



УДК 582.263:577.115

И. Н. Чубчикова, м. н. с., **И. В. Дробецкая**, канд. биол. наук, н. с.,
Г. С. Минюк, канд. биол. наук, с. н. с., **Н. В. Данцюк**, вед. инж., **Э. С. Челебиева**, аспирант.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины, Севастополь, Украина

СКРИНИНГ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЗЕЛЁНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПРИРОДНЫХ КЕТОКАРОТИНОИДОВ 2. ОСОБЕННОСТИ РОСТА И ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *BRACTEACOCCLUS* (CHLOROPHYCEAE)

Впервые определены продукционные характеристики культур двух видов зелёных микроводорослей из рода *Bracteacoccus* (*B. minor* и *B. giganteus*) при выращивании по унифицированной схеме скрининга коммерчески перспективных продуцентов природных кетокаротиноидов. По средней удельной скорости роста ($0.5 - 0.59 \text{ сут}^{-1}$), выходу суммарных кетокаротиноидов ($\approx 1.7 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) и их содержанию в сухой биомассе (0.9 – 1.0 %) оба вида могут быть рекомендованы для дальнейших исследований по разработке технологий их массового культивирования.

Ключевые слова: *Bracteacoccus* spp., культивирование, астаксантин, кантаксантин

Данная работа выполнена в рамках исследований по скринингу зелёных микроводорослей для выявления новых коммерчески перспективных продуцентов природных кетокаротиноидов астаксантина и кантаксантина. Как уже упоминалось ранее [2], решение этой задачи осуществляется на основе системы Chlorophyceae, разработанной проф. И. Ю. Костиковым [1]. Согласно данному варианту таксономии, род *Bracteacoccus* Tereg 1923 является типовым для семейства Bracteacoccaceae, расположенного в системе у основания филогенетического древа порядка Scenedesmales. Примечательной особенностью порядка является наличие во всех без исключения 9 семействах видов, обладающих специфическим, генетически обусловленным признаком – способностью к вторичному каротиногенезу (ВКРГ). Как правило, это – обитатели солоноватых и временных пресноводных водоёмов, а также почвенные и аэрофитные водоросли [5, 6, 9, 10, 12, 17].

Внушительный, на первый взгляд, объём сведений о распространении ВКРГ внутри

порядка Scenedesmales, безусловно указывающий на его приоритет при проведении скрининга активных продуцентов кетокаротиноидов (ККР), в действительности получен в ограниченном числе работ и имеет довольно невысокую информативность в прикладном аспекте из-за своей фрагментарности. Лишь в немногих публикациях приведены количественные данные по ключевым критериям скрининга – скорости роста водорослей, их устойчивости к экстремальным воздействиям, выходу суммарных КР и их компонентов из литра культуры [5, 10, 17]. Отдельные работы сфокусированы, главным образом, на идентификации фракционного состава у новых объектов (как правило, с неопределённой коммерческой перспективой) [6, 12, 18], а наиболее широко цитируемое исследование [9] содержит фактически только «чек-лист» видов, способных синтезировать астаксантин (АСТ) и кантаксантин (КАН).

Всё сказанное имеет прямое отношение к роду *Bracteacoccus*, с которого, по нашему мнению, наиболее целесообразно начинать

скрининг *Scenedesmales* в силу его «базального» положения в филогенетической системе порядка. В литературе для этого рода нам удалось найти лишь три источника, содержащих: а) указание на то, что «клетки всех известных видов семейства *Bracteacoccaceae* при старении накапливают вторичные каротиноиды (ВКР)» [1]; б) данные по скорости роста 6 видов *Bracteacoccus* на среде Шетлика и фракционному составу ВКР у одного вида – *Bracteacoccus* sp. (штамм КАН 2В) [14]; в) характеристику роста *B. minor* (штамм Громов) на среде Г6 без анализа состава пигментов [4]. Этих сведений, несомненно, полезных для разработки обобщённой физиолого-биохимической характеристики таксона, всё же недостаточно для прогнозирования наличия среди его представителей промышленно перспективных продуцентов АСТ и КАН. Монофилетичность рода *Bracteacoccus* [15] позволяет предположить сходство путей биосинтеза АСТ (и, возможно, тождественность качественного состава ВКР) у всех его видов, что вовсе не означает равенства скоростей накопления отдельных ККР в условиях индуцированного ВКРГ.

