



УДК 57.083.1:573.7:574.6

Н. В. Терентьева, вед. инж.,

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

**ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА
В ВЕГЕТАТИВНЫХ КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW (CHLORO-
PHYCEAE)
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ МИНЕРАЛЬНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ**

Исследовано влияние концентрации азота и фосфора в среде на скорость роста и накопление астаксантина в вегетативных клетках зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* при выращивании методом одностадийной полупроточной культуры. Показано, что необходимым условием сохранения монадной структуры, деления клеток на протяжении длительного периода и накопления в них астаксантина является поддержание минимального уровня биогенных элементов в среде в пределах 0.2-0.4 мМ N и 0.01-0.02 мМ P.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*, культивирование, астаксантин, азот, фосфор.

В последние два десятилетия зелёная микроводоросль *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlamydomonadales) является объектом интенсивных фундаментальных и прикладных исследований, направленных на выявление основных закономерностей вторичного каротиногенеза (ВКГ) у Chlorophyceae и разработку научных основ массового культивирования этого вида для получения природного кетокаротиноида астаксантина (АСТ) [2 – 13]. В большинстве работ, посвящённых этим проблемам, показано, что биосинтез АСТ в клетках водоросли наблюдается исключительно при неблагоприятных условиях внешней среды (экстремальной освещённости, температуре, солёности, дефиците азота и др.). При этом вегетативные монадные клетки, как правило, утрачивают подвижность, прекращают деление и трансформируются в апланоспоры, окруженные плотной, устойчивой к химическим воздействиям и механическому разрушению оболочкой.

Кинетика накопления и содержание астаксантина в апланоспорах определяется природой и интенсивностью стресс-воздействия, а также физиологическим состоянием клеток в момент индукции ВКГ [4, 8 – 10, 12, 13]. В то же время, по данным [5, 7, 11] и нашим собственным наблюдениям [2, 3], переход в стадию апланоспоры не является обязательным условием биосинтеза вторичных каротиноидов (ВКР) у этого вида. При дефиците азота (N) и фосфора (P) в среде астаксантин часто появляется сначала в монадных делящихся клетках и лишь позднее (через 4 – 7 сут) при полном отсутствии элементов питания происходит образование апланоспор. Биосинтез ВКР в монадах отмечается как при экстремально высокой ($1220 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$) [7], так и при пониженной освещённости ($35\text{--}70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{c}^{-1}$) и температуре ($12\text{--}14^\circ\text{C}$) [2], что указывает на ключевую роль минерального обеспечения в этом процессе. До сих пор остается неясным, является

К 14 сут в вар. 4 содержание N увеличилось по отношению к начальному уровню на порядок, а P – в 6.4 раза (рис. 2). В вар. 3 азот поглощался в течение суток полностью, а фосфор, начиная с 6-х сут, лишь частично, в ре-

зультате чего его концентрация возросла более чем в 3 раза. Монадные культуры (вар. 1 и 2) на протяжении всего периода наблюдений потребляли добавляемые в среду биогены в течение суток без остатка.

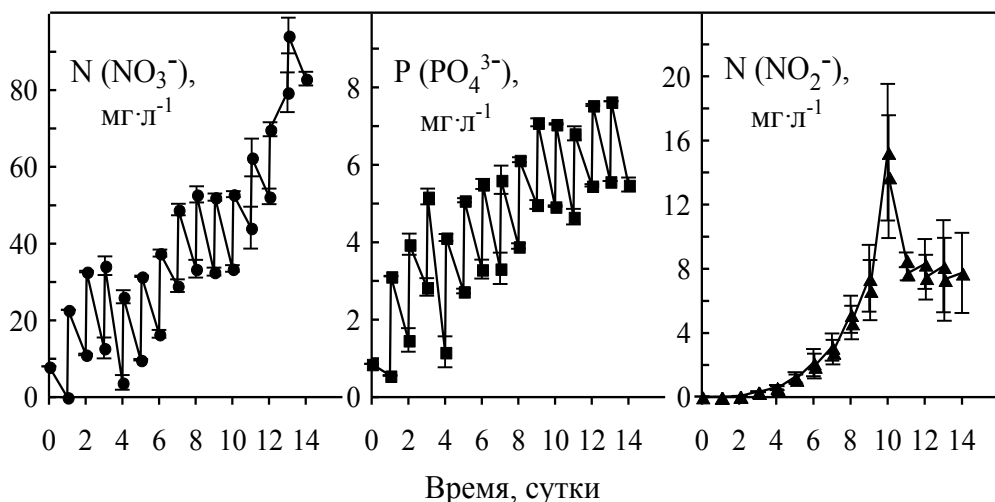


Рис. 2 Динамика содержания азота и фосфора в питательной среде варианта 4

Fig. 2 The dynamics of nitrogen and phosphorus contents in nutrient medium of the variant 4

Скорость роста культур при избыточном питании в период 0-14 сут (вар. 4) была на 60 -

75% ниже, чем в условиях острого и подострого лимита биогенных элементов (рис. 3).

