



УДК 582.263:577.115

Э. С. Челебиева, асп., Г. С. Минюк, канд. биол. наук, с. н. с., И. В. Дробецкая, канд. биол. наук, н. с.,
И. Н. Чубчикова, м. н. с.

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

ДИНАМИКА ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА *ETTLIA CAROTINOSA* KOMÁREK 1989 (CHLOROPHYCEAE) ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА

Впервые представлены экспериментальные данные, характеризующие фракционный состав вторичных каротиноидов и содержание основных компонентов сухого вещества (белка, углеводов и липидов) в клетках зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) при её лабораторном выращивании методом двухстадийной накопительной культуры. Индукцию вторичного каротиногенеза в разных вариантах эксперимента осуществляли путём создания острого дефицита биогенных элементов в сочетании с 8-кратным увеличением освещённости и внесением в среду 4-х различных химических активаторов окислительного стресса (CH_3COONa , NaCl , FeSO_4 и H_2O_2). Как и у других зелёных микроводорослей, вторичный каротиногенез у данного вида сопряжён с переходом вегетативных клеток в стадию покоя и существенным изменением химического состава клеток – снижением содержания первичных каротиноидов (лютеина с 12 % от суммы каротиноидов до следовых количеств, β -каротина с 10 до 5 – 6 %) и белка (с 40 до 7 – 16 % СВ) и накоплением липидов и углеводов (липидов от 19 до 28 – 50 % СВ, углеводов от 23 до 37 – 47 % СВ, соответственно). В составе вторичных каротиноидов выявлено 11 фракций, однако динамика их общего содержания определялась главным образом моноэфирными астаксантинами (48 – 55 % от суммы). Характерной особенностью вида является наличие значительного количества адонирубина (10 – 12 % от суммы).

Ключевые слова: *Ettlia carotinos*, вторичный каротиногенез, астаксантин, адонирубин, липиды, углеводы, белки

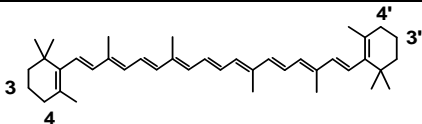
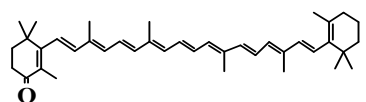
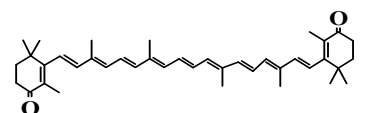
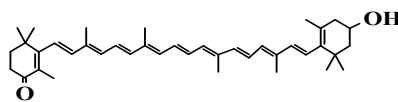
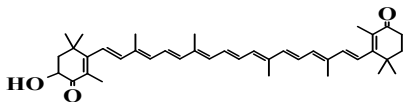
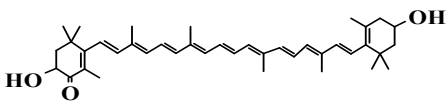
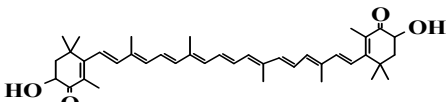
В первой части работы, посвящённой оценке влияния химических активаторов вторичного каротиногенеза (ВКРГ) на морфометрические характеристики и динамику накопления суммарных каротиноидов ($\Sigma\text{КР}$) в клетках зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (штамм SAG 213-4 = АСКУ 573-06), было показано, что специфику физиологического ответа водоросли на типовое стрессовое воздействие, используемое нами в скрининговых исследованиях Chlorophyceae [4], определяет наличие в периодических культурах этого вида на всех стадиях их развития значительного резерва вегетативных пальмеллоидных клеток, содержащих вторичные каротиноиды (ВКР) ($\approx 7 \cdot 10^{-2}$ пг·мкм³) [7]. Известно, что ВКР у пресноводных и наземных микроводорослей представлены C_{40} -кетокаротиноидами (ККР), которые синтезируются в цитоплазме из β -каротина путём последовательного ферментативного включения

кето- и гидроксогрупп в β -иононовые циклы (табл. 1). Конечным продуктом сложного, с множеством бифуркационных точек метаболического пути является астаксантин (АСТ). Введение кетогрупп в положение 4 и/или 4' приводит к удлинению исходной полиеновой цепи на одну или две двойные связи и усилению способности ККР инактивировать первичные радикалы и реактивные молекулы. Включение гидроксильных групп в положение 3, 3' существенно увеличивает полярность и амфифильность молекул ККР и определяет их поперечную ориентацию в липидном бислое мембран. Такая пространственная локализация обуславливает целый ряд специфических функций ККР в клеточных мембранах: участие в защите гидрофобных и гидрофильных участков молекул фосфолипидов от свободно-радикальной атаки; регуляция проницаемости и механической прочности мембран, транспорт алкоксильных ради-

калов вдоль полиеновой цепи к границе раздела фаз, где гидрофильные частицы инактивируются водорастворимыми антиоксидантами (АО) и др. Антиоксидантная активность (АОА) каротиноидов определяется их структурой. Одним из наиболее сильных АО является АСТ, молекула которого содержит две кето- и две гидроксигруппы [26]. Однако большинство ви-

дов микроводорослей, способных к ВКРГ, накапливают помимо АСТ смеси его предшественников (табл. 1) [4]. Причем до настоящего времени остается не до конца ясным, в какой мере фракционный состав ВКР зависит от условий внешней среды, и как эти различия влияют на общую АОА.

Табл. 1 Структурные формулы β -каротина и вторичных кетокаротиноидов у зелёных микроводорослей
Table 1 Structural formulas of β -carotene and secondary ketocarotenoides in green microalgae

Структурная формула	Название
	β -каротин (β,β -каротин)
	эхиненон (β,β -каротин-4-он)
	кантаксантин (β,β -каротин-4,4'-дион)
	3'-гидроксиэхиненон (3'-гидрокси- β,β -каротин-4-он)
	адонирубин (3-гидрокси- β,β -каротин-4,4'-дион)
	адониксантин (3,3'-дигидрокси- β,β -каротин-4-он)
	астаксантин (3,3'-дигидрокси- β,β -каротин-4,4'-дион)

Важной стороной ВКРГ у Chlorophyceae является сопряжение этого процесса с переходом клеток в стадию покоя и, как следствие, с активизацией биосинтеза и накопления липидов – энергетического резерва для поддержания жизнеспособности спор и их возврата в вегетативное состояние при улучшении условий среды. Направленности динамики содержания липидов и ВКР, как правило, совпадают, так как жирные кислоты необходимы для этерификации свободных –ОН-групп в молекулах гидроксильированных ККР, а нейтральные липиды служат для их растворения и длительного хранения в цитоплазме [18, 21]. Массовая доля липидов у эдафо- и аэрофитных продуцентов АСТ может составлять 15 – 60 % сухого

вещества (СВ), а содержание белка и углеводов варьирует в пределах 20 – 60 и 10 – 50 % СВ, соответственно. С одной стороны, такой широкий диапазон варьирования состава СВ предполагает определённую специализацию продуцентов ККР как сырья для различных отраслей биотехнологии (производства растительных масел пищевого и медицинского назначения, биотоплива, кормовых добавок и др. [14]), а с другой стороны, требует, наряду с анализом состава ККР, детального исследования динамики содержания ключевых компонентов СВ у каждого потенциального объекта массового культивирования в связи с особенностями методов его выращивания.