Проверке этой гипотезы на примере двух видов *Bracteacoccus* (*Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrová 1931 и *B. giganteus* Bischoff et Bold 1963), характеризующихся наиболее ярким проявлением ВКРГ в старых агаризованных культурах, и посвящена данная работа. Её основные задачи заключались в определении скорости роста культур, содержания и состава ВКР в биомассе, а также среднесуточного выхода АСТ и КАН при выращивании водорослей по унифицированной схеме скрининга продуцентов АСТ и КАН методом двухстадийной накопительной культуры [2].

Материал и методы. В работе использовали культуры *Bracteacoccus minor* (штамм Chodat. Деп.:SAG (221-1) = ССАР 221/1 = UTEX 66 = АСКУ 506-06 = IBSS-88) и *B. giganteus* (штамм Костиков 1996. Деп.: Костиков. АСКУ

461-06 = IBSS-87) из коллекции Киевского национального университета им. Т. Г. Шевченко.

На I («зелёной») стадии водоросли выращивали на питательной среде ВВМ 3N в стеклянных конических колбах объёмом 100 мл при одностороннем боковом освещении люминесцентными лампами «Fegon» (DL 20W T4 6400K) с фотопериодом 15 ч свет : 9 ч темнота и интенсивностью ФАР (Е) на поверхности колб $120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{c}^{-1}$. Температура среды составляла 26 – 27°C, объём культур – 60 мл, скорость продувки воздухом – 1 л·мин⁻¹. Начальная численность клеток в культурах варьировала в пределах: *B. minor* – $(1.5 - 1.8) \cdot 10^9$ и *B. giganteus* – $(1.8 - 1.9) \cdot 10^9$ кл·л⁻¹. При переходе на стадию индуцированного ВКРГ («красную стадию») культуры разбавили в 10 раз 10-кратно редуцированной по N и P средой ВВМ 1N и перевели на круглосуточное двухстороннее освещение (при Е = $130 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{c}^{-1}$ с каждой из сторон). Температура среды при этом увеличилась до 30 – 33°C. Скорость барботажа оставалась неизменной – 1 л·мин⁻¹. Для интенсификации биосинтеза ККР в среду внесли NaAc и NaCl до конечной концентрации соответственно 0.05 и 0.2 М. Продолжительность I стадии составляла 6 сут, II стадии – 14 сут.

Численность клеток (N), содержание сухого вещества (СВ), удельную скорость роста (μ) и среднюю продуктивность (P) культур определяли как в [3].

Содержание суммарных каротиноидов (Σ КР) анализировали по [20], фракционный состав КР – методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10 x 20) в двух системах растворителей: I – гексан-ацетон 9 : 1; II – гексан-бензол-ацетон 5 : 3.75 : 0.8. Для расчёта концентрации отдельных фракций использовали следующие коэффициенты удельного поглощения: для АСТ = 2177.4 [7], β -каротин – 2500, лютеин – 2550, КАН – 2200, неидентифицированных ККР (ККР н/ид) – 2200 [8].

Данные, приведённые на рисунках и в тексте, являются средними (\bar{x}) из значений полученных в двух биологических и трех аналитических повторностях.

Их вариабельность характеризуется выборочным стандартным отклонением (s).

Результаты и обсуждение. Накопительные кривые и средние показатели роста

культур *B. minor* и *B. giganteus* за 6 суток I («зелёной») стадии культивирования представлены на рис. 1 А и в табл. 1.

Рис. 1 Динамика численности клеток в культурах *Bracteacoccus minor* и *B. giganteus* на I (А) и II (Б) стадиях культивирования

