

УДК 639.3594.121

А.В. БОРОДИНА, Л.В. ЛАДЫГИНА

Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины,
просп. Нахимова, 2, 99011 Севастополь, Крым, Украина
e-mail: lvladygina@yandex.ru

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM ВОНЛ. (BACILLARIOPHYTA) НА
НАКОПЛЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ**

Исследован качественный и количественный состав каротиноидов диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum*, культивируемой при разной температуре и освещённости. Установлено, что каротиноидный состав микроводоросли представлен 5 фракциями: β-каротин, фукоксантин, диадиноксантин, диатоксантин и диадиноксидин. Фукоксантин находился в двух изомерных формах: *транс*- и *цис*-. Показано, что накопление каротиноидов зависит от условий культивирования. Максимальное накопление фукоксантина происходит при температуре 30 °С и постоянной освещённости 4,5 клк.

Ключевые слова: микроводоросль *Phaeodactylum tricornutum*, культивирование, каротиноиды, фукоксантин, температура, освещённость.

Введение

В последнее время большое внимание уделяется изучению роли каротиноидов в жизнедеятельности человека и животных. Известно, что каротиноиды принимают активное участие в окислительно-восстановительных процессах клетки и обладают антиоксидантными свойствами, которые обуславливают их антимутагенное, антиканцерогенное, антиинфекционное и радиопротекторное действие (Беспалов, Некрасова, 2000; Walker et al., 2005; Peng et al., 2011). Традиционными источниками каротиноидов являются вегетативные органы, плоды, семена растений. Однако они не могут в полной мере обеспечить потребности медицины, пищевой промышленности, сельского хозяйства каротиноидами (Штайгер, 1994; Dufossé, 2009; Hashimoto, 2009). Для этого были синтезированы основные типы пигментов, разработаны методы их выделения и идентификации, изучен метаболизм и некоторые биологические функции. Но вскоре выяснилось, что природные формы пигментов отличаются от их синтетических аналогов составом изомеров, более высокой биологической активностью и безопасностью применения (Britton et al., 1998; Deming et al., 2002; Hussein et al., 2006; Britton et al., 2008).

© А.В. Бородина, Л.В. Ладыгина, 2013

Растущий рыночный спрос на природные формы каротиноидов инициирован рекомендациями ВОЗ по полному исключению синтетических БАВ и красителей из производства продуктов питания и кормов (Bjerkeng, 2008; Минюк и др., 2010).

Поэтому в настоящее время активно ведётся поиск альтернативных источников каротиноидов среди макро- и микроводорослей, дрожжей, бактерий, грибов с целью разработки технологии их промышленного культивирования для дальнейшего применения в медицине, косметологии и пищевой промышленности. В связи с растущим интересом к природным растительным пигментам возникла необходимость в поиске новых каротиноидов, образующихся в процессе их дальнейшего метаболизма по трофическим цепям, изучению их свойств и функций в клетках (Palermo et al., 1991; Zurdo et al., 1991; Britton et al., 1998; Walker et al., 2005; Britton et al., 2008).

Перспективным объектом таких исследований может быть диатомовая микроводоросль *Phaeodactylum tricornutum*. Наличие пигментов, богатство полиненасыщенных жирных кислот (20:5 n-3 – 17,9 %, 22:6 n-3 – 14,2 %) вызывает повышенный интерес к *Ph. tricornutum* как к объекту биотехнологии (Viso, Marty, 1993; Ладыгина, 2010). Коричневая окраска клеток водоросли связана с высоким содержанием пигмента фукоксантина, который вместе с хлорофиллами *a* и *c* входит в светособирающий комплекс фотосистемы, что указывает на фотосинтетическую активность этого каротиноида (Peng et al., 2011). Известно, что комплексное изменение условий культивирования (увеличение температуры, освещённости, концентрации CO₂) сопровождается увеличением содержания каротиноидов в клетках микроводорослей. Их биосинтез является приспособительной реакцией организмов к экстремальным условиям среды (Britton et al., 1998; Божков, Комаристая, 2003; Маока, 2009). В связи с этим особенно актуальным является изучение условий культивирования микроводоросли *Ph. tricornutum* для получения биомассы с максимальным содержанием каротиноидов.