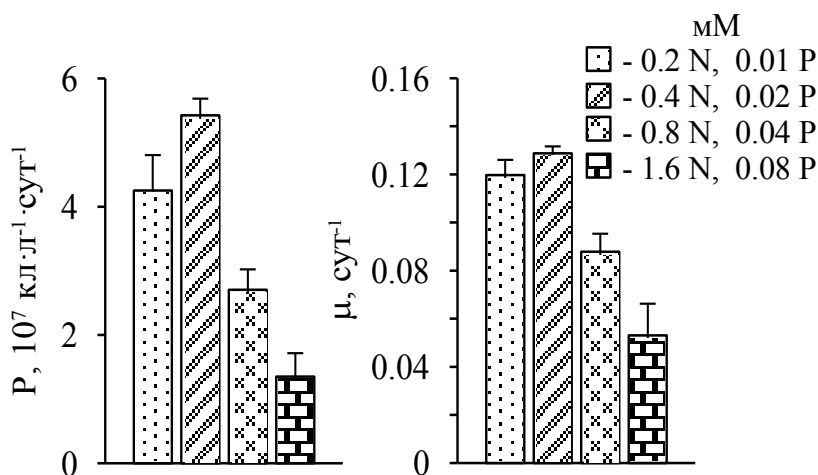


Рис. 3 Средняя продуктивность и удельная скорость роста культур *H. pluvialis* (0-14 сут) в зависимости от условий минерального обеспечения

Fig. 3 Mean productivity and specific growth rate of *H. pluvialis* cultures depending on nutrients supply

Содержание АСТ в культурах и биомассе водоросли находились в обратной зависимости от концентрации N и P в среде (рис. 4).

Уже на 6-е сутки относительное содержание моно- и диэфиров астаксантина в суммарных КР монадных клеток, лимитированных по биогенам, составляло 59 % (вар. 1) и 51% (вар. 2). В последующие дни доля эфиров АСТ продолжала увеличиваться (при сохранении разницы между вариантами в 9 – 12%) и на

заключительном этапе достигла 83-70 %, соответственно, за счет снижения концентрации основных фракций первичных КР – лютеина и β-каротина (рис. 5).

Описанная динамика хорошо согласуется со сложившимися представлениями о ключевой роли дефицита биогенных элементов в индукции и регуляции ВКГ у микроводорослей [4, 9].