Всё сказанное имеет прямое отношение к обоснованию актуальности исследований особенностей ВКРГ у практически не изученного и крайне интересного в научном и прикладном плане объекта *E. carotinos*. [7, 8]. Основные задачи второй части исследований заключались в определении влияния химических стрессоров (ацетата натрия, хлорида натрия и смеси сульфата железа (II) и гидропероксида водорода) на фракционный состав каротиноидов, содержание сухого вещества и его основных составляющих (белка, липидов и углеводов) в культурах, клетках и сухой биомассе водоросли при её выращивании методом двухстадийной накопительной культуры.

Материал и методы. Объектом исследования служил штамм Mainx (SAG 213-4 = АСКУ 573-06), переданный в ИнБЮМ НАНУ из коллекции кафедры ботаники Киевского национального университета им. Т. Шевченко. Условия культивирования водоросли на I («зелёной») и II («красной») стадиях, а также способ индукции ВКРГ детально описаны в I части исследования [8]. Поэтому здесь мы в сокращённом варианте повторно приводим лишь некоторые сведения, необходимые для обсуждения полученных результатов.

Для оценки влияния химических активаторов ВКРГ на физиолого-биохимические характеристики *E. carotinos* использовали накопительную культуру *E. carotinos* на стадии замедления роста с численностью клеток $6 \cdot 10^5$ кл·мл⁻¹ и остаточной концентрацией азота (N) и фосфора (P) 15.34 мг·л⁻¹ и 1.09 мг·л⁻¹, соответственно. Эта культура в дальнейшем будет именоваться как «исходная». Индукцию ВКРГ в клетках (= перевод культуры на «красную» стадию) осуществляли путём одновременного резкого изменения нескольких ключевых параметров культивирования: а) изменения режима освещения с циклического одностороннего на непрерывное двухстороннее с $E = 136$ мкЕ·м⁻²·с⁻¹ с каждой стороны); б) увеличения скорости продувки культур воздушно-углекислотной смесью с 0.3 до 1.8 л·мин⁻¹·л⁻¹ (0.1% CO₂ v/v); в) снижения концентрации биогенных элементов, общей осмолярности и pH среды путём разведения культуры дистиллированной водой в 3 раза. Активаторы ВКРГ вносили следующим образом: вариант (вар.) № 1 – контроль (без добавок); № 2 – ацетат натрия (CH₃COONa) до 50 мМ; № 3 – хлорид натрия (NaCl) до 200 мМ; в) № 4 – смесь сульфата железа II и пероксида водорода (Fe²⁺ + H₂O₂) до 0.45 мМ и 10⁻⁴ мМ, соответственно. Концентрация азота во всех культурах составляла 4.95 мг·л⁻¹, фосфо-

ра – 0.75 мг·л⁻¹, численность клеток – $1.90 \cdot 10^5$ кл·мл⁻¹, объём культур – 400 мл, температура среды – 20 – 21 °С. Каждый вариант эксперимента выполняли в 2-х повторностях.

Численность (n) и размеры клеток, содержание СВ и Σ КР в культурах анализировали, как в [7]. Фракционный состав Σ КР исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А в двух системах растворителей. I – гексан-ацетон 9 : 1; II – гексан-бензол-ацетон 5 : 3.75 : 0.8 [2]. Идентификацию КР проводили по следующим химическим, спектральным и хроматографическим тестам:

а) наличие и количество кето-групп, конъюгированных с основной полиеновой цепью (по величине гипсохромного сдвига $\lambda_{\text{макс}}$ в абсорбционном спектре после реакции с борогидридом натрия) [24];

б) наличие и количество гидроксигрупп (по изменению коэффициента хроматографической подвижности фракций (Rf) после реакции ацетилирования [24];

в) идентичность абсорбционных спектров поглощения в диапазоне 400 – 750 нм в трёх растворителях (гексане, бензоле и ацетоне) спектрам КР, приведённым в международной базе данных «Lipid bank» [20] и справочных руководствах по химии КР [15, 23, 24];

г) совпадение Rf при совместной ТСХ анализируемых фракций со стандартами.

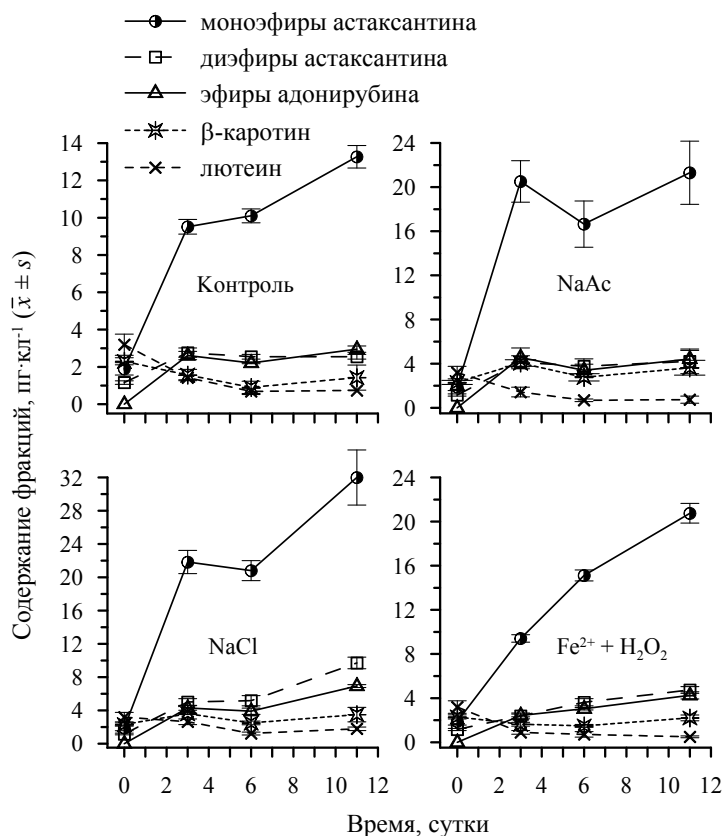
Стандарты кетокаротиноидов получали путём экстракции пигментов из свежего материала и выделения отдельных компонентов методом адсорбционной ТСХ с соблюдением всех необходимых при работе с пигментами предосторожностей [15, 23, 24]. Моно- и диэфиры АСТ получали из апланоспор *Haematococcus pluvialis*, свободный АСТ – из мышц *Salmon salar* [13], кантаксантин (КАН) – из цист *Artemia salina* [16]. Для расчёта концентрации отдельных КР использовали следующие коэффициенты удельного поглощения в ацетоне: для АСТ = 2177.4 [12], β -каротин – 2500, лютеин – 2550, КАН – 2200, неидентифицированных ККР (ККР н/ид.) – 2200 [23].

