



УДК 582.263:577.115

Э. С. Челебиева, асп.

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

СКРИНИНГ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЗЕЛЁНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПРИРОДНЫХ КЕТОКАРОТИНОИДОВ

3. ВВЕДЕНИЕ В ЛАБОРАТОРНУЮ КУЛЬТУРУ И ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА *ETTLIA CAROTINOSA*

Получены новые экспериментальные данные о скорости роста периодических культур *Ettlia carotinos* на различных питательных средах, содержании и фракционном составе каротиноидов в клетках в условиях экспериментально индуцированного вторичного каротиногенеза.

Ключевые слова: микроводоросли, *Ettlia carotinos*, вторичный каротиногенез, астаксантин

Данная работа является продолжением исследований общих закономерностей и особенностей вторичного каротиногенеза (ВКРГ) у зелёных микроводорослей, проводимых в ИнБЮМ НАНУ для выявления перспективных продуцентов природных кетокаротиноидов (ККР) [5]. Основаниями для включения *Ettlia carotinos* Komarek 1989 в список объектов скрининга послужили ярко-красная окраска старых культур водоросли при её коллекционном хранении на агаризованных питательных средах, гипотетическая филогенетическая близость родов *Ettlia* и *Haematococcus* [1, 4], а также литературные сведения о наличии астаксантина (АСТ) в составе вторичных каротиноидов (ВКР) у идентичных штаммов, идентифицированных ранее как *Neochloris wimmeri* (UTEX 113) [16, 17] и *Chlorococcum*

wimmeri (CCALA E 348) [12]. Основные задачи данной работы состояли в: а) подборе оптимальной питательной среды для I «зелёной» стадии культивирования; б) первичной оценке среднесуточного выхода суммарных каротиноидов и их фракционного состава при выращивании водоросли по двухстадийной схеме скрининга продуцентов АСТ [5].

Материал и методы. Объект исследования – зелёная микроводоросль *Ettlia carotinos* штамм Mainx (другие названия *Neochloris wimmeri* и *Chlorococcum wimmeri*) [11, 15]. Для определения оптимальных условий питания на I стадии двухстадийной накопительной культуры водоросль выращивали на питательных средах BBM [20], CHU-13 [21], OHM [13] и BG-11 [20], усиленных по азоту и фосфору в 1.5 – 3 раза (табл. 1).

Питательные среды	Содержание биогенных элементов, мг·л ⁻¹		N/P (молярное отношение)
	азот	фосфор	
BBM 3N	123.6	53.2	5.1
CHU-13 3N-3P	166.3	42.8	8.6
CHU-13 5N-3P	277.2	42.8	14.3
OHM 1.5N-1.5P	85.2	9.8	19.3
BG-11 (стандартная)	247.0	27.3	20.0

Табл. 1 Содержание азота и фосфора в модифицированных питательных средах
Table 1 Nitrogen and phosphorus content in the modified nutrient media

Остальные параметры культивирования: освещённость (Е) на наружной поверхности стеклянных конических колб объёмом 100 мл – 4 кЛк (одностороннее боковое освещение лампами «Ultra-light» DL 21 W с фотопериодом – 15 ч свет : 9 ч темнота), объём культуры в колбах – 70 мл, температура питательной среды – 25°C, скорость продув-

ки суспензии клеток газовой воздушной смесью – 1.8 л · мин⁻¹ · л⁻¹ (0.3% CO₂ v/v), начальная численность клеток ≈ 3 · 10⁵ кл · л⁻¹.