Целью данной работы является исследование каротиноидного состава микроводоросли *Ph. tricornutum* при разных температурных (22–30 °С) и световых (3–4,5 клк) режимах культивирования, при наличии и отсутствии барботажа.

Материалы и методы

Объектом нашего исследования была диатомовая микроводоросль *Ph. tricornutum* (штамм IBSS – 41) из коллекции ИнБЮМ НАН Украины. Выращивали её в режиме накопительной культуры на питательной среде F/2 в поллитровых конических колбах с объемом суспензии 450 мл. Эксперименты проводили при разных температурных и световых режимах, а также при наличии и отсутствии барботажа (табл. 1). Ростовые показатели водоросли определяли спектрофотометрически на

СФ-2000 производства ОКБ «Спектр» (Санкт-Петербург). Для перехода от оптической плотности культуры (D_{750}) к численности клеток (n , млн/мл) или к содержанию сухой биомассы (мг/мл) были построены калибровочные графики (рис. 1).

Таблица 1

Условия проведения экспериментов

Номер эксперимента	t , °С	Освещенность, клк	Барботаж	Длительность, сут
1	22–24	Непрерывное освещение 3,5 клк	постоянный 0,2 л·мин ⁻¹	10
2	27–28	Непрерывное освещение 4,0 клк	постоянный 0,2 л·мин ⁻¹	5
3	30	Непрерывное освещение 4,5 клк	постоянный 0,2 л·мин ⁻¹	5
4	30	Дневное освещение 3 клк, фотопериод 16 ч свет : 8 ч темнота	без барботажа	5

На рис. 1 показана зависимость оптической плотности культуры от числа клеток или концентрации сухой биомассы в виде уравнения с коэффициентом пересчёта и корреляции (R). Каждая точка на графике является средней четырех измерений.

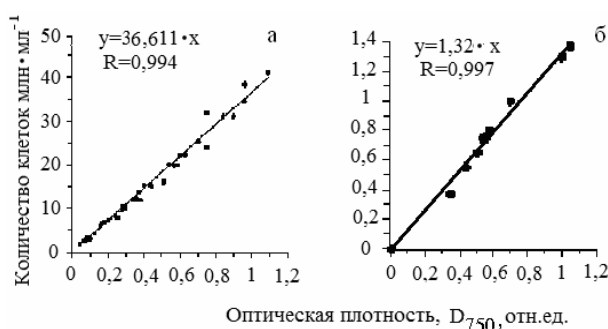


Рис. 1. Зависимость оптической плотности суспензии *Phaeodactylum tricoratum* от численности клеток (а) и концентрации сухой биомассы (б)

Для определения качественного и количественного состава каротиноидов пробы отбирали на стационарной фазе роста культуры; численность клеток составляла 4–20 млн кл./мл. Биомассу отделяли от питательной среды и отмывали водой от остатков солей с помощью центрифугирования на лабораторной центрифуге ОПН-3 в течение 10–15 мин при 3000 об./мин. Пигменты экстрагировали 100 %-ным ацетоном, их

содержание определяли спектрофотометрическим методом. Концентрацию хлорофиллов (хл.) и каротиноидов (кр.) (мг/л) рассчитывали по уравнениям (для 90 %-ных ацетоновых экстрактов):

$$C_{\text{хл.а}}, \text{ мг/л} = 11,47 \cdot E_{664} - 0,40 \cdot E_{630};$$

$$C_{\text{хл.с}}, \text{ мг/л} = 24,36 \cdot E_{630} - 3,73 \cdot E_{664};$$

$$C_{\text{кр.}}, \text{ мг/л} = \frac{E \cdot V}{E_{1\text{см}}^{1\%}},$$

где E – абсорбционный максимум $\lambda_{\text{макс}}$; V – объем раствора каротиноидов, мл; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – коэффициент экстинкции (Jeffrey, Humphrey, 1975; Jeffrey, Welschmeyer, 1997).