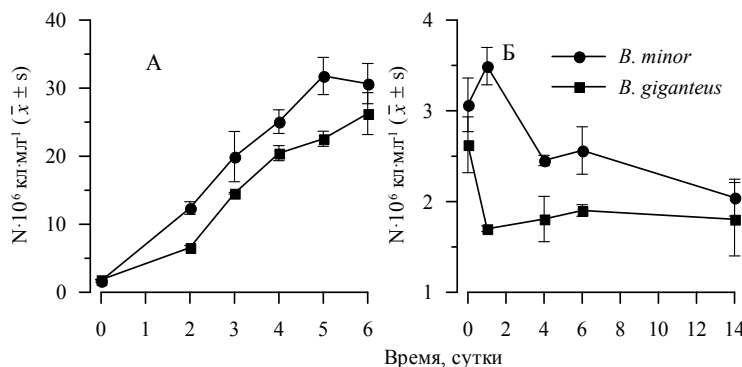


Fig. 1 The dynamics of cell number in *Bracteacoccus minor* and *B. giganteus* cultures during I (A) и II (Б) cultivation stages

Показатели роста	Время, сутки	
	<i>B. minor</i>	<i>B. giganteus</i>
μ_N макс., сут ⁻¹	1.00 ± 0.10	0.80 ± 0.03
μ_N ср., сут ⁻¹	0.48 ± 0.003	0.44 ± 0.01
N (6-е сут), 10 ⁷ кл·мл ⁻¹	3.07 ± 0.29	2.63 ± 0.31
P_N ср., 10 ⁶ кл·мл ⁻¹ ·сут ⁻¹	4.83 ± 0.46	4.07 ± 0.50
μ_{CB} ср., сут ⁻¹	0.50 ± 0.01	0.48 ± 0.01
P_{CB} ср., г·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.02
CB макс., г·л ⁻¹	1.70 ± 0.07	1.87 ± 0.09

Табл. 1 Ростовые характеристики *Bracteacoccus minor* и *B. giganteus* на I стадии культивирования ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Growth characteristics of *Bracteacoccus minor* and *B. giganteus* during I stage of cultivation ($\bar{x} \pm s$)

Оба вида характеризовались близкими показателями роста со слабо выраженной тенденцией более быстрого деления клеток у *B. minor*. При этом *Bracteacoccus* spp. существенно (в 2 – 3 раза) превосходили по всем параметрам (см. табл. 1), виды, исследованные нами ранее в сходных условиях (*Scotiellopsis rubescens*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum granatum*, *Pseudosporogococcum protococcoides*, *Haematococcus pluvialis*) [3, 5]. Судя по [4, 14], полученные в нашем эксперименте скорости роста не являются предельными для *B. minor* и *B. giganteus*. В отличие от планктонных водорослей, некоторые эдафотитные виды характеризуются более высокими значениями точки светового насыщения роста. У *B. minor*, по [4], она находится в диапазоне 100 – 150 Вт·м⁻² ФАР при температурном оптимуме 30 – 32°C. Кроме того, этот вид хорошо выдерживает снижение рН среды до 5, что позволяет поддерживать концентрацию CO₂ (C_{CO2}) в воздушно-углекислотной смеси на уровне 1.5 %. В

этих условиях средняя продуктивность культур *B. minor* (штамм Громов) по сухому веществу достигает 0.6 г·л⁻¹·сут⁻¹, что, как минимум, в 5 – 6 раз превышает аналогичный показатель у *H. pluvialis*. Данные, свидетельствующие о возможности увеличения продуктивности культур *Bracteacoccus* spp. на «зелёной» стадии, приведены также в [14], где для 4 из 6-ти исследованных видов *Bracteacoccus* в сравнительно близких условиях (E – 70 Вт·м⁻², C_{CO2} – 2% v/v, T – 32°C) были получены высокие значения $\mu_{\text{макс}}$ – 2.56 – 3.54 сут⁻¹.

Перевод культур на стадию индуцированного ВКРГ путём резкого изменения комплекса физико-химических параметров среды вызвал типичную для продуцентов ККР ответную реакцию – прекращение деления и частичное отмирание клеток (32 – 33%) (рис. 1 Б), а также интенсивное накопление в клетках СВ (рис. 2) и ВКР (табл. 2).