По завершении «зелёной» стадии (8-е сут.) культуры, полученные на разных средах, объединили и использовали для исследования особенностей ВКРГ, индуцированного путём одновременного

изменения нескольких ключевых параметров культивирования: увеличения облучённости клеток, снижения концентрации биогенных элементов и увеличения отношения C/N в среде. Для этого в стеклянные конические колбы объёмом 0.5 л внесли по 50 мл объединённой культуры, 300 мл дистиллированной воды и несколько капель маточных растворов нитрата и фосфата натрия до концентрации азота (N) и фосфора (P) в среде 5.5 и 1.4 мг·л⁻¹, соответственно. Для интенсификации ВКРГ в каждую колбу добавили раствор ацетата натрия (NaAc) до концентрации 20 мМ. Культуры перевели на круглосуточное двухстороннее освещение, увеличив Е до 15.5 кЛк. Скорость продувки и состав газовой смеси оставили без изменений. Температуру среды поддерживали на уровне 25 – 26°C при помощи бытового кондиционера и охлаждения поверхности колб направленным потоком воздуха, создаваемым вентилятором.

Численность клеток (n), удельную скорость роста (μ), содержание сухого вещества (СВ) и суммарных каротиноидов (Σ КР) в культурах и биомассе определяли при помощи методов, описанных в [6]. Фракционный состав КР анализировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А в двух системах растворителей: I – гексан-ацетон 9 : 1; II – гексан-бензол-ацетон 5 : 3.75 : 0.8 [3].

Данные, приведённые на рисунках и в тексте, являются средними (\bar{x}) из значений, полученных в двух биологических и трёх аналитических повторностях. Их вариабельность характеризуется выборочным стандартным отклонением (s).

Результаты и обсуждение. Использованный в работе штамм Mainx (IBSS-91) получен в мае 2009 г. из коллекции кафедры ботаники Киевского национального университета им. Т. Шевченко (= АСКУ 573-06) [4], куда он, в свою очередь, поступил из Гёттингенского университета (= SAG 213-4). Штамм выделен из почвы в Чехословакии; дата выделения неизвестна. Судя по информации о периоде работы Ф. Майнкса (F. Mainx) в университете г. Праги (1927 – 1931 гг.) и по наличию субкультур штамма (= CСAP 213/4 = CСALA E 348 = UTEX 113) в коллекциях, заложенных на основе пражского фонда проф. Е. Принсгеймом (E. Pringsheim) в Кембридже и Гёттингенском

университете в начале 1940-х и 1950-х гг. [18], штамм АСКУ 573-06 к моменту поступления в ИнБЮМ уже более 70 лет поддерживался на твёрдых органо-минеральных средах при пониженной освещённости, влажности и температуре. Очевидно, что в результате неизбежной в таком случае многолетней автоселекции сформировалась стенобионтная популяция клеток, плохо переносящих даже незначительные отклонения от узкой зоны оптимума, выработанного при культивировании в строго контролируемых условиях. Со времени получения штамма в течение года нам не удавалось получить активно растущую культуру ни на одной из жидких питательных сред для зелёных микроводорослей (ВВМ, CHU-13, AF6, BG-11, ОНМ), приготовленных как по оригинальной рецептуре, так и с добавлением органических субстратов (почвенного экстракта, ацетата натрия, глюкозы, гуминовых кислот, пептона, мидийного гидролизата и др.) [13, 20, 21]. После пересева с агаровых «косяков» на жидкие среды культуры развивались по сходному сценарию:

а) длительная лаг-фаза (2 – 4 сут.), сопровождающаяся увеличением размеров и агрегацией клеток в псевдоколониальные (пальмеллоидные) скопления, устойчивые при интенсивном перемешивании и барботаже вследствие прочной иммобилизации клеток на детрите (рис. 1А);

б) слабый непродолжительный рост в течение 2 – 3 сут. за счёт деления с образованием апланоспор (2 – 4, реже 6 клеток в спорангии), сохранение в центре образующихся дочерних клеток зон, окрашенных в красный цвет каротиноидами, отсутствие размножения зооспорами (рис. 1Б);

в) усиление каротиногенеза, утолщение оболочек и переход клеток в стадию покоя (рис. 1 В).

Только весной 2010 г. на жидкой среде CHU-13 в культурах, поддерживаемых при естественном свете, после многократных пересевов было зарегистрировано активное деление клеток с образованием зооспор (рис. 2 В – Д).