Для исследования качественного состава каротиноидов *Ph. tricornutum* ацетоновый экстракт упаривали в вакуумном роторном испарителе при температуре 25 °С, растворяли в хлороформе и анализировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах с силикагелем («Силуфол») в двух системах растворителей – ацетон-гептан (3:7) и ацетон-гексан (3,5:6,5). Разделившиеся таким образом пигменты извлекали, растворяли в ацетоне и регистрировали спектры поглощения в диапазоне длин волн 400 – 560 нм на спектрофотометре СФ-2000.

Точную идентификацию каротиноидов *Ph. tricornutum*, с учетом изомерии молекул, выполняли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с обращенной колонкой ODS и OPD (субстрата Орто-Фенилен Диамин). Подобное сочетание указанных методов широко используется для определения витаминов (Eitenmiller et al., 2008). Фракции каротиноидов разделяли на жидкостном хроматографе высокого давления Shimadzu LC-6AD, снабженном колонкой длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, с неподвижной фазой COSMOSIL SSL-11, в системе растворителей хлороформ-метанол (3:7), скорость подачи элюата 0,5 мл/мин, детектирование при 460 нм (Маока, Akimoto, 2008).

Результаты по содержанию каротиноидов, приведенные в работе, являются средними (\bar{x}) из четырех биологических повторностей. Их вариабельность характеризуется выборочным стандартным отклонением (s).

Результаты и обсуждение

В условиях полного минерального обеспечения, которые позволяли клеткам активно делиться на протяжении длительного времени, наблюдался очень быстрый переход культуры в стационарную фазу роста. Так, в экспериментах № 2–4 это произошло уже на 5-е сутки выращивания, а в № 1 – на 9 сутки. Очевидно, это связано с тем, что в каждом эксперименте были определены лимитирующие факторы, ограничивающие рост культуры. Такими факторами являлись: высокая температура 27–30 °С, увеличение интенсивности света от 3 до 4,5 клк и недостаток углекислого газа. Динамика роста культуры *Ph. tricornutum* в четырех экспериментах представлена на рис. 2 (номера кривых роста отвечают номеру эксперимента, указанному в табл. 1).

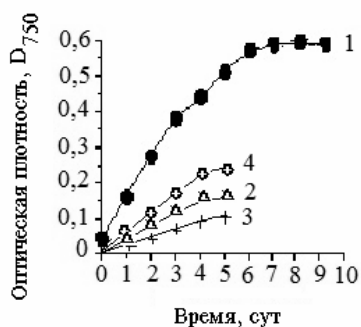
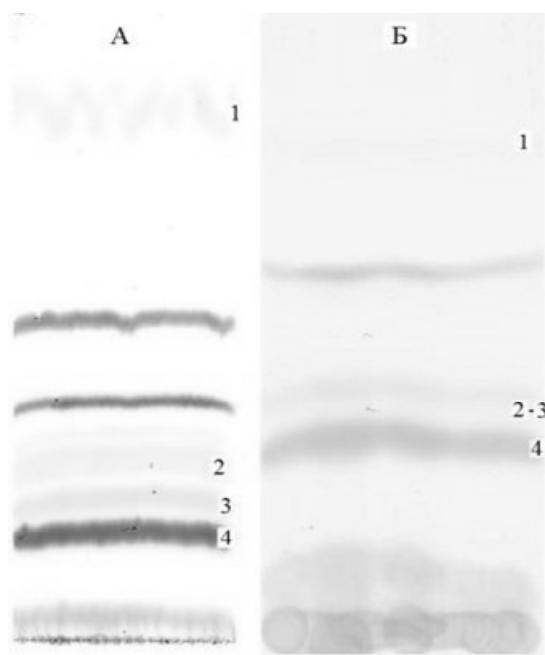