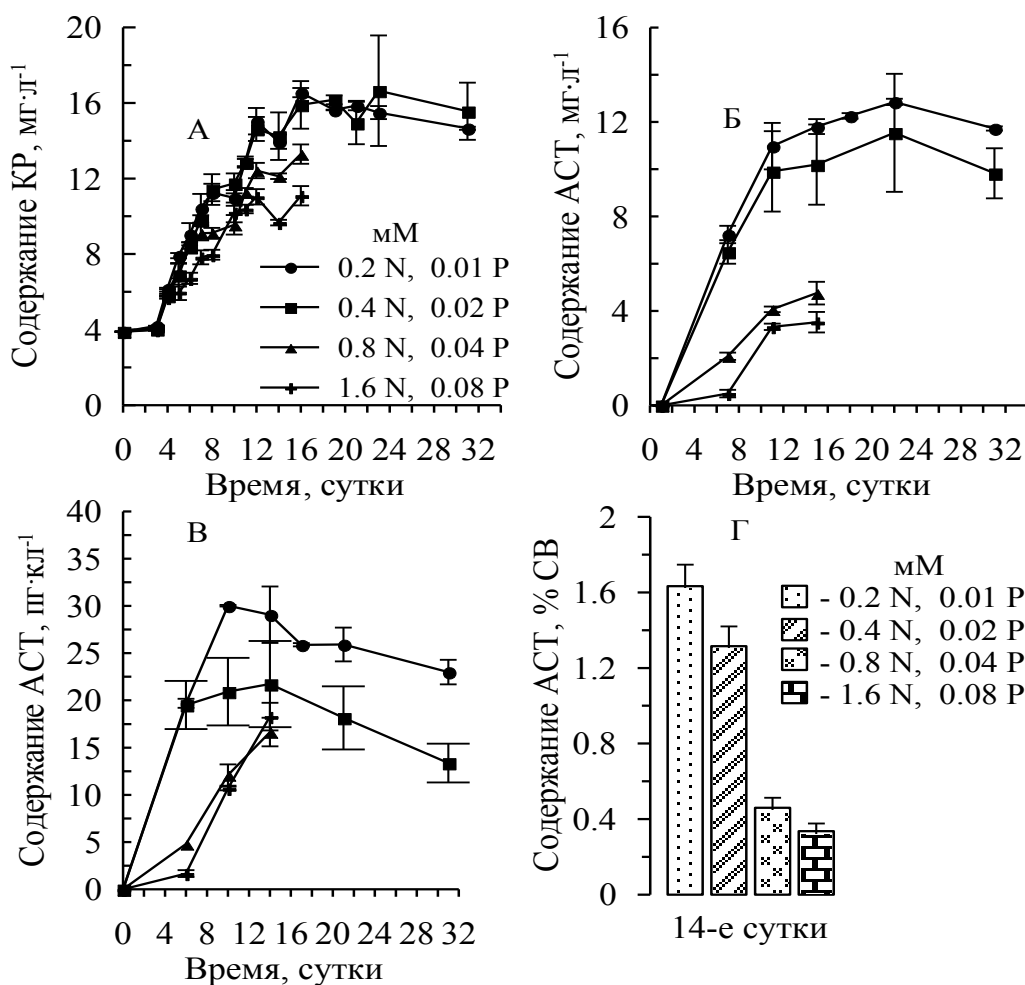


Рис. 4 Содержание суммарных каротиноидов и астаксантина в культурах и биомассе *H. pluvialis* в зависимости от условий питания
 Fig 4 Total carotenoid and astaxanthin contents in cultures and biomass of *H. pluvialis* depending on nutrients supply

В то же время в рамки указанной концепции не укладываются результаты, полученные в вариантах 3 и 4, где в условиях накопления биогенов в среде пальмеллевидные клетки и апланоспоры так же, как и голодающие монады, синтезировали АСТ. Хотя содержание пигмента в культурах и биомассе было существенно ниже, чем при дефиците питания, тем не менее доля эфиров АСТ в суммарных КР была весомой и достигала $\approx 37\%$. Этот факт, по нашему мнению, может служить косвенным подтверждением гипотезы о свободнорадикальном (СР) механизме индукции биосинтеза ВКР у водорослей в ответ на экстремальное по ин-

тенсивности действие разнородных по физико-химической природе факторов внешней среды (свет, температура, лимит биогенов, солёность, токсиканты и др.) [12]. В данном случае последовательность событий, определивших полученный результат, может быть описана следующей гипотетической схемой: избыток нитратов в среде \rightarrow увеличение внутриклеточного пула нитритов [15] \rightarrow усиление продукции NO и интенсификация СР-процессов [16] \rightarrow активизация системы антиоксидантной защиты клетки \rightarrow индукция биосинтеза АСТ [12].