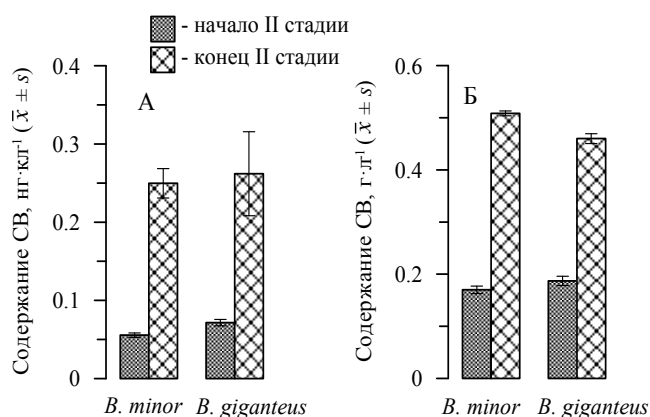


Рис. 2 Содержание сухого вещества в клетках (А) и культурах (Б) *Bracteacoccus* spp. в начале и конце стадии вторичного каротиногенеза
Fig. 2 Initial and final dry weight content in cells (А) and cultures (Б) of *Bracteacoccus* spp. at the secondary carotenogenesis stage

Содержание суммарных КР	<i>B. minor</i>	<i>B. giganteus</i>
пг·кл ⁻¹	2.10 ± 0.24	2.61 ± 0.46
мг·л ⁻¹ культуры	4.60 ± 0.88	4.61 ± 0.22
% СВ	0.90 ± 0.02	1.00 ± 0.01

Табл. 2 Содержание суммарных каротиноидов у *Bracteacoccus minor* и *B. giganteus* в конце стадии вторичного каротиногенеза
Table 2 Total carotenoid content in *Bracteacoccus minor* and *B. giganteus* at the end of secondary carotenogenesis stage

Наиболее вероятной причиной значительной смертности клеток является внесение в среду NaCl. Как показали более поздние эксперименты, этот приём, применявшийся нами ранее для интенсификации ВКРГ в плотных культурах *H. pluvialis* при интенсивности ФАР 120 – 140 мЕ·м⁻²·с⁻¹, нецелесообразно использовать в разбавленных культурах при резком (в данном случае 20-кратном) увеличении освещённости [2]. Поэтому в дальнейшем для такого варианта метода двухстадийной культуры NaCl как дополнительный стресс-агент использоваться не будет.

Хотя содержание ∑КР в клетках *Bracteacoccus* spp. на заключительной стадии ВКРГ было почти на 2 порядка ниже, чем в зрелых апланоспорах *H. pluvialis* (150 – 220 пг·кл⁻¹ [3]), общий выход ∑КР из литра исходной культуры у обоих видов (46 мг·л⁻¹) был лишь в 1.3 раза ниже, чем у *H. pluvialis* (61 мг·л⁻¹) при культивировании последнего на модифицированной среде ОНМ в сходных световых и температурных условиях и аналогичном способе индукции ВКРГ [3]. Это объясняется более высокой плотностью культур *Bracteacoccus* spp. в конце «зелёной» стадии культивирования (2 – 3·10⁷ кл·мл⁻¹ против 3 – 5·10⁵ кл·мл⁻¹ у *H. pluvialis*). При этом среднесуточный выход ∑КР у сравниваемых видов был сходным (около 2 мг·л⁻¹·сут⁻¹), так как

продолжительность «зелёной» стадии у *Bracteacoccus* spp. была на 8 сут. короче.

Во фракционном составе ∑КР, выделенных из биомассы *B. minor* и *B. giganteus* на 14 сут «красной» стадии, выявлено 15 фракций КР (рис. 3). Две из них – № 1 (β-каротин) и № 15 (лютеин) являются первичными КР, а остальные 13 фракций (> 80 % от суммы) относятся к группе вторичных кетокаротиноидов, что подтверждается положительной качественной реакцией всех фракций с боргидридом натрия [19].

Предварительную идентификацию ККР проводили путём сравнения хроматограмм ацетоновых экстрактов биомассы *B. minor* и *B. giganteus* с хроматограммами экстрактов зрелых апланоспор *H. pluvialis*. Фракции, сходные по хроматографической подвижности (Rf) с эстерифицированными и свободной формами АСТ и КАН (№ 2 – 4, 8, 10, 13 – 14), анализировали с использованием химических тестов на количество кетогрупп, наличие гидроксоосогрупп, сложноэфирных связей, а также по абсорбционным спектрам в 3 растворителях (гексан, бензол, ацетон) и совместной хроматографии со стандартами. Стандарт КАН получали из цист *Artemia* sp., свободного АСТ – из зрелых апланоспор *H. pluvialis* путем омыления эфиров АСТ, а также из мышц *Salmon salar* [19].