Массовую долю общих липидов в СВ анализировали по [11], белка – по [20], углеводов – по [25].

Аналитические измерения для каждой биологической повторности проводили трижды. Данные на рисунках и в тексте являются средними из значений, полученных для всех биологических и аналитических повторностей (\bar{x}). Рассеяние результатов относительно \bar{x} характеризуется выборочным стандартным отклонением (s) или ошибкой средней арифметической (m).

Результаты и обсуждение. В первой части данной работы было показано, что при выращивании *E. carotinos* по схеме скрининга продуцентов АСТ методом двухстадийной накопительной культуры [4] резкое изменение условий среды при переводе культур на «красную» стадию вызывает у вида более быструю ответную реакцию, по сравнению с другими продуцентами АСТ, выражающуюся в покраснении культур уже на 3-и сутки [7]. Используемые в работе химические активаторы ВКРГ по-разному влияли на скорость накопления пигментов: при действии промоторов свободнорадикального окисления ($Fe^{2+} + H_2O_2$) она была в 2.5 раза выше, а в условиях повышенной солёности (200 мМ NaCl) – в 1.3 раза ниже, чем в контроле (в расчёте на $мкм^3$ объёма клетки). Ранее при исследовании ВКРГ у Chlorophyceae на примере различных видов микроводорослей было установлено, что состав Σ КР по мере формирования покоящихся стадий клеточного цикла меняется – относительное содержание первичных каротиноидов

(ПКР) неуклонно снижается (иногда до следовых концентраций), а доля ККР повышается до 85 – 95% от Σ КР. Ключевой составляющей этого процесса, является увеличение относительного содержания эфиров АСТ в Σ КР [1, 5 – 9]. От каких внешних и внутренних факторов зависят динамика соотношения разных форм АСТ (свободного, моно- и диацильных эфиров), скорость их накопления, качественный и количественный состав метаболитических предшественников АСТ, а также их функциональная роль в клетках у видов разной систематической принадлежности и экологии пока остаётся неясным прежде всего в силу фрагментарности сведений по данному вопросу, имеющих лишь для немногих видов микроводорослей [17, 18, 21]. На рис. 1 – 3 впервые для *E. carotinos* приведены сведения, характеризующие динамику содержания ПКР и ВКР в клетках в условиях экспериментального стресса в зависимости от природы химических активаторов ВКРГ.



Анализ содержания пигментов в расчёте на клетку показывает, что в каждом из вариантов эксперимента, независимо от природы химических стресс-агентов, формирование цитоплазматического пула КР в созревающих апланоспорах этлии определяла одна фракция – моноацильные эфиры АСТ (МЭАСТ). Уже за первые трое суток её относительное содержание в Σ КР во всех вариантах выросло в 4.5 – 5.4 раза, а к окончанию эксперимента – в 5.7 – 6.6 раза (рис. 2 А).

Рис. 1 Динамика содержания ключевых фракций каротиноидов в клетках *E. carotinos* при действии различных химических стресс-агентов
Fig.1 The dynamics of key carotenoid fractions in *E. carotinos* cells under the influence of different chemical stress agents

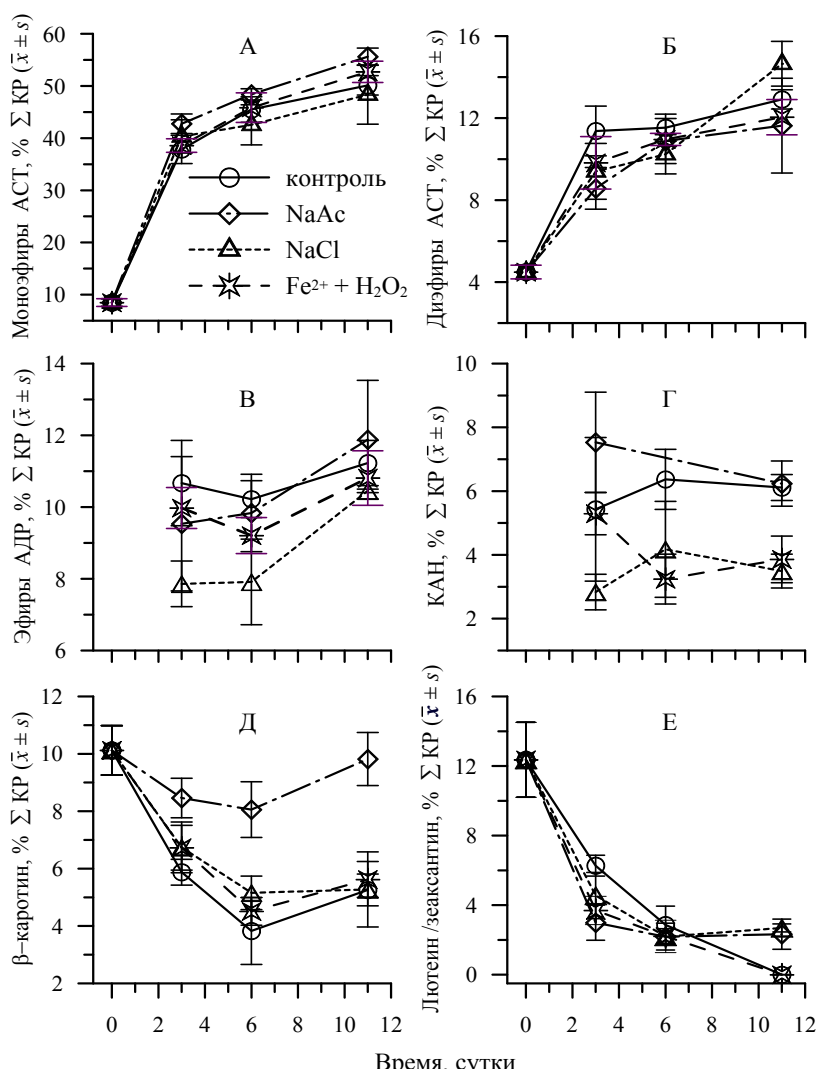


Рис. 2 Динамика относительного содержания вторичных (А – Г) и первичных каротиноидов (Д, Е) в клетках *E. carotinos* в зависимости от природы химических стресс-агентов

Fig. 2 The dynamics of secondary (A – Г) and primary carotenoid (Д, Е) relative content in *E. carotinos* cells depending on the nature of chemical stress agents