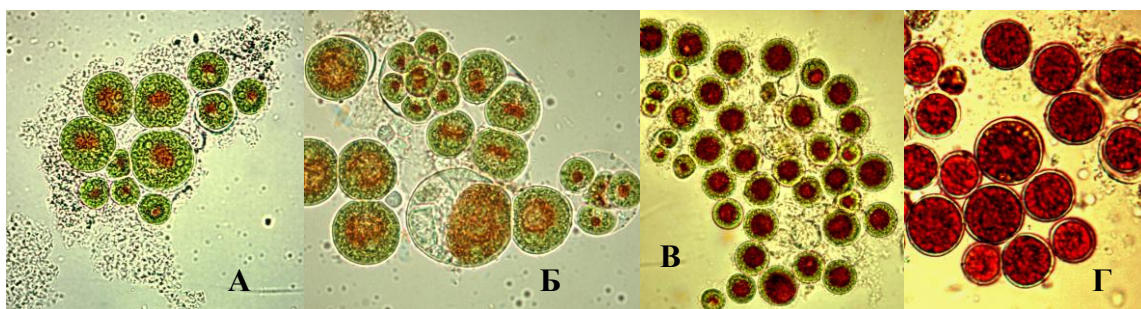


Рис. 1 Динамика развития культуры *E. carotinoso* при неблагоприятных условиях среды
 Fig. 1 The development of *E. carotinoso* culture under unfavorable environmental conditions

Этой среде было отдано предпочтение при хранении штамма в нашей лаборатории, хотя и данным варианте как старые, так и молодые клетки на протяжении всего периода культивирования между посевами сохраняют некоторое количество ВКР (что, по-нашему мнению, указывает на неполную адекватность внешних условий). В подвижных зооспорах пигменты, как правило, сосредоточены в апикальной части клетки (рис. 2 Д), в осевших округлившись зооспорах и созревающих апланоспорах – вокруг

ядра. Увеличение числа зооспор бывает особенно заметно через сутки после разбавления (2 : 1) стареющих культур водой или редуцированной средой. На среде СНУ-13 бедной, как все коллекционные среды, биогенными элементами ($55.4 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ N}$ и $14.3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ P}$), но содержащей лимонную кислоту ($100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) в качестве хелатирующего агента [21], культуры обычно достигают стационарной фазы роста на 5 – 6-е сут. при максимальной плотности $1 \cdot 10^4 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$.

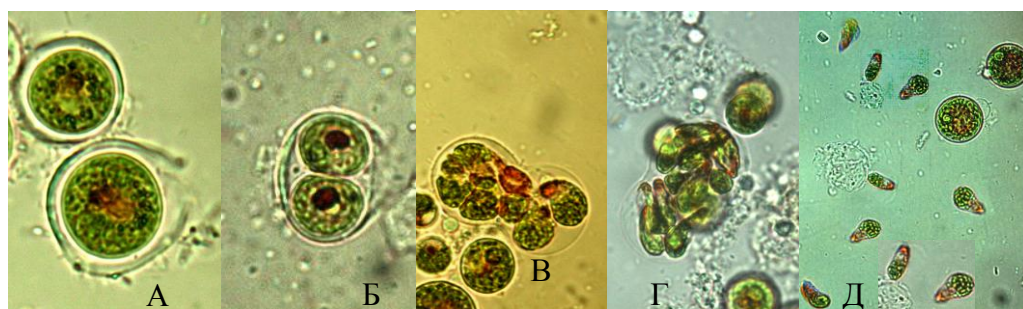


Рис. 2 Бесполое размножение *Ettlia carotinoso* путём образования неподвижных авто- и апланоспор (А, Б) и подвижных двухжгутиковых зооспор (В – Г).
 Fig. 2 Asexual reproduction of *Ettlia carotinoso* by immobile auto- and aplanospores (A, B) and mobile biflagellate zoospore