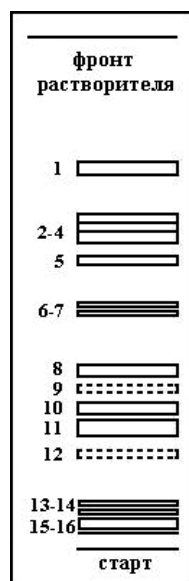


Рис. 3 Схема тонкослойной хроматограммы пигментов *Bracteacoccus minor* и *B. giganteus*: 1 – β-каротин, 2 - 4 – диэфиры астаксантина, 5 – н/ид кетокаротиноид, 6,7 – н/ид ККР, 8 – кантаксантин, 9 – н/ид ККР (следы), 10 – моноэфиры астаксантина, 11 – моноэфиры н/ид дикето-ККР, 12 – н/ид ККР (следы), 13 – свободный астаксантин, 14 – н/ид свободный гидрокси- ККР, 15 – лютеин, 16 – ХЛ а (ККР – кетокаротиноид, н/ид – неидентифицированный)

Fig. 3 Scheme of thin layer chromatogram of *Bracteacoccus minor* и *B. giganteus* pigments: 1 – β-carotene, 2 - 4 – astaxanthin diesters, 5 – un/d diketo-KCR, 6,7 – un/d KCR, 8 – canthaxanthin, 9 – un/d KCR (traces), 10 – astaxanthin monoesters, 11 – un/d di-KCR monoester, 12 – un/d KCR (traces), 13 – free astaxanthin, 14 – un/d free hydroxo-KCR, 15 – lutein, 16 – chlorophyll a (KCR – ketocarotenoid, un/d – undetermined)

Минорные полярные фракции свободных ККР № 13 и 14, имеющие близкие *R_f*, собирали с нескольких пластин и дополнительно разделяли на пластинах «Silufol» в более полярной системе растворителей этилацетат-бензол 3 : 7. Сопоставление фракций № 2 – 4, 8,

10, 13 – 14 со стандартами по перечисленным характеристикам выявило их идентичность, что позволило оценить относительное содержание КАН и различных форм АСТ в ΣКР (табл. 3) и рассчитать их выход из лигря исходной культуры у обоих видов (рис. 4).

Табл. 3 Состав каротиноидов (% от суммы) у *B. minor* и *B. giganteus* на 14-е сутки «красной» стадии
Table 3 Carotenoid composition (% of total content) in *B. minor* и *B. giganteus* at 14-th day of «red» stage

№ фракции	<i>R_f</i> фракции	Наименование фракции	Содержание каротиноидов, % ($\bar{x} \pm s$)	
			<i>B. minor</i>	<i>B. giganteus</i>
1	0.81	β-каротин	следы	7.11 ± 1.78
2 – 4	0.68 – 0.66	диэфиры астаксантина	42.26 ± 1.76	14.23 ± 0.34
5	0.61	н/ид кетокаротиноид	5.92 ± 0.58	5.47 ± 0.47
6 – 7	0.53 – 0.51	н/ид кетокаротиноид	5.41 ± 0.03	4.58 ± 0.18
8	0.38	кантаксантин	12.81 ± 0.29	18.77 ± 1.59
10	0.3	моноэфиры астаксантина	9.25 ± 0.70	34.21 ± 4.59
11	0.27	моноэфиры н/ид кетокаротиноида	10.28 ± 0.82	10.65 ± 0.80
13 – 14	0.11 – 0.09	свободный АСТ + н/ид свободный кетокаротиноид	следы	8.06 ± 2.04
15	0.06	лютеин	13.98 ± 2.58	следы
		сумма кетокаротиноидов	85.93 ± 2.44	83.64 ± 4.41

Необходимо отметить, что качественный состав каротиноидов в ацетоновых экстрактах биомассы *B. minor* и *B. giganteus* был идентичным. Однако у *B. minor* процессы превращения β-каротина в АСТ и эстерификации

последнего протекали более полно, чем у *B. giganteus*, о чём свидетельствуют следовые количества β-каротина, свободного АСТ и его прямого предшественника адониксантина (фр. № 14), более низкое относительное содержание

КАН, а также более высокое соотношение ди- и моноэфиров АСТ (4.6 против 0.4 у *B. giganteus*).