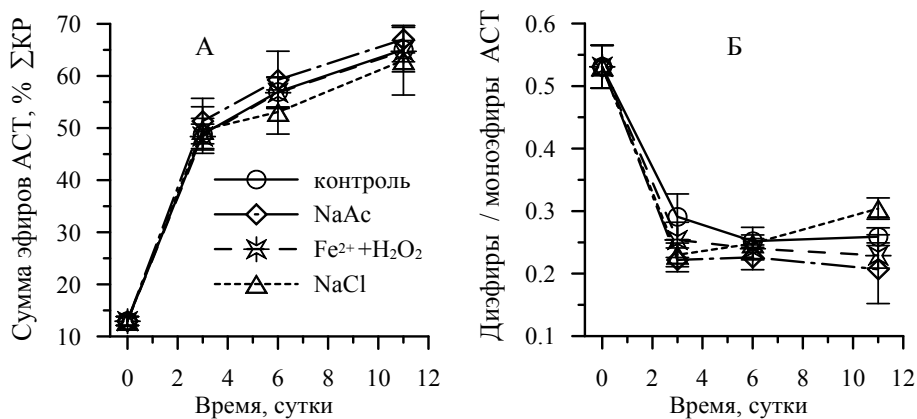


Рис. 3 Динамика суммарного содержания моно- и диэфиров астаксантина (А) и их отношения (Б) в клетках *E. carotinos* при действии различных химических стресс-агентов

Fig. 3 The dynamics of the total content of mono- and diesters of astaxanthin (A) and their ratio (B) in the cells of *E. carotinos* under the influence of various chemical stress agents

На данном этапе исследований определён можно утверждать лишь следующее: а) не у всех видов зелёных микроводорослей моноацильные эфиры являются главной формой запасания АСТ; б) соотношение ДЭАСТ / МЭАСТ может меняться в зависимости от физико-химических параметров среды. Так, например, у *Bracteacoccus minor* доминирующей фракцией ВКР в красных апланоспорах являются ДЭАСТ (42.3 % от Σ КР), а у *B.giganteus* при тех же условиях культивирования – МЭАСТ (34.2 % от Σ КР). Отношение ДЭАСТ/МЭАСТ у этих близкородственных и сходных по экологии видов может различаться на порядок (4.6 и 0.4, соответственно) [9]. В то же время у *Scotiellopsis rubescens* оно варьирует в зависимости от условий выращивания в диапазоне 0.4 – 0.8 [10]. Подобные сопоставления, хотя и не проясняют функциональной роли преобладания той или иной эфирной формы АСТ, всё же имеют определённый смысл, так как дают дополнительную информацию о технико-химических характеристиках получаемой биомассы. Дело в том, что увеличение относительного содержания ДЭАСТ, как правило, сопровождается возрастанием доли насыщенных кислот в жирнокислотном составе липидов и снижением их полярности, что, в свою очередь, влияет на биологическую ценность биомассы и выбор способа экстракции липидов и КР [14, 17, 22].

Внесение в питательную среду химических активаторов ВКРГ оказывало существенное влияние на скорость накопления Σ КР [7], однако практически не влияло на относительное содержание в них эфиров АСТ (рис. 2 А, Б, рис. 3 А). Можно лишь отметить слабо выраженную тенденцию увеличения концентрации МЭАСТ в присутствии ацетата по сравнению с контролем (рис. 2А). Эта особенность отличает эттлию как от близкородственного планктонного вида *H. pluvialis*, так и от типичного эдафобита *S. rubescens*, у которых CH_3COONa в концентрации 50 мМ вызывал ощутимый прирост доли эфиров АСТ в общем пуле КР. По суммарному содержанию МЭАСТ и ДЭАСТ в 80

зрелых апланоспорах (63 – 67 %) (рис. 3а) *E. carotinos* существенно превосходит такие почвенные виды как *Bracteacoccus* spp. [9] и *S. rubescens* (30 – 50 % от Σ КР) [10], но уступает *H. pluvialis* (до 90 % от Σ КР) [1, 5].

Характерной особенностью фракционного состава ВКР *E. carotinos*, отличающей этот вид от исследованных нами ранее продуцентов АСТ, является наличие заметного количества адонирубина (АДР) в форме ацильных эфиров (ЭАДР) (10 – 12 % Σ КР) (рис. 2 В).

Этот факт в сочетании с постоянным присутствием в формирующихся спорах небольших количеств кантаксантина (КАН) (рис. 2 Г) позволяет предположить что из 8-ми постулируемых для микроводорослей метаболических путей биосинтеза АСТ у эттлии, как и у *H. pluvialis*, доминирует один главный путь, в ходе реализации которого в иононовые циклы β -каротина сначала вводятся кето-группы, и только затем – гидроксигруппы: β -каротин \rightarrow эхиненон \rightarrow кантаксантин \rightarrow адонирубин \rightarrow атаксантин [18]. Однако, если у *H. pluvialis* при сходных условиях культивирования каждый из интермедиатов синтеза АСТ полностью трансформируется в КР следующего звена, то у эттлии, по неясным пока причинам, часть АДР эстерифицируется и накапливается в липидных глобулах цитоплазмы вместе с эфирами АСТ. Уже на 3-и сут после стресс-воздействия доля ЭАДР, не определявшихся ранее в исходной культуре, возросла до 8 – 10.5 % Σ КР и продолжала нарастать во всех случаях до конца периода наблюдений (до 10 – 12 % Σ КР) (рис. 2 В).

Относительное содержание КАН в каждом из вариантов эксперимента варьировало по отношению к уровню 3-их сут незначительно (в пределах 1.5 – 2.5 %) (рис. 2 Г). Поэтому частичное ингибирование синтеза АСТ, скорее всего, происходило на стадии гидроксирования β' -иононового цикла АДР. Негативное влияние на относительное содержание обоих предшественников АСТ оказывали хлорид натрия и промоторы ПОЛ ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$).

Аналогичная картина накопления гидроксильированных интермедиатов АСТ в форме эфи-

ров отмечена нами и у *S. rubescens* (Scenedesmales по [3]). У этого эдафобитного вида АСТ, по всей вероятности, синтезируется главным образом через 3'-гидроксиэхиненон по схеме: β -каротин \rightarrow эхиненон \rightarrow 3'-гидроксиэхиненон \rightarrow адониксантин \rightarrow астаксантин [18], так как в автоспорах водоросли в заметном количестве (до 15% от Σ КР) накапливаются моноэфиры адониксантина (АКС) [10]. У отдельных микроводорослей, например, у *Chlorococcum* sp., оба прямых предшественника АСТ (АДР и АКС) входят в состав ВКР в равном соотношении (10 – 12 % Σ КР). Такой состав может формироваться при равноценном функционировании двух главных путей биосинтеза АСТ, или при их разветвлении в ключевых точках бифуркации (эхиненон и 3'-гидроксиэхиненон) [18].

Направленность динамики относительно содержания β -каротина и фракции лютеин/зеаксантин (в использованном варианте метода ТСХ эти КР не разделяются) во всех случаях была типичной для фотосинтетических пигментов в условиях экспериментально индуцированного ВКРГ [6, 10]. Их доля в Σ КР неуклонно снижалась, причём деградация фракции лютеин/зеаксантин была выражена более сильно, чем β -каротина (рис. 2 Д, Е). Химические активаторы ВКРГ в большинстве случаев не влияли на динамику относительного содержания ПКР (рис. 2 Д, Е). Можно лишь указать на более высокую долю

β -каротина в Σ КР в присутствии ацетата (50 мМ CH_3COONa) (рис. 2 Д).