Сопоставление скоростей роста *Ettlia* на разных средах, различающихся по концентрации и молярному соотношению N/P (табл. 1), составу микроэлементов и хелатонов [13, 20, 21], при искусственном освещении и барботаже воздушно-углекислотной смесью показало, что активизация деления водоросли на среде СНУ-13, по всей вероятности, связана не столько со спецификой её рецептуры, сколько с формированием новой популяции клеток, бо-

лее адаптированных к автотрофному росту на жидких субстратах. Характер накопительных кривых (рис. 3) и данные табл. 2 свидетельствуют о том, что при невысокой освещённости и ограниченном снабжении культур CO_2 увеличение концентрации N в среде выше $85 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (среда ОНМ) не даёт ощутимых положительных результатов в плане повышения численности клеток в культурах в конце I стадии культивирования.

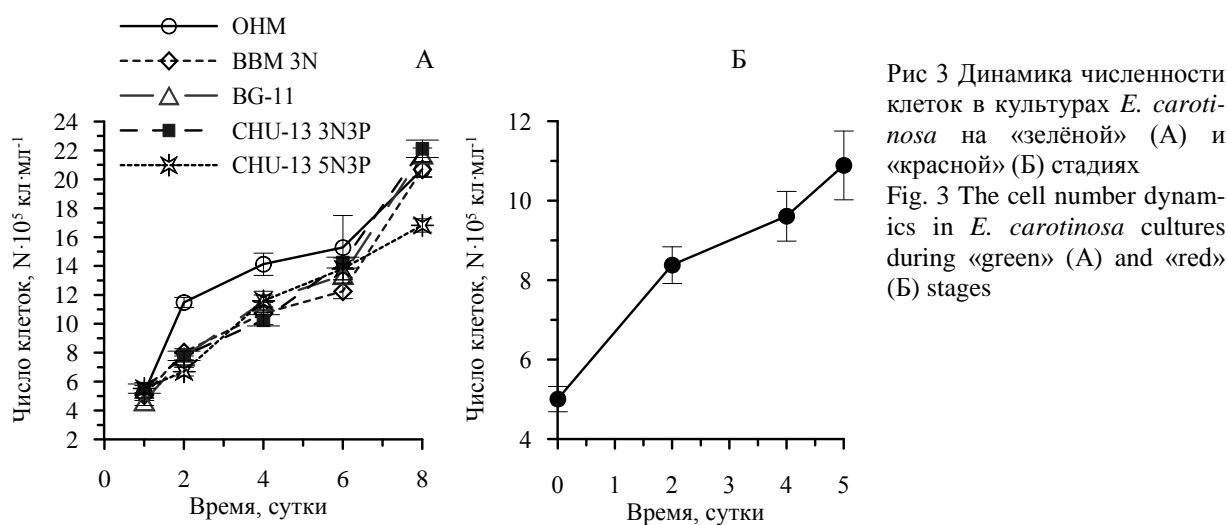


Рис 3 Динамика численности клеток в культурах *E. carotinos* на «зелёной» (А) и «красной» (Б) стадиях
Fig. 3 The cell number dynamics in *E. carotinos* cultures during «green» (A) and «red» (B) stages

Табл. 2 Ростовые характеристики культур *Ettlia carotinos* в зависимости от состава питательной среды
Table 2 The growth characteristics of *Ettlia carotinos* cultures depending on nutrient medium composition

Показатели роста	BBM 3N	CHU13 3N-3P	CHU13 5N-3P	OHM 1.5N-1.5P	BG-11
μN макс. сут ⁻¹	0.46 ± 0.05	0.51 ± 0.04	0.51 ± 0.04	0.79 ± 0.03	0.52 ± 0.06
μN ср. сут ⁻¹	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.03
μCB ср. сут ⁻¹	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.02
PCB ср. г·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.01
CB макс. г·л ⁻¹	1.17 ± 0.01	1.18 ± 0.04	1.24 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.78 ± 0.02

Средние удельные скорости роста *E. carotinos* на разных средах, рассчитанные по численности клеток и сухому веществу, достоверно не различались и, следовательно, любую из них можно с одинаковым успехом использовать для культивирования реакклимированного штамма Mainx на «зелёной» стадии. Однако, с учётом величин максимальной удельной скорости роста культур и необходимости создания острого дефицита элементов питания для индукции ВКРГ, предпочтение следует отдать модифицированной среде OHM (1.5N – 1.5P).