Рис. 2. Динамика роста *Phaeodactylum tricornutum* в четырех экспериментах (условия приведены в табл. 1)

Известно, что при накопительном культивировании микроводоросли *Ph. tricornutum* для получения максимальной биомассы температурный оптимум составляет 20–22 °С (Ладыгина, 2007). В эксперименте № 1 температура была всего на 2 °С выше оптимального значения, поэтому там отмечена самая высокая скорость роста культуры по сравнению с другими экспериментами. При повышении температуры до 28–30 °С скорость роста микроводоросли резко снижалась, что приводило к уменьшению численности клеток водоросли в экспериментах № 2 и № 4, при этом значения оптической плотности составляли, соответственно, 0,15 и 0,25 опт. ед. Самая низкая плотность культуры *Ph. tricornutum* была получена в эксперименте № 3 в результате повышения температуры культивирования до 30 °С и освещённости до 4,5 клк.

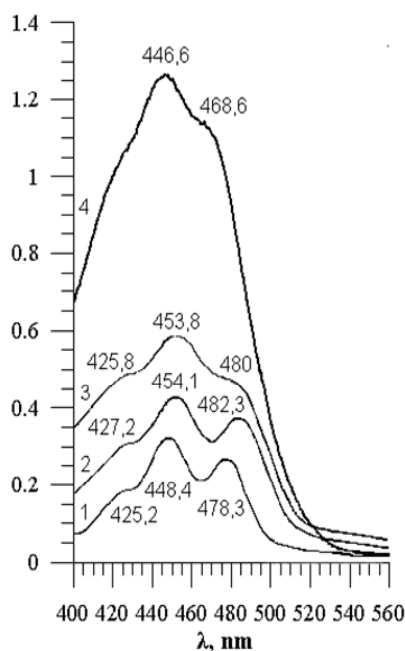
Рис. 3. ТСХ экстракта суммарных каротиноидов *Phaeodactylum tricornutum* в разных системах растворителей: А — ацетон-гептан 3:7; Б — ацетон-гексан 3,5:6,5



Когда водоросли достигли стационарной фазы роста, т.е. на 10-й день культивирования в эксперименте № 1 и на 6-й день в эксперименте

тах № 2 – 4, было проведено исследование содержания суммарных и индивидуальных каротиноидов и хлорофиллов *a* и *c*. Использование метода ТСХ в системах ацетон-гептан (3:7) и ацетон-гексан (3,5:6,5) позволило выделить четыре фракции каротиноидов (рис. 3).

Рис. 4. Спектры поглощения в видимой области 400-560 нм (в ацетоне) четырех каротиноидов: 1 – β -каротина; 2 – диадноксантина; 3 – диатоксантина; 4 – фукоксантина



Полученные данные ТСХ пигментного состава *Ph. tricornutum* (подвижности R_f) были сопоставлены с литературными данными (Owens, Wold, 1986; Kosakowska et al., 2004). Было предположено, что этими пигментами являются: 1 – β -каротин (R_f 0,83–0,95); 2 – диадноксантин (R_f 0,26–0,35); 3 – диатоксантин (R_f 0,22–0,26); 4 – фукоксантин (R_f 0,17–0,2). Спектры полученных пигментов были сняты в видимой области (в ацетоне). Спектральные характеристики разных фракций каротиноидов представлены на рис. 4. Далее экстракт суммарных каротиноидов исследовали при помощи методов HPLC с обращенными фазами ODS и OPD, позволяющих разделять пигменты по их гидрофобности (липофильности) (рис. 5).