Разумеется, представленных в данной работе сведений по динамике содержания ПКР и ВКР недостаточно для понимания особенностей биосинтеза АСТ у *E. carotinos*, так как решение подобного рода задач предполагает применение комплекса физиолого-биохимических и молекулярно-генетических подходов. Тем не менее, получение данных по фракционному составу ВКР в условиях экспериментального абиотического стресса является не только необходимым начальным шагом в исследованиях ВКРГ, но и позволяет выявить наиболее чувствительные и удобные в лабораторной практике модельные объекты, адекватно характеризующие отдельные таксономические и экологические группы микроводорослей.

Как и у всех исследованных нами ранее продуцентов ККР из класса Chlorophyceae [5, 6, 10], накопление ВКР в стрессированных культурах *E. carotinos* сопровождалось накоплением сухого вещества. Максимум сухой биомассы в литре культуры ($2.21 \pm 0.06 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) отмечен в варианте с добавлением CH_3COONa , минимум – при повышенной солёности. В последнем случае содержание СВ за 11 сут увеличилось лишь в 2 раза, тогда как в остальных культурах – в 4 – 5 раз (рис. 4 А).

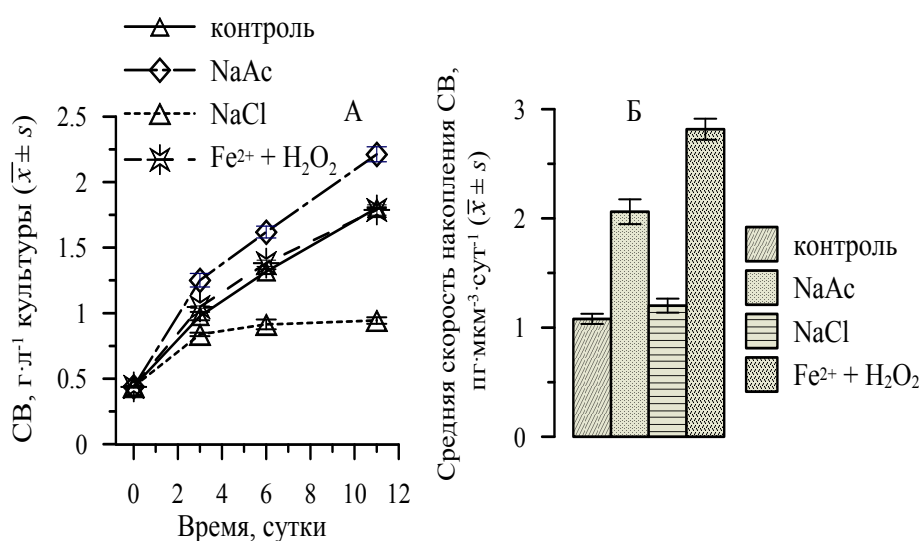
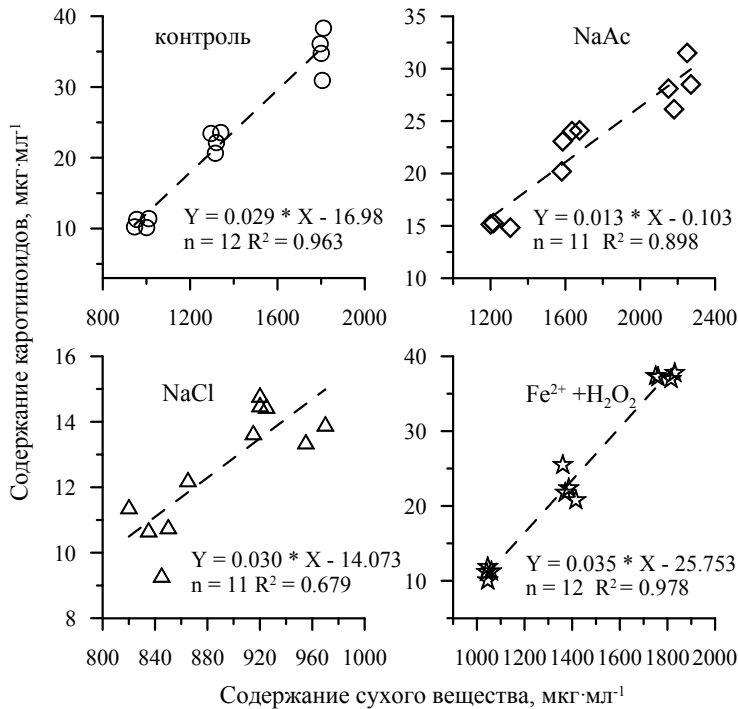


Рис. 4 Динамика содержания сухого вещества в культурах (А) и средняя скорость его накопления в единице объема клетки *Ettlia carotinos* (Б) при действии различных химических стресс-агентов
Fig. 4 Dynamics of the dry matter content in the cultures (А) and average rate of dry matter accumulation per unit of cell volume of *E. carotinos* (Б) under the influence of different chemical stress agents

Наличие тесной линейной связи между содержанием СВ и Σ КР в культурах всех 4-х вариантов эксперимента указывает на возможность применения расчётного метода для контроля за накоплением КР в культурах *E.*

carotinos при её массовом выращивании (рис. 5). При этом следует иметь в виду, что параметры уравнения линейной регрессии могут варьировать в зависимости от особенностей режима культивирования.



В связи с тем, что зрелые апланоспоры в разных вариантах эксперимента существенно различались по размерам, среднюю скорость накопления СВ (рис. 4 Б) и содержание его основных компонентов в клетках (рис. 6) в зависимости от характера стресс-воздействия рассчитывали на единицу клеточного объёма (мкм³).

Рис. 5 Зависимость между содержанием сухого вещества и суммарных каротиноидов в культурах *E. carotinos* при различных способах индукции вторичного каротиногенеза
Fig. 5 The relationship between dry matter and total carotenoid content in *E. carotinos* cultures under different modes of secondary carotenogenesis induction

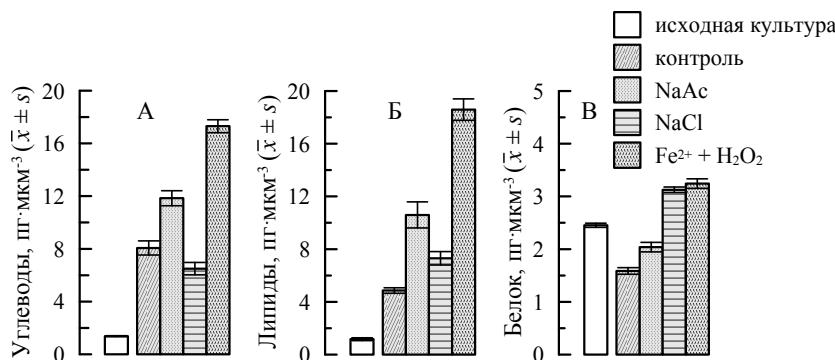


Рис. 6 Содержание основных компонентов сухого вещества в клетках *E. carotinos* при действии различных химических стресс-агентов
Fig. 6 The content of the main components of dry matter in the cells of *E. carotinos* under the influence of different chemical stress agents

Наиболее быстро СВ накапливали клетки, стрессированные при помощи промоторов ПОЛ ($Fe^{2+} + H_2O_2$) (2.82 ± 0.10 пг·мкм⁻³·сут⁻¹), а также апланоспоры, формирующиеся при внесении в среду органического углерода (50 мМ CH_3COONa) (2.06 ± 0.11 пг·мкм⁻³·сут⁻¹). Контроль и вар. № 3 (200 мМ NaCl) по данному признаку были сходны (рис. 4 Б), а существенные различия по содержанию СВ в литре культуры между этими вариантами (рис. 4 А)

были обусловлены ингибированием деления клеток в условиях повышенной солёности [7].

