



УДК 582.273:577.1

И. А. Харчук, канд. биол. наук., н. с.

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

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРАСНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *PORPHYRIDIUM PURPUREUM* ПРИ ПЕРЕВОДЕ В СОСТОЯНИЕ АНГИДРОБИОЗА

Установлено, что при дегидратации в клетках красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* снижается содержание хлорофилла, каротиноидов, углеводов и нуклеиновых кислот, а содержание белков и липидов не изменяется. Сохраняемая доля биохимических компонентов позволяет клеткам сберегать свою жизнеспособность в обезвоженном состоянии и восстанавливать биосинтетические процессы при реактивации.

Ключевые слова: углеводы, липиды, каротиноиды, хлорофилл, аминокислоты, РНК, ДНК, дегидратация, ангидробиоз

Одноклеточная красная водоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. (син.: *Porphyridium cruentum* Näg.) является источником ряда ценных биологически активных и питательных веществ, таких как пигменты, витамины, полисахариды и т.д. Её специфические фикобилиновые пигменты – В-фикоэритрин и R-фикоэритрин и аллофикоцианины – обладают антиоксидантными свойствами и широко используются в пищевой, парфюмерной и медицинской промышленности. Кроме того, *P. purpureum* представляет интерес как модельный объект для изучения процессов, связанных с переходом клеток в состояние ангидробиоза, т. к. является типичным представителем пойкилоксерофитных водорослей из экологической группы аэрофитов, для которых обезвоживание клеток – нормальное физиологическое состояние, сопровождающееся гелизацией цитоплазмы. Однако исследований, посвящённых изучению процессов биохимической адаптации клеток микроводорослей при переходе их в состояние ангидробиоза, мало. Известно, что перевод клеток в состояние ангидробиоза при помощи дегидратации сопровождается изменением биохимического состава [2, 11, 12], по которым можно судить об их жизнеспособности.

Цель данной работы: исследовать содержание биохимических компонентов в клетках *Porphyridium purpureum* при переводе в состояние ангидробиоза.

Материал и методы. Объект исследования – культура *Porphyridium purpureum* (штамм IBBS-

70) из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ИнБЮМ НАН Украины.

Микроводоросли культивировали в накопительном режиме при постоянном круглосуточном освещении (лампа ДЛР-200) и автоматическом перемешивании с использованием насоса для удаления избытка кислорода из среды и равномерного прогрева всего слоя питательного раствора культуры. Интенсивность освещённости на поверхности раствора составляла 8 кЛк. Температура среды колебалась в диапазоне 25 – 29°C. В качестве питательной среды использовали среду Тренкеншу [10]. Объём среды в культиваторах плоскопараллельного типа составлял 5 л при высоте слоя раствора 45 см.

На стационарной фазе роста проводили концентрирование клеток центрифугированием при 3000 об./мин на лабораторной центрифуге ОПН–3-УХЛ 42. Затем пасту микроводорослей обезвоживали в термостате при температуре 30°C до остаточной влажности 10 – 14 %. Дегидратированные водоросли хранили в герметично закрытых полиэтиленовых упаковках в темноте при температуре 15–20°C. Влажность в обезвоженных культурах определяли стандартным методом доведения до постоянной массы [6]. Пробы обрабатывали по схеме комплексного химического анализа гидробионтов [5]. Массовую долю белка в водорослях определяли по методике Лоури [15], содержание пигментов – спектрофотометрическими методами на приборе СФ-2000 [16]. Хлорофилл (ХЛ) *a* из влажных

нативных клеток *P. purpureum* экстрагировали 100 % ацетоном, из обезвоженных клеток ХЛ а – 90 % ацетоном; оптическую плотность полученных супернатантов регистрировали при 663 нм [16]. Содержание каротиноидов (КР) оценивали в суммарной вытяжке пигментов *P. purpureum* по поглощению в области 480 нм [16]. Общее содержание липидов определяли колориметрическим методом с фосфованилиновым реактивом [7], углеводы – колориметрическим методом с L-триптофановым реактивом [7], количество свободных нуклеотидов (СН), РНК и ДНК – спектрофотометрическим методом [8]. Регистрируемые показатели химического состава выражали в пересчёте на органическое вещество, которое рассчитывали после определения зольности. Зольность определяли сжиганием навесок микроводорослей в муфельной печи при темпе-

ратуре 600°C до постоянного веса. Данные подтверждены статистически с помощью критерия t-Стьюдента (при p=0.95).