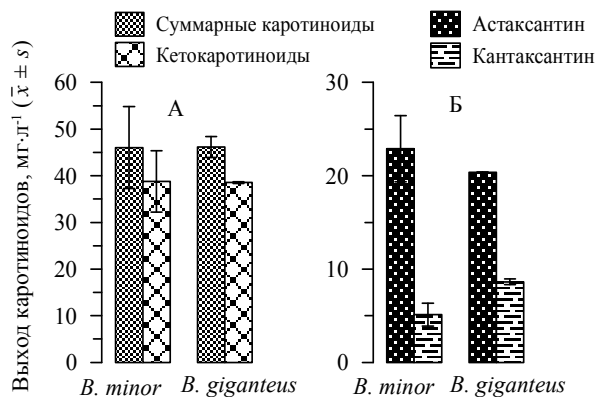


Рис. 4. Выход кетокаротиноидов (А) и их основных фракций (Б) из литра исходных культур двух видов *Bracteacoccus* за 20 суток

Fig. 4. Yield of cetocarotenoids and their main fractions (Б) from liter initial culture of two species of *Bracteacoccus* for 20 days

Физиологическое значение подобного рода различий, как для самих продуцентов АСТ, так и их потенциальных потребителей, пока остаётся неясным, равно как и вопрос о том, закреплены ли эти различия генетически или при помощи изменения условий культивирования можно (и нужно ли?) сдвигать направленность биосинтеза в сторону полного превращения интермедиатов в эстерифицированные формы АСТ. Известно, что свободные

ККР усваиваются лучше, чем их эфиры, а наличие в смеси ККР каротиноидов с дополнительными биологическими функциями расширяет область её физиологической активности [2]. Решение этих вопросов лежит за рамками первичного скрининга активных продуцентов ККР, первые результаты которого, представленные в данной работе, несомненно, свидетельствуют о целесообразности продолжения исследований обоих видов в качестве возможных объектов массового культивирования.

Выводы. По среднесуточному выходу Σ КР из литра исходной культуры ($2.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) и относительному содержанию в них всех форм АСТ (около 50 % от суммы) *Bracteacoccus minor* и *B. giganteus* могут быть рекомендованы для дальнейших исследований по разработке методов их интенсивного культивирования как сырья для получения природных ККР.

Благодарности. Работа выполнена в рамках конкурсного проекта НАН Украины «Полевые и экспериментальные исследования биологических ресурсов и морской среды Чёрного моря».

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующему кафедрой ботаники Киевского национального университета им. Т. Г. Шевченко д.б.н, проф. И. Ю. Костикову за предоставление культуры микроводорослей из коллекции АСКУ и консультации по вопросам систематики зелёных микроводорослей.

1. Костіков І. Ю., Романенко П. О., Демченко Е. М. і інш. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.
2. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Данцюк Н. В., Челебиева Э. С. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований // Экология моря. – 2010. – Вып. 80. – С. 67 – 78.
3. Терентьева Н. В., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. и др. Влияние освещенности на физиолого-биохимические характеристики зеленой микроводоросли *Haematococcus pluvialis* (Chlamydomonadales) // Экология моря. – 2008. – Вып. 75. – С. 82 – 88.
4. Урмыч Е.М., Бердыкулов Х.А., Эшпулатова М.Б. Продуктивность микроводорослей в интенсивных условиях культивирования // Альгология. – 2008. – 18, № 3. – С. 347-352.
5. Чубчикова И. Н., Минюк Г. С., Дробецкая И. В. и др. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов // Экология моря – 2009. – Вып. 77. – С. 77 – 83.
6. Abe K., Hattori H., Hirano M. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata* // Food Chem. – 2007. – 100, № 2. – P. 656-661.
7. Aquasearch Technical report 1002.001. Analysis of total astaxanthin in algae meal prepared from *Haematococcus pluvialis* // – Aquasearch, Inc., <http://www.fda.gov>.
8. Chapman D. J. Formation and analysis of secondary carotenoids // Experimental phycolgy.