Фукоксантин (как самый полярный, менее гидрофобный каротиноид) имеет более раннее время регистрации выхода, чем другие каротиноиды, а β -каротин, как самый липофильный, был зарегистрирован последним. Фракция фукоксантина представлена в виде двух пиков, что дает основание предполагать его нахождение в двух изомерных формах: *транс*- и *цис*-. Характеристики спектров в видимой области этих двух фракций ($\lambda_{\text{макс}}$ нм,) были такими: (420), 443, 467 и (424), 443, 469, что соответствовало *транс*- и *цис*-форме фукоксантина (Haugan et al., 1992). Однако для исключения артефакта необходимо дальнейшее уточнение с

использованием методов масс-спектрометрии и ядерно-магнитного резонанса. Присутствие двух изомерных форм у *Ph. tricornutum* связано с биологическими функциями этого каротиноида (Peng et al., 2011).

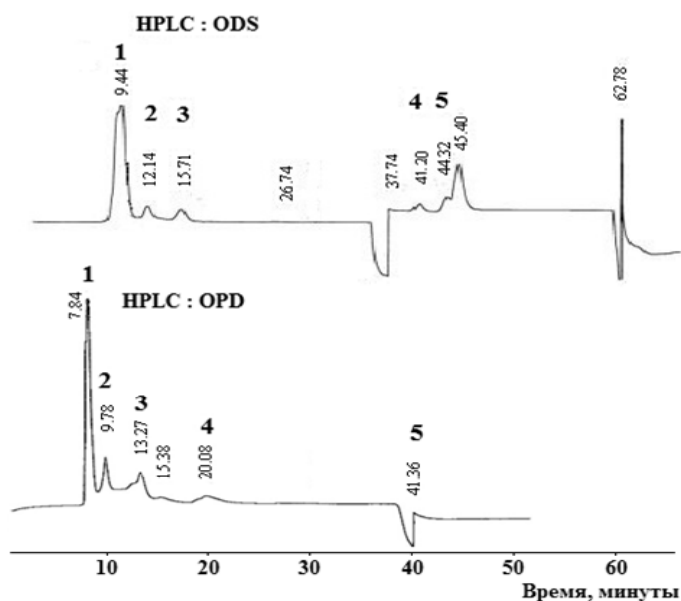


Рис. 5. Хроматограммы HPLC:ODS, HPLC: OPD суммарного экстракта пигментов *Phaeodactylum tricornutum*, растворитель метанол, система 30 % CHCl_3 : 70 % MeOH ; 1 – *транс*-фукоксантин, 2 – *цис*-фукоксантин; 3 – хлорофилл; диатоксантин и диадиноксантин; 4 – хлорофилл; 5 – β -каротин

Известно, что *транс*-конфигурации каротиноидов легче встраиваются в белковые структуры мембран, чем их *цис*-изомеры, которые уступают им также в химической антиоксидантной активности (Britton, 1995; Britton et al., 2008). Вероятно, накопление и сочетание этих изомеров вызвано необходимостью дополнительной локализации в клетке одного и того же каротиноида в активной (*транс*-) и менее активной (*цис*-) форме.

Анализ HPLC позволил идентифицировать и определить в суммарном экстракте процентное соотношение следующих каротиноидов: *транс*- и *цис*-фукоксантина, диатоксантина, диадиноксантина и диадиноксана, а также β -каротина (табл. 2).

При анализе данных четырех экспериментов по определению качественного и количественного состава каротиноидов (для разделения суммарных экстрактов на пигменты) нами были использованы только характеристики ТСХ (цвет, R_f) и спектрофотометрические методы (идентификация с помощью спектров в видимой области) (см. рис. 4). Результаты экспериментов показали, что культивирование *Ph. tricornutum* при разных температурных и световых режимах способствует количественному изменению пигментного состава микроводоросли (табл. 3).