Результаты и обсуждение. Анализ содержания биохимических компонентов *P. purpureum* до и после обезвоживания показал, что в клетках, находящихся в состоянии ангидробิโอоза, статистически значимо снижались содержание хлорофилла а (на 38.3 %), каротиноидов (38.6 %), свободных нуклеотидов (27.5 %), РНК (24 %), ДНК (71 %) и суммарных углеводов (на 43 %), причём содержание структурных углеводов понижалось на 67 % (рис. 1). Доля суммарных липидов и белков изменялась незначительно, соответственно на 17 и 9.8 %.

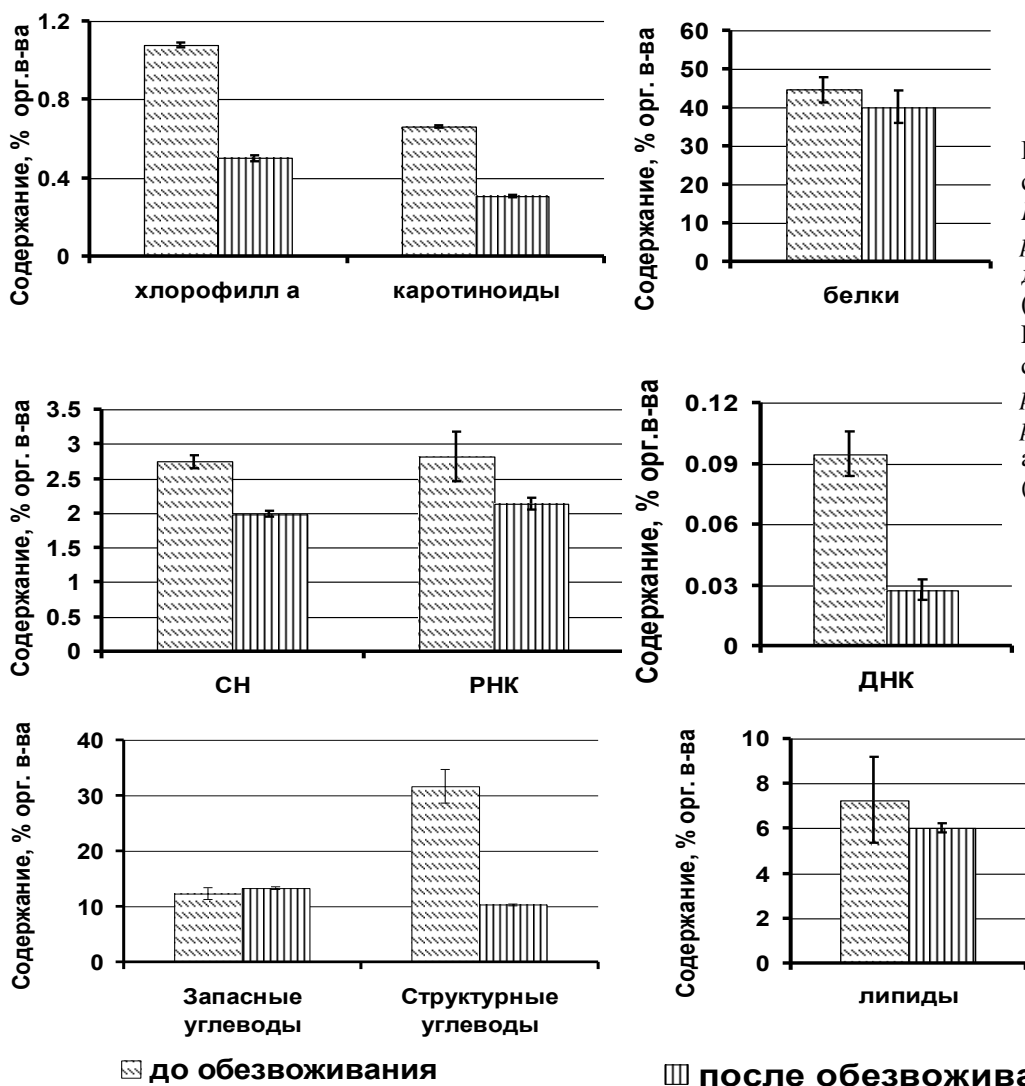


Рис. 1 Биохимический состав *Porphyridium purpureum* до и после дегидратации (P = 0.95)
Fig. 1 Biochemical composition of *Porphyridium purpureum* before and after the dehydration (P = 0.95)