- A laboratory manual. – Cambridge Univer. Press, 1988. – P. 104 – 110.
9. Czygan F.-C. Primäre und sekundäre Carotenoide in chlorokokkalen Algen // Arh. Hydrobiol. Suppl. – 1982. – **60**, No 4. – P. 470 – 488.
 10. Del Campo A., Rodrigues H., Moreno J. et al. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta) // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – **64**, No 6. – P. 848 – 854.
 11. Deming D. M., Boileau T. W.-M., Heintz K. H. et al. Carotenoids: Linking Chemistry, Absorption and Metabolism to Potential Roles in Human Health and Disease // Handbook of Antioxidants. – New York- Basel: Marcel Dekker, Inc., 2002 – P.178 – 211.
 12. Fujii K., Imazato E., Nakashima H. et al. Isolation of non fastidious microalgae with astaxanthin-accumulation property and its potential for application to aquaculture // Aquaculture. – 2006. – **261**. – P. 285 – 293.
 13. Jeffrey S. W., Mantoura R. F. C., Bjørnland T. Data for identification of 47 key phytoplankton pigments / Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. – UNESCO Publishing: Paris, 1997. – P. 493 – 553.
 14. Kopecký J., Schoefs B., Loest K. et al. Microalgae as source for secondary carotenoid production: a screening study // Algological Studies. – 2000. – **98**. – P. 153 – 168.
 15. Lewis L. A. Diversity and phylogenetic placement of *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on 18S ribosomal RNA gene sequence data // J. Phycol. – 1997. – **33**, No 2. – P. 279 – 285.
 16. Liu B.-H., Lee Y.-K. Composition and biosynthesis pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. // Biotechnol. Lett. – 1999. – **21**. – P. 1007 – 1010.
 17. Orosa M., Torres E., Fidalgo P. et al. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae // J. Appl. Phycol. – 2000. – **12**, No. 3/5. – P.553 – 556.
 18. Qin S., Liu G.-X., Hu Z.-Y. The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) // J. Process biochemistry. – 2008. – **43**, No 8. – P. 795 – 802.
 19. Rodriguez-Amaya D. B. A guide to carotenoid analysis in foods / Washington: ILSI Press, 2001. – 71 p.
 20. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Physiol. – 1994. – **144**. – P. 307 – 313.

Поступила 05 августа 2010 г.

Скрининг зелених мікрводоростей як потенційних джерел природних кетокаротиноїдів 2. Особливості росту і вторинного каротиногенезу у представників роду *Bracteacoccus* (Chlorophyceae). I. M. Чубчикова, I. V. Дробецька, G. S. Мінюк, N. V. Данцюк, E. S. Челебієва Вперше визначено продукційні характеристики культур двох видів зелених мікрводоростей з роду *Bracteacoccus* Tereg 1923 (*B. minor* u *B. giganteus*) при вирощуванні за уніфікованою схемою скринінгу комерційно перспективних продуцентів природних кетокаротиноїдів. Показано, що за середньою питомою швидкістю росту ($0.5 - 0.6 \text{ доб}^{-1}$), виходом сумарних кетокаротиноїдів ($\approx 1.7 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{доб}^{-1}$) і їх вмістом в сухій біомасі (0.9 – 1.0 %) обидва види можуть бути рекомендовані для подальших досліджень з розробки технологій їх масового культивування.

Ключові слова: *Bracteacoccus* spp., культивування, астаксантин, кантаксантин

Screening of green microalgae as a potential source of natural ketocarotenoids 2. Features of growth and secondary carotenogenesis in the representatives of the genus *Bacteacoccus* (Chlorophyceae). I. N. Chubchikova, I. V. Drobetskaya, G. S. Minyuk, N. V. Dantsyuk, E. S. Chelebiyeva. Productivity characteristics of two *Bracteacoccus* species (*B. minor* u *B. giganteus*) under screening of commercially suitable natural ketocarotenoid producers by uniform mode of two stage batch cultures have been determined for the first time. It has been shown that in accordance with to specific growth rate ($0.50 - 0.59 \text{ day}^{-1}$), total carotenoid yield ($\approx 1.7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) and carotenoid content in dry biomass (0.9 – 1.0 %) both species can be recommended for further studies on developing of their mass culture technology.

Key words: *Bracteacoccus* spp., cultivation, astaxanthin, canthaxanthin