В условиях острого дефицита азота накопление СВ апланоспорах *E. carotinos*, как и у *H. pluvialis* [5], происходило главным образом за счёт увеличения содержания углеводов и липидов (рис. 6 А, Б). За 11 сут запасы углеводов в единице клеточного объёма во всех вариантах выросли по отношению к уровню исходной культуры в 4.7 – 12.6, а липидов – в

6.3 – 15.9 раза. Максимальное увеличение обоих показателей отмечено при действии смеси $Fe^{2+} + H_2O_2$.

Размах изменений в содержании белка был существенно ниже, причём в контроле и в присутствии ацетата его уровень незначительно снизился (в 1.5 – 1.2 раза, соответственно), а в вар. № 3 и 4 – увеличился в 1.3 раза (рис. 6 В).

Характер метаболических перестроек в стрессированных клетках при их переходе из вегетативного состояния в фазу покоя и, в частности, разнонаправленность изменений мас-

совой доли отдельных компонентов сухого вещества, наглядно отражает рис. 7. По мере созревания апланоспор относительное содержание углеводов в сухом веществе увеличилось от 23 до 37 – 47 % (рис. 7 А), липидов – от 18 до 28 – 50 % (рис. 7 Б), а массовая доля белка снизилась от 40 до 7 – 16 % (рис. 7 В).

Аналогичную динамику состава СВ мы наблюдали и ранее у *H. pluvialis* при совместном использовании в качестве химических стресс-агентов CH_3COONa (15 – 45 мМ) и $NaCl$ (0.17 мМ) [5].

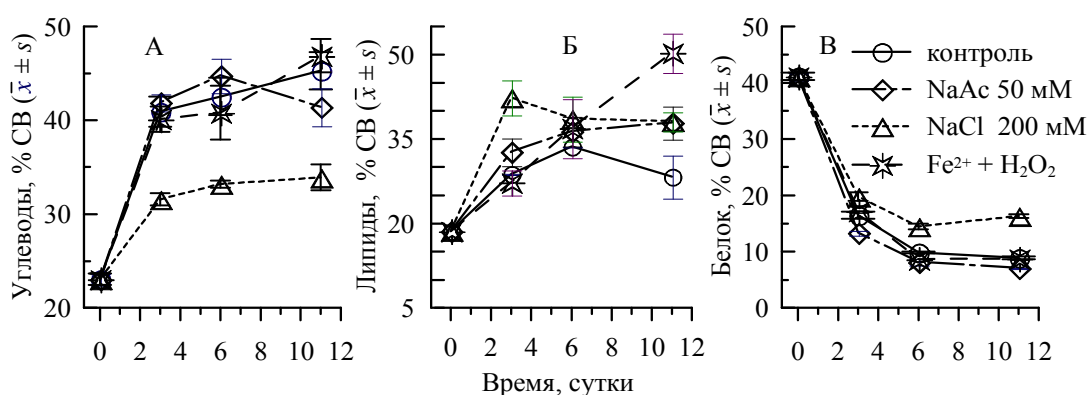


Рис. 7 Динамика массовой доли углеводов (А), липидов (Б) и белка (В) в биомассе *E. carotinos* при действии различных химических стресс-агентов

Fig. 7 The dynamics of carbohydrates (А), lipids (Б) and protein (В) abundance in the biomass of *E. carotinos* under the influence of different chemical stress agents

На фоне совпадения во всех случаях общей направленности указанных процессов обращает на себя внимание несколько отличное действие хлорида натрия (200 мМ). Скорость накопления СВ в единице клеточного объёма в этом варианте была почти такой же, как и в контроле (рис. 4 Б). Однако количественный состав СВ в конечной биомассе существенно отличался от контрольного: массовая доля углеводов здесь была почти в полтора раза ниже, а относительное содержание белка и липидов заметно выше.

Анализируя полученные результаты, следует особо остановиться на факте интенсификации биосинтеза липидов у *E. carotinos* при действии химических активаторов ВКРГ. В присутствии ацетата и генераторов свободных радикалов (ионов Fe^{2+} и H_2O_2) их конечная

концентрация ($800 - 900 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) (рис. 8 А) и среднесуточный выход из литра исходной культуры ($\approx 200 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ с учётом её разведения при переходе на «красную» стадию) (рис. 8 Б) превысили уровень контроля как минимум вдвое. Содержание липидов в «красной» биомассе, собранной по окончании эксперимента в этих вариантах, составило 37.9 ± 2.9 и 50.4 ± 3.5 % СВ, что в 2 – 2.5 раза выше начального уровня в «зелёной» биомассе (18.7 % СВ) и в 1.4 – 1.8 раза выше, чем в «красной» биомассе, полученной из контроля (рис. 7 Б).

Примечательно, что по липидным характеристикам *E. carotinos* не уступает зелёным и диатомовым микроводорослям, используемым в настоящее время для получения биотоплива [14, 22].

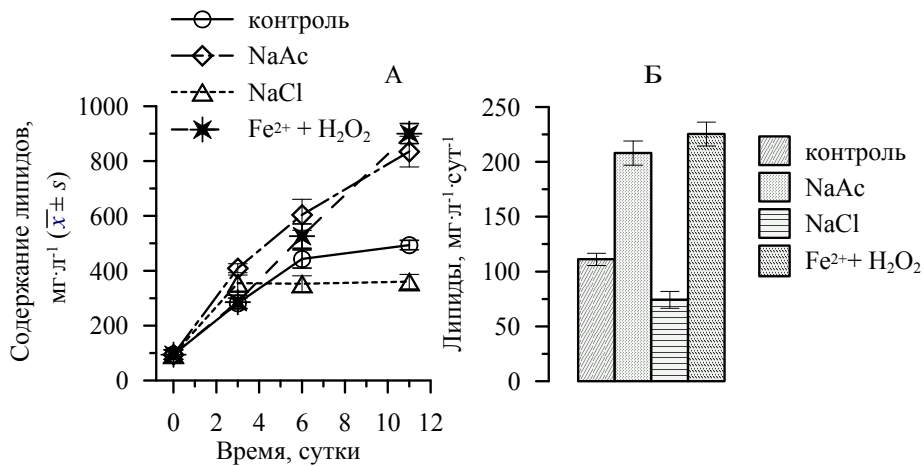


Рис. 8 Динамика содержания суммарных липидов (А) и выход липидов из литры исходной культуры (Б) *E. carotinosa* в зависимости от природы химических стресс-агентов
Fig 8 The dynamics of total lipids content in the cultures (A) and lipid yield from the liter of *E. carotinosa* original culture (B) depending on the nature of chemical stress-agents

Известно, что многие представители Chlorophyceae и Bacillariophyceae, имеющие в жизненном цикле стадию покоя, способны при неблагоприятных условиях удваивать содержание запасных липидов в клетках. Однако лишь некоторые из них (2 – 3 десятка из нескольких сотен видов, протестированных за последние 15 – 20 лет) могут рассматриваться как потенциальные объекты массового культивирования [14, 22].