Известно, что в устойчивых к обезвоживанию растениях при дегидратации содержание хлорофилла значительно не изменяется [13, 14], но увеличивается соотношение липидов к пигментам и белков к липидам [9]. Рассчитав вышеперечисленные параметры, мы получили следующие результаты: содержание хлорофилла и каротиноидов снижалось пропорционально друг другу на 38 %. Соотношение липиды/пигменты и белок/липиды в клетках перед обезвоживанием составляло соответственно 4.6 и 6.1, в обезвоженных клетках – 6 и

6.8. Увеличение данных индексов, вероятно, связано с тем, что *P. purpureum* является представителем пойкилоксерофитных водорослей из экологической группы аэрофитов, приспособленных к обезвоживанию. Изучая влияние дегидратации на клетки микроводоросли *Dunaliella salina* и цианобактерий *Arthrospira (Spirulina) platensis*, мы получили данные (табл. 1), из которых следует, что клетки *D. salina* в монадном состоянии неспособны переносить обезвоживание, а клетки *A. platensis* способны выдерживать дегидратацию.

Табл. 1 Соотношение компонентов биохимического состава в микроводорослях
Table 1 Ratio of biochemical composition components in microalgae

Водоросль	Условия	Липиды/пигменты	Белки/липиды
<i>Porphyridium purpureum</i>	Перед дегидратацией	4.6	6.1
	После дегидратации	6.2	6.7
<i>Dunaliella salina</i>	Перед дегидратацией	3.5	0.93
	После дегидратации	3.2	1.1
<i>Arthrospira platensis</i>	Перед дегидратацией	7.6	2.4
	После дегидратации	5.5	5.3

Соотношение углеводов в клетках *P. purpureum* можно сравнить с показателями обитающих в водоёмах водорослей (в период активной вегетации) [4], у которых количество структурных полисахаридов преобладает над запасными. У *P. purpureum* на стационарной стадии роста на структурные полисахариды приходится 71 % общей суммы углеводов, а на запасные – 29 % (рис. 2). После обезвоживания соотношение полисахаридов изменяется: на

долю структурных полисахаридов приходится 46 % всей суммы, на запасные – 54 %. При этом отмечено снижение суммарных углеводов в 1.8, а структурных – в 2.8 раза.

Количество резервных (щёлочерастворимых) углеводов, которые обладают консервирующей способностью, при дегидратации осталось без изменений. Доля структурных полисахаридов после обезвоживания снизилась на 25 % (рис. 2).

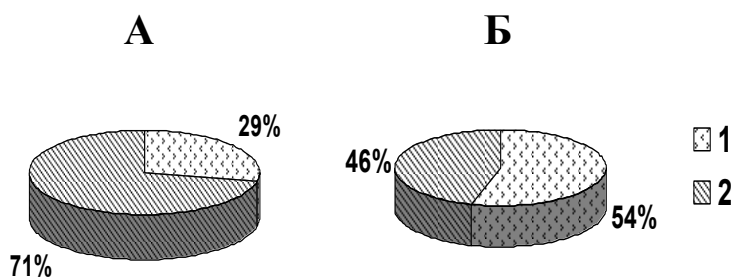


Рис. 2 Содержание углеводов в клетках *Porphyridium purpureum* перед и после обезвоживания: 1 – запасные полисахариды; 2 – структурные полисахариды. А – клетки перед обезвоживанием, Б – сухие клетки

Fig. 2 The content of carbohydrates in *Porphyridium purpureum* cells before and after the dehydration: 1 – reserve polysaccharides; 2 – structural polysaccharides. A – cells before the dehydration, B – dry cells

Известно, что структурные полисахариды входят в состав клеточных стенок, которые, в свою очередь, осуществляют барьерную

функцию, защищая клетки от высыхания. *P. purpureum* – аэрофитная водоросль, встречающаяся и в водоёмах, и в наземных место-

обитаниях [3]. Видимо, в связи с этим большую часть углеводов в её клетке составляют структурные полисахариды, что является приспособлением к неблагоприятным условиям среды и направлено на защиту от высыхания и поддержание жизнедеятельности в период анабиоза. Доля свободных нуклеотидов при дегидратации снижалась в 1.3, РНК – в 1.3, ДНК – в 3 раза. Содержание дезоксирибонуклеиновых кислот в клетках, за исключением периода деления, весьма постоянно, т. к. ДНК более устойчивая и стабильная структура, чем РНК. Содержание РНК изменяется в зависимости от фазы роста, интенсивности биосинтетических процессов в клетках и т.д. Под влиянием по-