Таблица 2

Количественное содержание каротиноидов микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum*

Состав каротиноидов	% суммы каротиноидов
<i>транс</i> -фукоксантин	68,5
<i>цис</i> -фукоксантин	5,2
Диатоксантин, диадиноксантин, диадинохром	7,1
β -каротин	19,2

Таблица 3

Биомасса и пигментный состав культуры *Phaeodactylum tricornutum* на стационарной фазе роста в четырех экспериментах

Показатель эксперимента	Условия культивирования			
	1	2	3	4
Биомасса, 1 мг сух. массы/л	7,7 \pm 0,01	2,1 \pm 0,01	1,2 \pm 0,01	3,2 \pm 0,01
Хлорофиллы <i>a</i> и <i>c</i> , % сух. массы	<i>a</i> = 0,60 \pm 0,03; <i>c</i> = 0,14 \pm 0,002	<i>a</i> = 0,15 \pm 0,02; <i>c</i> = 0,01 \pm 0,001	<i>a</i> = 0,67 \pm 0,04; <i>c</i> = 0,13 \pm 0,002	<i>a</i> = 0,42 \pm 0,03; <i>c</i> = 0,11 \pm 0,001
Суммарные каротиноиды, мг·г ⁻¹ сух. массы	5,7 \pm 0,15	2,25 \pm 0,20	6,839 \pm 0,46	8,14 \pm 0,80
Состав каротиноидов <i>Ph. tricornutum</i> в экспериментах (% суммы каротиноидов)				
β -каротин	6,5 \pm 1,01	7,5 \pm 0,90	3,5 \pm 0,36	21,2 \pm 1,15
Диадинохром	4,3 \pm 0,58	2,0 \pm 0,25	-	-
Диадиноксантин	12,2 \pm 1,05	8,2 \pm 0,75	4,7 \pm 0,75	21,9 \pm 1,50
Диатоксантин	11,2 \pm 0,90	8,3 \pm 1,02	8,0 \pm 0,88	23,8 \pm 1,35
Фукоксантин	65,8 \pm 5,45	73,9 \pm 2,50	83,8 \pm 4,55	33,1 \pm 2,67

Примечание. Цифрами 1–4 указан номер эксперимента.

Так, при максимальном значении биомассы 7,7 мг/л сухой массы, полученной при температуре, близкой к оптимальному значению (эксп. № 1), содержание суммарных каротиноидов и фукоксантина составляло, соответственно, 5,7 мг·г⁻¹ сухой массы и 65,8 % (суммарных каротиноидов). Повышение температуры на 4 °С (эксп. № 2) способствовало снижению биомассы почти в 4 раза и минимальному накоплению суммарных каротиноидов – 2,25 мг/г сухой массы. При этом концентрации β -каротина и фукоксантина были больше, чем в эксперименте № 1. Содержание хлорофиллов *a* и *c* было минимальным (при высоком значении коэффициента хлорофилл *a/c* = 15).

С повышением температуры до 30 °С и освещённости до 4,5 клк (эксп. № 3) рост микроводоросли *Ph. tricornutum* прекращался уже на 5-е

сутки, в результате получена минимальная биомасса – 1,2 мг/л сухой массы. В то же время отмечено повышение концентрации хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов, а содержание фукоксантина в клетках микроводоросли было максимальным и составляло более 83 % суммарных каротиноидов.

В четвертом эксперименте при температуре 30 °С (в дневное время суток), фотопериоде 16 ч свет : 8 ч темнота и отсутствии барботажа биомасса культуры была в 2–2,5 раза выше, чем во 2-м и 3-м экспериментах, что, вероятно, связано с понижением температуры до 26 °С в ночное время. При данных условиях культивирования *Ph. tricornutum* получено максимальное количество суммарных каротиноидов – 8,14 мг/г. Содержание β-каротина и каротиноидов диадиноксантинового комплекса было значительно большим, чем в других экспериментах, и составляло, соответственно, 21,2 и 45,7 % суммарных каротиноидов. Концентрация фукоксантина была минимальной – 33,1 %.