В данной работе для индукции ВКРГ у *E. carotinos* был использован «облегчённый» вариант стрессирования культуры, в котором из комплекса стресс-факторов исключили наиболее агрессивный агент – NaCl, концентрацию NaAc снизили до 20 мМ, и температуру питательной среды стабилизировали на уровне 24 – 25°C. Основными действующими факторами в этом случае были резкий градиент облученности клеток за счёт 4-кратного увеличения внешней освещённости и 7-кратного раз-

ведения культуры в сочетании с увеличением отношения C/N в среде. Эти изменения были сделаны на основании многомесячных наблюдений за ростом культур *E. carotinos* при реакклимации штамма Mainx к жидким средам, указывающих на его повышенную стресс-реактивность. Правомочность такого «щадящего» подхода подтвердилась всем ходом событий в постстрессорный период. Уже через 4 ч после стресс-воздействия культуры изменили цвет с зелёного на бурый, а через 3 сут. приобрели ярко-красную окраску. За 5 сут. содержание суммарных каротиноидов ($\Sigma КР$) в расчёте на единицу объёма увеличилось в 11 раз, а в расчёте на клетку \approx в 6 раз (рис. 4 А). При этом вместо массовой гибели клеток (как это всегда бывает в культурах *H. pluvialis* в присутствии ацетата [2]) на протяжении всей «красной» стадии наблюдалось их активное деление с образованием апла- и зооспор, в результате чего численность клеток в культурах на 5-е сут. увеличилась более чем в 2 раза (рис. 3 Б).

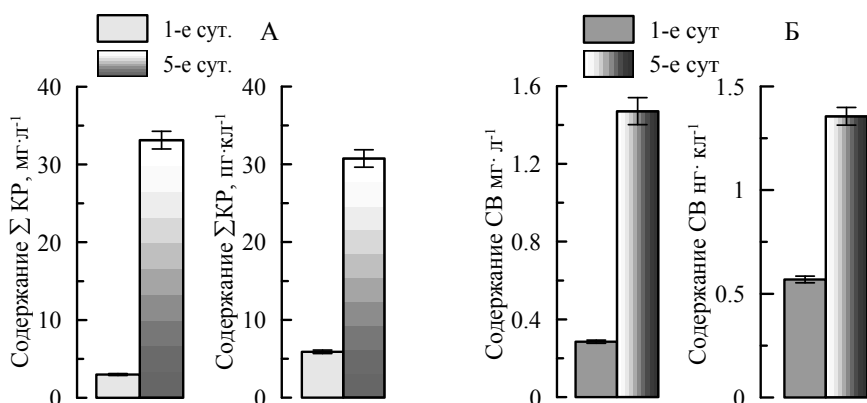


Рис. 4 Содержание суммарных каротиноидов (А) и сухого вещества (Б) в расчёте на литр культуры и клетку *E. carotinos* в начале и конце «красной» стадии
 Fig. 4 Total carotenoid (A) and dry matter (B) contents per liter culture and cell of *E. carotinos* at the start and the end of «red» stage

В условиях дефицита питания вновь образовавшиеся клетки останавливались в росте и средний размер клеток в «красной» культуре уменьшился почти в 1.5 раза (от 8.44 ± 2.27 мкм в начале эксперимента до 5.21 ± 1.36 мкм в конце). Это отразилось на несоответствии между кратностью прироста содержания Σ КР и сухого вещества в культурах в расчёте на литр и клетку (рис. 4 А, Б).