Коммерческая привлекательность микроводорослей для получения липидов различного назначения (технического, пищевого, медицинского) существенно увеличивается при получении дополнительных, востребованных рынком технически или биологически ценных продуктов. В качестве таких продуктов несомненный интерес представляют кетокаротиноиды (и, прежде всего, АСТ), как по своим высоким потребительским свойствам и растущему рынку сбыта, так и по сопряженности биосинтеза этих пигментов с биосинтезом липидов.

Содержание ВКР в культурах продуцентов АСТ, как правило, положительно коррелирует с содержанием липидов (рис. 9), поэтому оптимизация условий культивирования водорослей для увеличения выхода одного целевого продукта всегда будет приводить к увеличению выхода другого.

$$Y(\text{контроль}) = 8.51 * X + 209.42 \quad R^2 = 0.859$$

$$Y(\text{NaAc}) = 28.04 * X - 18.58 \quad R^2 = 0.815$$

$$Y(\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2) = 23.44 * X + 10.88 \quad R^2 = 0.973$$

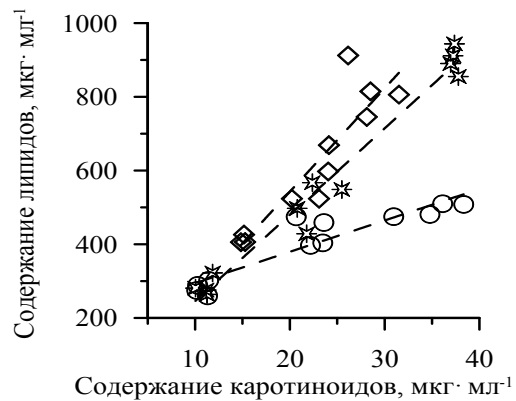


Рис. 9 Зависимость между содержанием суммарных каротиноидов и общих липидов в культурах *E. carotinosa* при различных способах индукции вторичного каротиногенеза
Fig. 9 The relationship between total carotenoid and total lipid content in the cultures of *E. carotinosa* under different modes of secondary carotenogenesis induction

Выводы. 1. Вторичный каротиногенез (ВКРГ) у эдафотитной зелёной микроводоросли *E. carotinosa* характеризуется рядом типичных черт, присущих большинству продуцентов ККР из класса Chlorophyceae в условиях абиотического стресса, а также некоторыми специфическими особенностями, отличающими её от близкородственных планктонных видов Volvocales (линия *Chlamydomonas applanata*) и других почвенных водорослей, сходных по экологии, но принадлежащих к филогенетически удаленной линии *Ch. lobulata*. **2.** Химические активаторы ВКРГ (CH₃COONa, NaCl и

FeSO₄ + H₂O₂), по-разному влиявшие на скорость накопления суммарных каротиноидов (ΣКР), не оказывали существенного воздействия на их фракционный состав. Формирование цитоплазматического пула КР в созревающих апланоспорах этлии во всех случаях определяла одна и та же фракция – моноацильные эфиры АСТ (МЭАСТ). **3.** Характерной особенностью *E. carotinos* является наличие во фракционном составе вторичных КР эфиров адонирубина (10 – 12 % Σ КР). **4.** Направленность динамики относительного содержания ключевых фракций первичных каротиноидов во всех вариантах была типичной для фотосинтетических пигментов в условиях индуцированного ВКРГ. Их доля в ΣКР неуклонно снижалась, причём химические активаторы ВКРГ (за исключением ацетата) слабо влияли на количественные показатели этого процесса. **5.** К типичным характеристикам ВКРГ у *E. carotinos* относятся тесное сопряжение накопления ΣКР и сухого вещества (СВ) при переходе клеток из вегетативного состояния в фазу покоя, а также разнонаправленность изменений содержания углеводов и липидов, с одной стороны, и белка, с другой. За время формирова-

ния апланоспор массовая доля углеводов в разных вариантах выросла от 23 до 37 – 47 % СВ, а липидов – от 19 до 28 – 50 % СВ, причём максимальное увеличение обоих показателей, а также скорости накопления СВ в расчёте на единицу клеточного объёма отмечено при действии смеси промоторов свободнорадикального окисления (FeSO₄ + H₂O₂). Относительное содержание белка за это время снизилось от 40 до 7 – 16 % при наименьших потерях в условиях солевого стресса. **6.** Особого внимания заслуживает факт высокого выхода липидов из литра исходной культуры (208 – 225 мг·л⁻¹·сут⁻¹) и их содержания в конечной биомассе этлии (38 и 50 % СВ) при использовании в качестве активаторов ВКРГ CH₃COONa и смеси FeSO₄ + H₂O₂, указывающий на целесообразность исследования наземных видов зелёных микроводорослей как потенциальных источников растительных масел, обогащённых высокоценными природными КР.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность зав. кафедрой ботаники Киевского национального университета д.б.н., проф. И. Ю. Костикову за предоставление штамма *Ettlia carotinos* из коллекции АСКУ.

1. Данцюк Н. В. Влияние ацетата натрия на интенсивность вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. **80**: Биотехнология водорослей. – С. 44 – 50.
2. Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Боровков А. Б., Минюк Г. С. Определение содержания астаксантина и кантаксантина у зелёных микроводорослей методом тонкослойной хроматографии // Экология моря. – 2009. – Вып. **79**. – С. 50 – 56.
3. Костіков І. Ю., Романенко П. О., Демченко Е. М., Дарієнко Т. М., Михайлюк Т. І., Рибчинський О. В., Солоненко А. М. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.
4. 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. – Спец. вып. – **80**: Биотехнология водорослей. – С. 67 – 78.
5. Минюк Г. С., Терентьева Н. В., Дробецкая И. В. Сравнительная характеристика морфологических и физиолого-биохимических признаков трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyta, Chlamydomonadales) // Альгология. – 2007. – **17**, No 2. – С. 148 – 159.
6. Терентьева Н. В., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. Особенности вторичного каротиногенеза в вегетативных клетках *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) при различных условиях минерального обеспечения // Морск. экол. журн. – 2008 (6). – Т. VII, № 4. – С. 66 – 74.
7. Челебиева Э. С. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 3. Введение в лабораторную культуру и первичная оценка биотехнологического потенциала *Ettlia carotinos* // Морск. экол. журн. – 2011. – Отд. вып., № 2. – С. 96 – 112.
8. Челебиева Э. С., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. Физиолого-биохимические характеристики *Ettlia carotinos* Komárek 1989