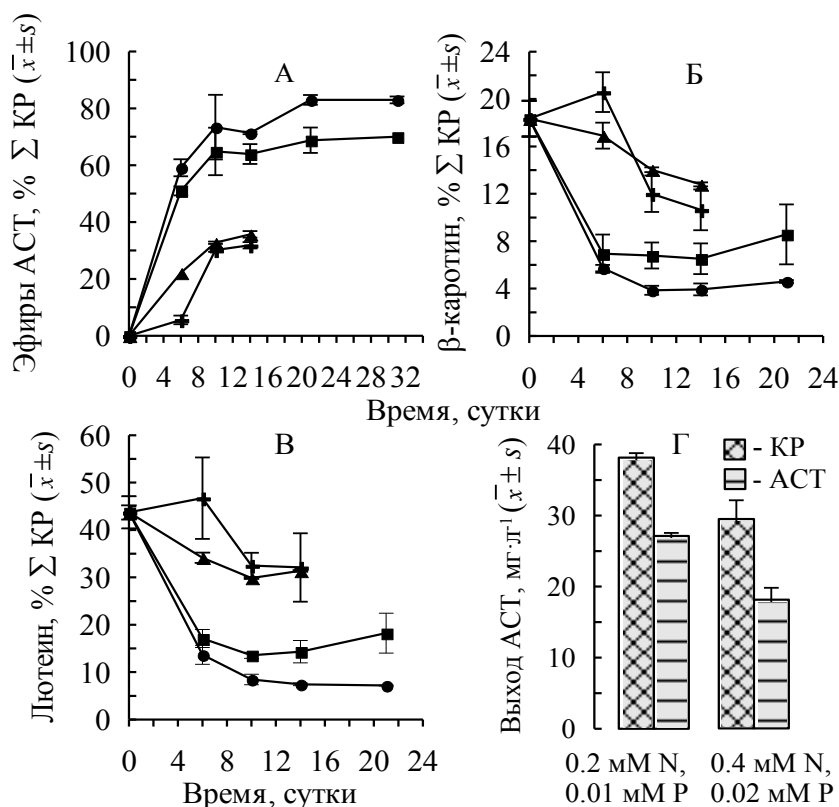


Рис. 5 Динамика фракционного состава каротиноидов в клетках *H. pluvialis* (А - В) и выход астаксантина из литры культуры за 19 сут (Г) в зависимости от условий минерального обеспечения (обозначения, те же, что и на рис. 4)
 Fig. 5 The dynamics of fractional carotenoid composition in *H. pluvialis* cells (А-В) and astaxanthin yield for 19 days (Г) depending on nutrient supply (designations are the same as in the fig. 4)

Известно, что симптомом критического уровня внутриклеточных нитритов является их усиленная экскреция за пределы клеток и накопление в среде [15]. Именно такая картина наблюдалась в вар. 4 на протяжении всего эксперимента (рис. 2), а в вар. 3, начиная с 9-х сут. Для подтверждения справедливости предложенной схемы необходимо провести дополнительное исследование, включающее оценку концентрации NO и интенсивности СР-окисления в клетках водоросли. Вполне вероятно, что аналогичный механизм индукции ВКГ функционирует и в условиях дефицита элементов питания. Источником NO в этом случае могут быть продукты катаболизма белка. Его содержание в АСТ-синтезирующих монадных клетках в вар. 1 и 2 за время культивирования снизилось в 3 и 2 раза, соответственно (табл. 2). Данные, приведенные в табл. 2 и на рис. 6, свидетельствуют о том, что метаболизм АСТ-синтезирующих монадных клеток *H. pluvialis* существенно отличается от метаболизма со-

зревающих апланоспор, интенсивно накапливающих в условиях индуцированного ВКГ запасные вещества.

Табл. 2 Химический состав астаксантин-содержащих монадных клеток *H. pluvialis*
 Tabl. 2 Chemical composition of astaxanthin-containing monad cells of *H. pluvialis*

Вариант	Содержание, мг·кл ⁻¹	Содержание, % СВ
Белок		
инокулят	347.91 ± 14.25	33.87 ± 1.03
1	149.09 ± 9.00	10.94 ± 0.13
2	212.91 ± 5.32	17.13 ± 0.28
Углеводы		
инокулят	234.05 ± 18.29	22.89 ± 1.76
1	518.28 ± 20.83	37.64 ± 2.34
2	440.12 ± 34.95	35.46 ± 3.55
Липиды		
инокулят	363.63 ± 26.01	39.19 ± 6.46
1	264.73 ± 20.44	19.41 ± 0.60
2	211.35 ± 8.97	17.01 ± 0.99

Как нами было показано ранее для этого же штамма, содержание сухого вещества в апланоспорах, аккумулирующих АСТ, увеличивается более чем в 7 раз. При этом запасы углеводов в расчёте на клетку возрастают почти в 15 раз, липидов – в 3.5 раза, а содержание белка остается неизменным [3]. Вегетативные монадные клетки, аккумулирующие АСТ в условиях лимита биогенных элементов, напротив, расходуют внутриклеточные резервы (бе-

лок и липиды) для обеспечения деления и двигательной активности. Возрастание содержания углеводов (\approx в 2 раза) в данном случае может быть связано с существенным утолщением гелеобразной полиглюкановой прослойки между клеточной оболочкой и плазмалеммой красных монад. В результате разнонаправленности динамики основных компонентов СВ его содержание в клетках в течение длительного времени практически не меняется (рис 6 А).