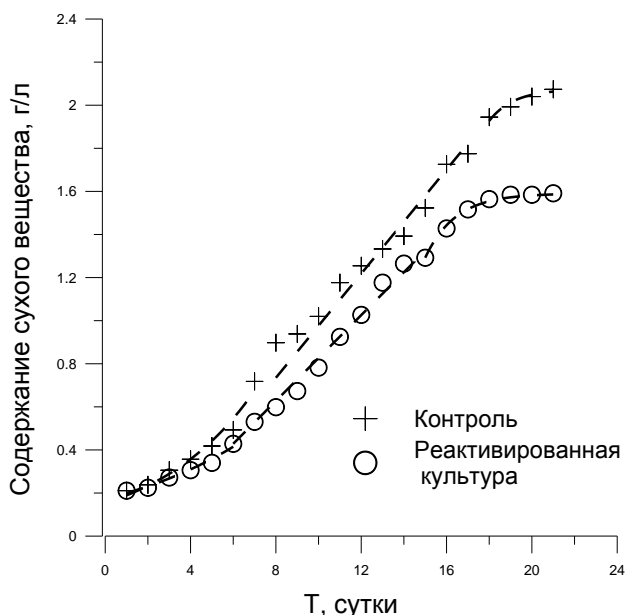


Рис. 3 Динамика биомассы накопительной культуры *Porphyridium purpureum* после реактивации
Fig. 3 Dynamics of biomass in *Porphyridium purpureum* batch culture after reactivation

вышенной температуры происходит ферментативное расщепление РНК. Возможно, что при этом активизируется рибонуклеаза или термически денатурируется её ингибитор. Имеются сведения о том, что деградация РНК происходит в основном на первых этапах процесса сушки, когда остаточная влажность клеток снижается приблизительно до 20 %. В этот период, очевидно, из клетки удаляется вся свободная вода и начинается выпаривание связанной воды [1]. Остаточная влажность клеток в наших экспериментах колебалась от 10 до 14 %. Видимо, изменение содержания аминокислот связано с ферментативными процессами, которые действуют на первых этапах сушки.

Согласно [2], сохранение жизнеспособности микроорганизмов после обезвоживания зависит от состояния белоксинтезирующего аппарата, при этом содержание РНК не должно снижаться более чем на 40 % от первоначального. У *P. purpureum* количество РНК после обезвоживания составляло 74 %, а доля белков изменялась незначительно. Такого количества РНК и белков оказалось достаточно для восстановления процессов биосинтеза, а хлорофиллов и каротиноидов – для начала фотосинтеза. При дальнейшей реактивации обезвоженной культуры наблюдали рост и деление реактивированных клеток, что свидетельствует о восстановлении биосинтеза (рис. 3). Ростовые характеристики реактивированной микроводоросли *P. purpureum* и контроля в различных фазах развития периодической культуры были практически идентичны (табл. 2).

Табл. 2 Ростové характеристики реактивированной микроводоросли *Porphyridium purpureum* в различных фазах развития периодической культуры
Table 2 Growth characteristics of reactivated microalgae *Porphyridium purpureum* at different phases of batch culture

Фазы роста	Показатели	Ростové характеристики	
		Контроль	Реактивированная культура
Логарифмическая	μ_m	0.21	0.14
Линейная	B	$0.49 + P_m^*(t-6)$	$0.43 + P_m^*(t-6)$
	P_m	0.12	0.1
Замедления	μ_r	0.86	0.70

Условные обозначения: μ_m – максимальная удельная скорость роста на логарифмической стадии роста (сут^{-1}), B – динамика плотности (г СВ/л-сут), P_m – средняя продуктивность на линейной фазе роста (г СВ/л-сут), μ_r – удельная скорость дыхания на стадии замедления роста (сут^{-1})

Заключение. При обезвоживании клеток красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* содержание хлорофилла, каротиноидов, углеводов и аминокислот снижается, в то время как содержание белков и липидов не изменяется. Доля сохраняющихся

биохимических компонентов позволяет клеткам сохранить свою жизнеспособность и перейти в состояние анабиоза, а при реактивации восстановить биосинтетические процессы с последующим делением, и ростом клеток.