Массовая доля Σ КР в сухой биомассе *E. carotinos*, собранной в конце эксперимента, составила 2.3 ± 0.2 %, что соответствует данным, приведенным для этого же штамма (1.92 %) в [О-2]. Такой высокий уровень Σ КР уже сам по себе, безотносительно к их фракционному составу, представляет существенный интерес в плане выявления новых видов расти-

тельного сырья для получения природных каротиноидов, так как их содержание в красных овощах, фруктах и морепродуктах на 1 – 2 порядка ниже [14].

Кроме того, среднесуточный выход Σ КР из литра исходной культуры *E. carotinos* (с плотностью $5.2 \cdot 10^5$ кл·мл⁻¹) был в несколько раз (2 – 5) выше, чем у других видов зелёных микроводорослей, протестированных в нашей лаборатории в ходе скрининговых исследований [2, 5 – 10], и составил около $13 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$.

И, наконец, третья, не менее важная в биотехнологическом отношении характеристика *E. carotinos* состоит в том, что в красной биомассе водоросли более 90 % от Σ КР приходится на кетокаротиноиды (табл. 3).

Наименование фракции	Содержание, % от суммы
моноэфиры астаксантина	50.78 ± 0.54
диэфиры астаксантина	10.92 ± 0.46
кантаксантин	10.65 ± 0.44
эфиры адонирубина	10.55 ± 0.11
сумма неидентифицированных ККР	9.19 ± 0.73
сумма первичных каротиноидов (β-каротин, неоксантин, лютеин/зеаксантин, виолаксантин)	6.04 ± 0.26
сумма кетокаротиноидов	92.089 ± 2.278

Табл. 3 Состав каротиноидов (% от суммы) у *Ettlia carotinos* на 5-е сутки «красной» стадии
 Table 3 Carotenoid composition (% of total content) in *Ettlia carotinos* on the 5th day of the «red» stage

Однако в отличие от *H. pluvialis*, доля эфиров АСТ у эттлии составляет немногим более 60% от Σ КР. Помимо этого в составе ее ККР по результатам химических, хроматографических и спектроскопических тестов [3, 19] были идентифицированы кантаксантин и эфиры адонирубина (\approx по 10 % от Σ КР), которые в

зрелых апланоспорах гематококкуса регистрируются лишь в следовых количествах [2, 6, 7]. Являются ли эти различия видоспецифичными или отражают несовпадения в условиях культивирования, покажут дальнейшие исследова-

ния, направленные на выяснение зависимости фракционного состава ККР у водорослей от способов индукции ВКРГ и условий их культивирования на «красной стадии».

Выводы. Введен в лабораторную культуру новый вид продуцентов кетокаротиноидов *Ettlia carotinos*. Период адаптации коллекционных штаммов, длительно хранившихся на агаризованных средах, к росту на жидких средах может достигать 10 – 12 мес. Для лабораторного культивирования *Ettlia carotinos* с целью оценки биотехнологического потенциала вида как источника природных кетокаротиноидов можно рекомендовать модифицирован-

ные по содержанию азота и фосфора питательные среды ОНМ (1.5N-1.5P), СНУ-13 (3N-3P), ВВМ (3N). Отличительными чертами вида являются: сохранение способности к делению в условиях индуцированного ВКРГ; преобладание в составе вторичных каротиноидов эфиров астаксантина (>60% от суммы ККР); высокое содержание суммарных каротиноидов в сухой биомассе (не менее 2 %) и высокий среднесуточный выход каротиноидов при выращивании методом двухстадийной накопительной культуры (около 13 мг·л⁻¹·сут.⁻¹). Вид представляет несомненный интерес для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований.