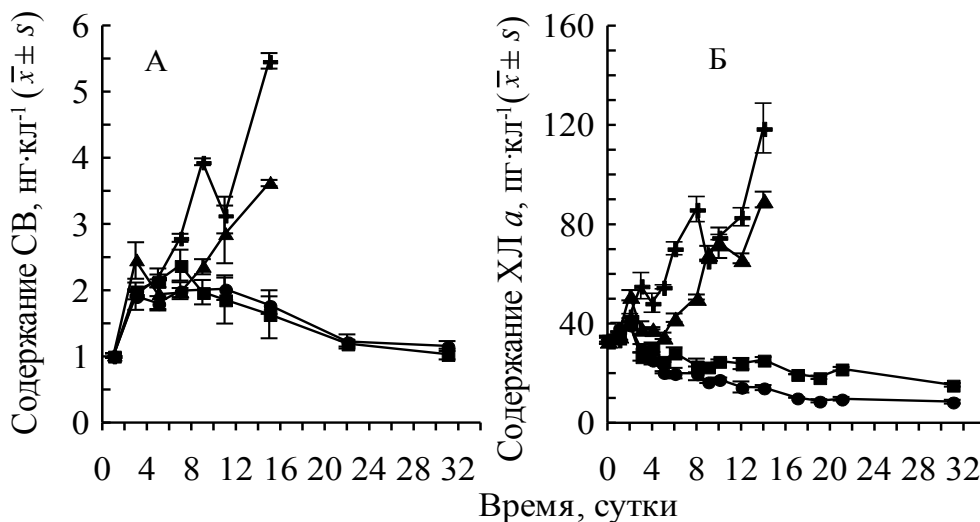


Рис. 6 Динамика содержания сухого вещества (А) и хлорофилла *a* (Б) в монадных клетках *H. pluvialis* в зависимости от условий питания (обозначения те же, что и на рис. 4)
 Fig. 6 The dynamics of dry matter and chlorophyll *a* contents in monad cells of *H. pluvialis* depending on nutrients supply (designations are the same as in the fig. 4)

Общим для ВКГ, протекающего в монадах и апланоспорах, является существенное снижение содержания хлорофилла *a*, наиболее выраженное при остром лимите N и P (вар. 1) (рис. 6 Б). На 31 сут его концентрация в клетках упала до 8.5 ± 0.5 пг·кл⁻¹, что в $\approx 1,5$ раза ниже минимального уровня, зарегистрированного ранее в зрелых апланоспорах штамма IBSS-18 ($10.5 - 13.5$ пг·кл⁻¹) [3].

Выход АСТ из литра культуры монадных клеток (за 31 сут) при остром лимите биогенных элементов (вар. 1) был на 17% выше, чем в вар. 2 (43.6 и 36.19 мг·л⁻¹, соответственно). Сопоставление максимальной продуктив-

ности данного штамма по АСТ в условиях одностадийной полупроточной ($\omega = 0,1$ сут⁻¹) и двухстадийной накопительной культуры при одинаковом времени культивирования (19–20 сут, рис. 5 Г) и начальной численности клеток $3.0 - 3.5 \cdot 10^8$ кл·л⁻¹ показало, что выход АСТ из литра культуры сходен и составляет 27.5 ± 1.4 и 27.1 ± 0.3 мг·л⁻¹, соответственно. Хотя содержание АСТ в расчёте на клетку в зрелых апланоспорах этого штамма почти в 7 раз выше, чем в красных монадах, массовая гибель клеток (40 – 70%) в ответ на индукцию ВКГ ацетатом [3] уравнивает конечный результат. Вместе с тем одностадийный метод культиви-

рования имеет существенные преимущества, так как монадные клетки лишены плотных, трудно разрушаемых оболочек, характерных для апланоспор. Это существенно увеличивает биодоступность АСТ при использовании биомассы для производства нутрицевтиков и кормов, а также снижает расход минеральных солей и затраты электроэнергии на освещение и измельчение биомассы.

