.
36. Procházková, L., Leya, T., Křížková, H., and Nedbalová, L. (2019) *Sanguina nivaloides* and *Sanguina aurantia* gen. et spp. nov. (Chlorophyta): the taxonomy, phylogeny, biogeography and ecology of two newly recognized algae causing red and orange snow, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **95**, fiz064, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz064>.
37. Dymova, O., Khrystin, M., Miszalski, Z., Kornas, A., Strzalka, K., and Golovko, T. (2018) Seasonal variations of leaf chlorophyll-protein complexes in the wintergreen herbaceous plant *Ajuga reptans* L., *Func. Plant Biol.*, **45**, 519-527, <https://doi.org/10.1071/FP17199>.
38. Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., and Solovchenko, A. (2014) Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white Sea Coastal Rocks (Russia), *Mar. Drugs*, **12**, 4504-4520, <https://doi.org/10.3390/md12084504>.
39. Chekanov, K., Litvinov, D., Fedorenko, T., Chivkunova, O., and Lobakova, E. (2021) Combined production of astaxanthin and β -carotene in a new strain of the microalga *Bracteacoccus aggregatus* BM5/15 (IPPAS C-2045) cultivated in photobioreactor, *Biology*, **10**, 643, <https://doi.org/10.3390/biology10070643>.
40. Corato, A., Le, T. T., Baurain, D., Jacques, P., Remacle, C., and Franck, F. A. (2022) Fast-growing oleaginous strain of *Coelastrella* capable of astaxanthin and canthaxanthin accumulation in phototrophy and heterotrophy, *Life*, **12**, 334, <https://doi.org/10.3390/life12030334>.
41. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety of use of colouring agents in animal nutrition – PART I. General Principles and Astaxanthin, (2005), *EFSA J.*, **291**, 1-40, URL: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/291>.
42. Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., and Nagai, S. (1992) Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions, *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 17-20, [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90261-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90261-R).
43. Ben-Amotz, A., Katz, A., and Avron, M. (1982) Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae), *J. Phycol.*, **18**, 529-537, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1982.tb03219.x>.
44. Grung, M., D'Souza, F. M. L., Borowitzka, M., and Liaaen-Jensen, S. (1992) Algal Carotenoids 51. Secondary Carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as a source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters, *J. Appl. Phycol.*, **4**, 165-171, <https://doi.org/10.1007/BF02442465>.
45. Czygan, F. (1970) Blood-rain and blood-snow: nitrogen-deficient cells of *Haematococcus pluvialis* and *Chlamydomonas nivalis*, *Arch. Mikrobiol.*, **74**, 69-76, <https://doi.org/10.3354/meps08849>.
46. Челебиева Э. С. (2014) Особенности вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей, Автореф. дис. канд. биол. наук, Институт биологии южных морей, Севастополь.
47. Bishop, N.I., Bulga, B., and Senger, H. (1998) Photosynthetic capacity and quantum requirement of three secondary mutants of *Scenedesmus obliquus* with deletions in carotenoid biosynthesis, *Bot. Acta.*, **111**, 231-235, <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1998.tb00700.x>.
48. Polle, J. E., Niyogi, K. K., and Melis, A. (2001) Absence of lutein, violaxanthin and neoxanthin affects the functional chlorophyll antenna size of photosystem-II but not that of photosystem-I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol.*, **42**, 482-491, <https://doi.org/10.1093/pcp/pce058>.
49. Morgan-Kiss, R. M., Prisco, J. C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., and Huner, N. P. A (2006) Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments, *Microbiol. Mol. Biol. R.*, **70**, 222-252, <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006>.
50. Spijkerman, E., Wacker, A., Weithoff, G., and Leya, T. (2012) Elemental and fatty acid composition of snow algae in Arctic habitats, *Front. Microbiol.*, **3**, 380, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00380>.
51. Demmig-Adams, B., and Adams, W. W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, *Trends Plant Sci.*, **1**, 21-26, [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80019-7).
52. Bidigare, R. R., Ondrusek, M. E., Kennicutt II, M. C., Iturriaga, R., Harvey, H. R., Hohan, R. W., and Macko S. A. (1993) Evidence for photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae, *J. Phycol.*, **29**, 427-434, <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1993.tb00143.x>.
53. Соловченко А. Е., Мерзляк М. Н. (2008) Экранирование видимого и УФ излучения как фотозащитный механизм растений, *Физиол. Раст.*, **55**, 803-822.
54. Rau, W. (1988) Functions of carotenoids other than in photosynthesis, in *Plant Pigments* (Goodween, T. W., ed) Academic Press, London, pp. 231-255.
55. Gu, W., Li, H., Zhao, P., Yu, R., Pan, G., Gao, S., Xie, X., Huang, A., He, L., and Wang, G. (2014) Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-responsive strategies, *Sci. Rep.*, **4**, 1-12, <https://doi.org/10.1038/srep06661>.

THE CONTENT OF PRIMARY AND SECONDARY CAROTENOIDS IN THE CELLS OF THE CRYOTOLERANT MICROALGAE *Chloromonas reticulata*

O. V. Dymova*, V. S. Parshukov, I. V. Novakovskaya, and E. N. Patova

*Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
167982 Syktyvkar, Komi Republic, Russia; e-mail: dymovao@ib.komisc.ru*

Snow (cryotolerant) algae often form red (pink) spots in mountain ecosystems on snowfields around the world, but little is known about their physiology and chemical composition. The content and composition of pigments in the cells of the cryotolerant green microalgae *Chloromonas reticulata* have been studied. An analysis of the carotenoids content in green (vegetative) cells grown in laboratory conditions and in red resting cells collected from the snow surface in the Subpolar Urals was carried out. There were photosynthetic pigments – carotenoids such as neoxanthin, violaxanthin, anteraxanthin, zeaxanthin, lutein and β -carotene. Among the carotenoids, the ketocarotenoid astaxanthin, which has a high biological activity, was also found. It was established that the cultivation of algae at low positive temperature (+6 °C) and moderate illumination (250 $\mu\text{mol quanta}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) contributed to the accumulation of all identified carotenoids, including extraplastidic astaxanthin. In addition to the pigments, fatty acids accumulated in the algae cells. The data obtained allow us to consider the studied microalgae as a potentially promising species for the production of carotenoids.

Keywords: *Chloromonas reticulata*, green microalgae, carotenoids, astaxanthin, high-performance liquid chromatography