- (Chlorophyceae) в условиях экспериментального стресса – // Морск. экол. журн. – 2013. – **12**, № 2. – С. 78 – 87.
9. Чубчикова И. Н., Дробецкая И. В., Минюк Г. С., Данцюк Н.В., Челебиева Э. С. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) // Морск. экол. журн. – 2011. – **10**, № 1. – С. 91 – 97.
 10. Чубчикова И. Н., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Данцюк Н.В. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов // Экология моря. – 2009. – Вып. 77. – С. 77 – 83.
 11. Ahlgren G., Merino L. Lipid analysis of freshwater microalgae: A method study // Arch. Hydrobiol. – 1991. – **121**, No 3. – P. 295 – 306.
 12. *Aquasearch Technical report 1002.001*. Analysis of total astaxanthin in algae meal prepared from *Haematococcus pluvialis* // Aquasearch. Inc. – <http://www.fda.gov>.
 13. Birkeland S., Bjerkeng B. Extractabilities of astaxanthin and protein from muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by brine concentration and pH // Food Chem. – 2004. – **85**, 4. – P. 559 – 568.
 14. Carlsson A. S., van Beilen J. B., Moller R., Clayton D. Micro- and macro-algae: Utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project. – Chippenham: CPL Press, 2007. – 86 p.
 15. Carotenoids Handbook. – Basel: Birkhäuser, 2004. – 562 p.
 16. Davies B. H., Hsu W. J., Chichester C. O. The mechanism of the conversion of beta-carotene into canthaxanthin by the brine shrimp *Artemia salina* L. (Crustacea: Branchiopoda) // Comp. Biochem. Physiol. – 1970. – **33**. – P. 601 – 615.
 17. Eonseon J., Polle J.E.W., Lee H.K., Hyun S.M., Chang M. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application // J. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – **13**, No 2. – P. 165 – 174.
 18. Lemoine Y., Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress // Photosynth. Res. – 2010. – **106**. – P. 155 – 177.
 19. *Lipid bank*. The official database of Japanese Conference on the Biochemistry of Lipids (JCBL). – <http://www.lipidbank.jp>.
 20. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Faar A. L., Randall R. J. Protein measurement with folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265 – 275.
 21. Margalith P. Z. Production of ketocarotenoids by microalgae // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **51**. – P. 431 – 438.
 22. Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. // Renewable and Sustainable Energy Rev. – **14**. – 2010. – P. 217 – 232.
 23. *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. – Cambridge Univ. Press. – 2011. – 874 p.
 24. Rodriguez-Amaya D. B. A guide to carotenoid analysis in foods / Washington: ILSI Press, 2001. – 71 p.
 25. Strickland J. D. H., Parsons T. R. Determination of carbohydrate // A practical handbook of seawater analysis. – Ottawa: Fish. Res. Board Can., 1968. – P. 173 – 174.
 26. Yeum K.-J., Aldini G., R. M., Russel R. M., Krinsky N. I. Antioxidant/pro-oxidant functions of carotenoids. – Carotenoids. – Volume 5: Nutrition and Health. – Basel: Birkhäuser Verlag, 2009. – Chapter 12. – P. 235 – 268.

Поступила 06 июня 2012 г.

После доработки 15 мая 2013 г.

Динаміка хімічного складу *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) при експериментальній індукції вторинного каротиногенезу. Е. С. Челебієва, Г. С. Мінюк, І. В. Дробецька, І. М. Чубчикова. Вперше представлені експериментальні дані, що характеризують фракційний склад вторинних каротиноїдів і вміст основних компонентів сухої речовини (білка, вуглеводів і ліпідів) в клітинах зеленої микроводорості *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) при її лабораторному культивуванні методом двохстадійної накопичувальної культури. Індукцію вторинного каротиногенезу в різних варіантах експерименту здійснювали шляхом створення гострого дефіциту біогенних елементів у поєднанні з 8-кратним збільшенням освітленості і внесенням в середовище 4-х різних хімічних активаторів окисного стресу (CH₃COONa, NaCl, FeSO₄ та H₂O₂). Показано, що у даного виду, як і у інших зелених микроводоростей, вторинний каротиногенез пов'язаний з переходом вегетативних клітин в стадію спокою і значною зміною хімічного складу клітин – зниженням вмісту первинних каротиноїдів (лютеїна з 12% від суми каротиноїдів до слідових кількостей, β-каротина з 10 до 5 – 6 %) і білка (з 40 до 7 – 16 % СВ) і накопиченням ліпідів і вуглеводів (ліпідів від 19 до 28 – 50 % СВ, вуглеводів від 23 до 37 – 47% СВ, відповідно). У складі вторинних каротиноїдів виявлено 11 фракцій,

проте динаміка їх загального вмісту визначалася переважно моноєфірами астаксантину (48 – 55 % від суми). Характерною особливістю виду є наявність значної кількості адонірубіна (10 – 12 % від суми).

Ключові слова: *Ettlia carotinos*, вториний каротиногенез, астаксантин, ліпіди, вуглеводи, білки

Dynamics of chemical composition of *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) under experimental induction of secondary carotenogenesis. E. S. Chelebieva, G. S. Minyuk, I. V. Drobetskaya, I. N. Chubchikova.

For the first time, experimental data, characterizing the fractional composition of secondary carotenoids and content of the main components of dry matter (protein, carbohydrates and lipids) were shown in the cells of green microalgae *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae), which was grown in laboratory by the method of two-stage batch culture. The induction of secondary carotenogenesis in different versions of the experiment was carried out by creating an acute shortage of nutrients in combination with an 8-fold increase in light and induction of 4 different chemical activators of oxidative stress (CH_3COONa , NaCl , FeSO_4 and H_2O_2) into medium. It was shown, that in this species, in common to other green algae, the secondary carotenogenesis is associated with the transition of vegetative cells to the resting stage and a significant change in the chemical composition of cells – the primary carotenoid content decreased (from 12% lutein of the total carotenoids to trace amounts, β -carotene from 10 to 5 – 6 %) and protein (40 to 7 – 16 % dry matter) and the accumulation of lipids and carbohydrates (lipids from 19 to 28 – 50 % dry matter, carbohydrates from 23 to 37 – 47 % dry matter, respectively). In the fractional composition of the secondary carotenoids 11 fractions were identified, but the dynamics of their total content was determined mainly by astaxanthin monoesters (48 – 55 % of the total). A characteristic feature of the species is the presence of adonirubin significant amount (10 – 12 % of the total).

Keywords: *Ettlia carotinos*, secondary carotenogenesis, astaxanthin, lipids, carbohydrates, proteins