Содержание каротиноидов в четырех экспериментах изменялось значительно: фукоксантин 33,1–83,8 %, β-каротин 3,5–21,2 %, диадиноксантин 4,7–21,9 %, диатоксантин 8–23,8 %. Такая вариабельность накопления пигментов микроводорослью *Ph. tricornutum* при разных условиях культивирования, вероятно, связана с физиологией этого вида, его фотосинтетической активностью, а также с функциональной ролью фукоксантина в клетке (Sachindra et al., 2007).

Таким образом, содержание каротиноидов в клетках *Ph. tricornutum* в процессе выращивания при высокой температуре и без барботажа (эксп. № 4) варьировало от 21,2 до 33,1 %. Культивирование микроводоросли при высокой температуре, постоянной освещённости и наличии барботажа (эксп. № 1–3) способствовало максимальному накоплению фукоксантина, при этом концентрации других каротиноидов изменялись незначительно. В связи с этим можно предположить, что накопление фукоксантина клетками водоросли при высокой температуре может быть связано с защитной функцией этого каротиноида. Известно, например, что фукоксантин благодаря химической структуре молекулы (наличию многофункциональных групп на концах молекулы, полиеновых и ацетиленовой связей) обладает более высокими антиоксидантными свойствами по сравнению с другими каротиноидами микроводоросли *Ph. tricornutum* (Peng et al., 2011).

Заключение

Качественный состав каротиноидов микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* представлен пятью фракциями: β-каротин, фукоксантин, диадиноксантин, диатоксантин и диадинохром. Фракция фукоксантина имеет *транс*-, и *цис*-изомерную конфигурацию. Содержание *транс*-фукоксантина в клетках микроводоросли в 13 раз выше, чем *цис*-фукоксантина.

Накопление каротиноидов в клетках микроводоросли зависит от условий культивирования. Максимальное содержание фукоксантина (83,8 % суммы каротиноидов) получено при температуре 30 °С, постоянной освещённости 4,5 клк и круглосуточной аэрации.

Авторы выражают благодарность Dr. Takashi Maoka (Research Institute for Production development, г. Киото, Япония) за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беспалов В.Г., Некрасова В.Б. Изучение и применение лечебно-профилактических препаратов на основе природных биологически активных веществ. – С.Пб.: Эскулап, 2000. – 468 с.
- Божков А.И., Комаристая В.П. Липидно-каротиноидный обмен в клетках *Dunaliella* Теод. При различных условиях культивирования // Альгология. – 2003. – 13, № 2. – С. 137–147.
- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов / Пер. с англ. Г. Бриттон. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
- Ладыгина Л.В. Микроводоросли как кормовые объекты личинок мидий и устриц: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2007. – 24 с.
- Ладыгина Л.В. Каротиноидный состав микроводорослей – корма для двустворчатых моллюсков // Альгология. – 2010. – 20, № 1. – С. 33–41.
- Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Скрининг зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетакаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований // Экол. моря. – 2010. – 80. – С. 67–78.
- Штайгер Г. Применение β-каротина в пищевой промышленности // Вопр. питания. – 1994. – № 1/2. – С. 44–45.
- Bjerkeng B. Carotenoids in Aquaculture: Fish and Crustaceans // Carotenoids: Natural Functions. – Basel: Birk. Verlag, 2008. – Vol. 4. – P. 237–254.
- Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function // FASEB. – 1995. – 9, N 15. – P. 1551–1558.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids: Isolation and Analysis. – Basel: Birk. Verlag, 1995. – Vol. 1. – 328 p.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism. – Basel: Birk. Verlag, 1998. – Vol. 3. – 414 p.
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids: Natural Functions. – Basel: Birk. Verlag, 2008. – Vol. 4. – 370 p.
- 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.
- Dufossé L. Microbial and Microalgal Carotenoids as Colourants and Supplements // Carotenoids. Nutrition and Health. – Basel: Birkhauser Verlag, 2009. – Vol. 5. – P. 67–82.
- Eitenmiller R.R., Lin Y., Landen W.O. Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. – CRC Press, 2008. – 664 p.