1. Алов И. А., Брауде А. И., Аспиз М. Е. Основы функциональной морфологии клетки – М.: Медицина, 1969. – 344 с.
2. Бекер М. Е., Райпулис Е. П. Живая клетка и ее жизнедеятельность / под ред. Бекер М. Е., Лиепиньш Г. К., Райпулис Е. П. Биотехнология – М.: ВО Агропромиздат, 1990. – С. 7–41.
3. Водоросли. Справочник. – Под. ред. Вассер С. П. – К.: Наук. думка, 1989 – 608 с.
4. Шнюкова Е. И., Михайлюк Т. И., Дариенко Т. М., Кондратюк С. Я. К изучению углеводов наземных водорослей // Альгология. – 2005. – 15, № 4. – С. 399 – 410.
5. Копытов Ю. П., Дивавин И. А., Цымбал И. М. Схема комплексного биохимического анализа гидробионтов // Рациональное использование ресурсов моря – важный вклад в реализацию продовольственной программы: Мат. конф. // АН УССР. ИнБИОМ. – Севастополь, 1985. – 4.2. – С. 227–231. – Деп. В ВИНТИ 16.04.85, № 2556 – 85.
6. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Под. ред. Топачевского А.В. – К.: Наук. думка, 1975. – 247 с.
7. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры // М.: Изд-во ВНИРО, 2004. – 245 с.
8. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – 23, № 5. – С. 656–662.
9. Таран Н. Ю. Адаптаційний синдром рослин в умовах посухи : автореф. дис. ... докт. біол. наук – Київ, 2001. – 30 с.
10. Тренкениу Р. П., Белянин В. Н., Сидько Ф. Я. Модель светозависимого роста морских микроводорослей (с учетом фотоингибирования) – Красноярск : ИФСО, 1981. – 63 с. – (Препринт / Ин-т физики, Сиб. отд-е; 18Б).
11. Харчук И. А., Копытов Ю. П. Динамика фракционного состава липидов в клетках *Spirulina platensis* (Nordst) в зависимости от температуры дегидратации // Экология моря. – 2005. – Вып. 70. – С. 79 – 83.
12. Харчук И. А. Динамика компонентов биохимического состава *Spirulina platensis* Nordst при ангидробиозе // Экология моря. – 2008. – Вып. 76. С. 67 – 71.
13. Chandrasekhar I., Gaber B. P. Stabilization of the bio-membrane by small molecules: interaction of trehalose with the phospholipid bilayer // J. Biomol. Struct. Dyn. – 1988. – 5, № 6. – P. 1163–1171.
14. Hazel J. R., Williams E. E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment // Prog. Lipid Res. – 1990. – 29, № 3. – P. 167 – 227.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Faar A. L. et al. Protein measurement with folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1. – P. 265–275.
16. Rowan K. S. Photosynthetic Pigments of Algae // Cambridge : Cambridge Univ. Press, 1989. – 334 pp.

Поступила 04 октября 2011 г.
После доработки 19 мая 2012 г.

Хімічний склад червоної микроводорості *Porphyridium purpureum* при переводі у стан ангидробиозу. І. О. Харчук. Встановлено, що під час дегідратації в клітинах червоної микроводорості *Porphyridium purpureum* знижується вміст хлорофілу, каротиноїдів, вуглеводів і нуклеїнових кислот, в той час як вміст білків і ліпідів не змінюється. Збережена частка біохімічних компонентів дозволяє клітинам зберігати свою життєздатність у збезводненому стані і відновлювати біосинтетичні процеси при реактивації.

Ключові слова: вуглеводи, ліпіди, каротиноїди, хлорофіл, амінокислоти, РНК, ДНК.

The chemical compounds of the red microalgae *Porphyridium purpureum* for transfer to the anhydrobiosis state. I. A. Kharchuk. The biochemical composition of red microalgae *Porphyridium purpureum* cells until and after dehydration are studied. The founded that content of chlorophyll, carotenoids, carbohydrates and nucleic acids reduce during dehydration, but the content of proteins and lipids is not changed. Conservation of pigments within 60 % from pristine was enough for renewal of photosynthesis after reactivation. The received experimental data show that the preserved part of biochemical components allows cells to save up the viability in the dehydrated state.

Key words: carbohydrates, lipids, karotinoids, chlorophyll, amino acid, RNA, DNA, dehydration, anhydrobiosis