1. Андреева В. М. Почвенные и аэрофильные зелёные водоросли. – СПб.: Наука, 1998. – 351 с.
2. Данцюк Н. В. Влияние ацетата натрия на интенсивность вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* // Экология моря. – 2010. – Вып. 80. – С. 44 – 50.
3. Дробецкая И. В., Минюк Г. С., Чубчикова И. Н., Боровков А. Б. Определение содержания астаксантина и кантаксантина у зелёных микроводорослей методом тонкослойной хроматографии // Экология моря. – Вып. 79. – С.50-56.
4. Костилов И. Ю., Демченко Э. Н., Березовская М. А. Коллекция культур водорослей Киевского национального университета им. Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008). // Черноморск. ботан. журн. – 2009. – 5, №1. – С. 37 – 39.
5. 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.
6. 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, № 2. – С. 148 – 159).
7. Терентьева Н. В., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Минюк Г. С. Влияние освещенности на физиолого-биохимические характеристики зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* (Chlamydomonadales) // Экология моря. – 2008. – Вып. 75. – С. 82 – 88.
8. Чубчикова И. Н., Дробецкая И. В., Минюк Г. С. и др. 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. – Р.
9. Чубчикова И. Н., Минюк Г. С., Дробецкая И. В. Вторичный каротиногенез у зелёной микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz в условиях природной освещенности и температуры. // Экология моря. – 2010. – Вып. 81. – С. 77 – 81.
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. Archibald P. A., Bold H. C. The classification of three unicellular green algae // Phytomorphology. – 1970. – 20. – P. 383 – 389.
12. Brown T. E., Richardson F. L., Vaughn M. L. Development of Red Pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales) // Phycologia. – 1967. – 6, No. 4. – P. 167 – 184.
13. Fábregas J., Domínguez A., Regueiro M. et al. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis* // Appl. Microbiol. Biotech. – 2000. – 53. – P. 530 – 535.
14. Holden J. M., Alison L., Eldridge G. R. et al. Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database // J. Food Comp. Anal. – 1999. – 12. – P. 169 – 196.
15. Kouwets F. A. Comparative ultrastructure of sporulation in six species of *Neochloris* (Chlorophyta) // Phycologia. – 1995. – 34, No. 6. – P. 486 – 500.
16. Orosa M., Torres E., Fidalgo P., Abalde J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae // J. Appl. Phycol. – 2000. – 12, No 3-5. – P. 553 – 556.

17. Orosa M., Valero J.F., Herrero C. Abalde J. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions // *Biotechnol. Lett.* – 2001. – **23**, No. 13. – P. 1079 – 1085.
18. Preisig H. R., Andersen R. A. Historical review of algal culturing techniques / *Algal Culturing Techniques* (Andersen R.A. ed.). – London: Elsevier Acad. Press, 2005. – P. 1 – 12.
19. Rodriguez-Amaya D. B. A guide to carotenoid analysis in foods / Washington: ILSI Press, 2001. – 71 p.
20. Watanabe M. M. Freshwater culture media / *Algal culturing techniques* (Andersen R.A., ed.). – London: Elsevier Academic Press, 2005. – P. 13 – 21.
21. Yamaguchi K., Nakano h., Murakami M et al. Lipid composition of green alga *Botryococcus braunii* // *Agric. Biol. Chem.* – 1987. – **51**, No. 2. – P. 493 – 498.

Поступила 18 августа 2011 г.

Скринінг одноклітинних зелених мікрободоростей як потенційних джерел природних кето каротиноїдів 3. Введення в лабораторну культуру і первинна оцінка біотехнологічного потенціалу *Ettlia carotinos*. Е. С.Челебієва. Отримані нові експериментальні дані, що характеризують швидкість росту періодичних культур *Ettlia carotinos* Komarek 1989 на різних живильних середовищах, зміст і фракційний склад каротиноїдів в клітинах в умовах експериментально індукованого вторинного каротиногенезу.

Ключові слова: мікрободорості, *Ettlia carotinos*, вторинний каротиногенез, астаксантин

Screening of unicellular green microalgae as a potential source of natural ketocarotenoids 3. Introduction into laboratory cultures and by primary estimation of biotechnological potential of *Ettlia carotinos*. E. S. Chelebieva. New experimental data characterizing the growth rate of periodic crop *Ettlia carotinos* Komarek 1989 on various nutrient media, content and fractional composition of carotenoids in the cells under experimentally induced secondary carotenogenesis conditions are obtained.

Key words: microalgae, *Ettlia carotinos*, secondary carotenogenesis, astaxanthin