- Hashimoto H. The 15th International Symposium on Carotenoids // Arch. Biochem. Biophys. – 2009. – **483**, N 2. – P. 145–246.
- Haugan J. A., Englert G., Glinz E., Liaaen-Jensen S. Algal carotenoids 48. Structural assignments of geometrical isomers of fucoxanthin // Acta Chem. Scand. – 1992. – **46**. – P. 389–395.
- Hussein G., Sankawa U., Goto H. et al. Astaxanthin, a carotenoid with potential human health and nutrition // J. Nat. Prod. – 2006. – **69**, N 3. – P. 443–449.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanz. – 1975. – N 167. – P. 191–194.
- Jeffrey S.W., Welschmeyer N.A. Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. In Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. – Paris: UNESCO, 1997. – 661 p.
- Kosakowska A., Lewandowska J., Stoń J., Burkiewicz K. Qualitative and quantitative composition of pigments in *Phaeodactylum tricorutum* (*Bacillariophyceae*) stressed by iron // Article, Res. Sup., Non-U.S Gov't Biomet. – 2004. – **17**, N 1. – P. 45–52.
- Maoka T., Akimoto N. Natural product chemistry in carotenoid some experimental techniques for structural elucidation and analysis of natural carotenoids: Mini-review // Caroten. Sci. – 2008. – N 13. – P. 10–17.
- Maoka T. Structural studies of natural carotenoids by our research group during the three decade // Caroten. Sci. – 2009. – N 14. – P. 26–36.
- Owens T.G., Wold E.R. Light – harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. I. Isolation and characterization of pigment-protein complex // Plant Physiol. – 1986. – **80**. – P. 732–738.
- Palermo J.A., Gros E.G., Seldes A.M. Carotinoids from three red algae of the *Corallinaceae* // Phytochemistry. – 1991. – **30**, N 9. – P. 2983–2986.
- Peng J., Yuan J., Wu C., Wang J. Fucoxanthin a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health // Mar. Drugs. – 2011. – **9**. – P. 1806–1828.
- Sachindra N.M., Sato E., Maeda H. et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites // Agric. Food Chem. – 2007. – N 55. – P. 8516–8522.
- Viso A.C., Marty J.C. Fatty acids from 28 marine microalgae // Phytochemistry. – 1993. – **34**, N 6. – P. 1521–1523.
- Walker T.L., Purton S., Becker K.D., Collet C. Microalgae as bioreactors // Plant. Cell. Rep. – 2005. – N 24. – P. 629–641.
- Zurdo J., Lozano R.M., Fernandez-Cabrera C., Ramirez J.M. Dimeric carotenoid interaction in the light-harvesting antenna of purple phototrophic bacteria // Biochem. – 1991. – **274**, N 3. – P. 881–884.

Поступила 15 июня 2012 г.

Подписала в печать Е.И. Шнюкова

A.V. Borodina, L.V. Ladigina

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, NAS of Ukraine,
2, Nakhimov Prosp., 99011 Sevastopol, Crimea, Ukraine
e-mail: lvladygina@yandex.ru

THE CULTIVATING CONDITIONS EFFECT ON ACCUMULATING THE
CAROTENOIDS IN *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* BOHL.

The qualitative and quantitative structure of the diatom microalgae *Phaeodactylum tricorutum* carotenoids, cultivated under the different temperature and illumination was investigated. It was stated, that carotenoid composition of the microalgae is represented by 5 fractions: β -carotene, fucoxanthine, diadinoxanthine diatoxanthine and diadinochrome. Fucoxanthine is located in two-isomeric forms: *trans*- and *cis*-. It was stated, that carotenoids accumulation depended on the cultivating conditions. The maximal fucoxanthene accumulation occurs under the temperature 30 °C and constant illumination 4.5 klx.

Key words: microalgae *Phaeodactylum tricorutum*, carotenoids, fucoxanthin, temperature, light.