Выводы. 1. Резкий отрицательный градиент концентрации N и P в среде в сочетании с увеличением молярного соотношения C:N индуцирует ВКГ в монадных клетках *H. pluvialis*. 2. Необходимым условием сохранения монадной структуры, продолжительного деления клеток и накопления в них АСТ является поддержание минимального уровня азота и

фосфора в среде в пределах 0.2 – 0.4 мМ N и 0.01 – 0.02 мМ P. 3. В условиях ВКГ, индуцированного дефицитом биогенов, метаболизм монадных клеток существенно отличается от метаболизма АСТ-аккумулирующих апланоспор. 4. Высокие затраты белка и липидов на обеспечение деления и двигательной активности не позволяют монадам накапливать АСТ в количествах, сопоставимых с его концентрацией в зрелых апланоспорах. 5. По выходу АСТ метод одностадийной полупроточной ($\omega = 0.1$ сут⁻¹) культуры не уступает традиционной двухстадийной технологии и одновременно с этим обладает такими преимуществами как повышенная биодоступность астаксантина и снижение расходов на производство биомассы.

1. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – 119 с.
2. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Терентьева Н. В. Исследование вторичного каротиногенеза у одноклеточных водорослей // Проблемы биологической океанографии XXI века: Тез. докл. междунар. науч. конф., посвященной 135-летию ИнБЮМ, Севастополь, 19 – 21 сент. 2006 г. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2006. – С. 154.
3. 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.
4. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response // *Physiol. Plant.* – 2000. – 108. – P. 111 – 117.
5. Brinda B. R., Sarada R., Kamath B. S. et al. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* – cultural and regulatory aspects // *Curr. Sci.* – 2004. – 87. – N, 9. – P 1290-1295.
6. Del Campo J. A., García-González M., Guerrero M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – 74, N.6. – P. 1163 – 1174.
7. Del Rio E., Acien F.G., Garcia-Malea M.C. et al.

- Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture // *Biotechnol. Bioeng.* – 2005. – 91, N 7. – P. 808 – 815.
8. Dominguez-Bocanegra A. R., Legarreta I. G. et al. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* // *Biores. Technol.* – 2004. – 92, N. 2. – P. 209 – 214.
 9. Eonseon J., Lee C.-G., Polle J. E. W. Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation and biotechnology // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – 16, N. 6. – P. 821 – 831.
 10. Fábregas J., Otero A., Maseda A et al. Domínguez A. Two-stage cultures for production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* // *J. Biotechnol.* – 2001. – 89. – P. 65 – 71.
 11. Hagen C., Grünewald K., Xyländer M. et al. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* // *J. Appl. Phycol.* – 2001. – 13. – P. 79-87.
 12. Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of green unicellular alga *Haematococcus pluvialis* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – 59, N 3 – P. 867 – 873.
 13. Lee Y.K., Ding S. Y. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) // *J. Phycol.* – 1994. – 30. – P. 445 – 449.
 14. Liaaen-Jensen S., Andrewes A. G. Analyses of carotenoids and related polyene pigments // *Meth.*

- Microbiol. – 1985. – **18**. – P. 235 - 255.
15. Syrett P. J. Nitrogen metabolism of microalgae // Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. - 1981. – **210**. – P. 182 – 210.
16. Yamasaki H. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of ac-

tive nitrogen species in photoinhibition *in vivo* // Phil. Trans. R. Soc. Lond. – 2000. – **355**. – P. 1477-1488.

Поступила 28 мая 2008 г

Особливості вторинного каротиногенезу в вегетативних клітинах *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) при різних умовах мінерального забезпечення. Н. В. Терентьева, Г. С. Минюк, І. В. Дробецька, І. М. Чубчикова. Досліджено вплив концентрації азоту і фосфору в середовищі на швидкість росту і накопичення астаξανтину в вегетативних клітинах зеленої мікроводорості *Haematococcus pluvialis* при вирощуванні методом одностадійної напівпроточної культури. Показано, що необхідною умовою зберігання монадної структури, ділення клітин протягом тривалого періоду і накопичення в них астаξανтину є підтримка мінімального рівня біогенних елементів в середовищі у межах 0.2 – 0.4 мМ N і 0.01 – 0.02 мМ P.

Ключові слова: *Haematococcus pluvialis*, культивування, астаξανтин, азот, фосфор

Features of secondary carotenogenesis in vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) under different conditions of mineral supply. N. V. Terentieva, G. S. Minyuk, I. V. Drobetskaya, I. N. Chubchikova. Influence of nitrogen and phosphorus concentrations in nutrient medium on growth rate and astaxanthin accumulation in vegetative cells of green microalga *Haematococcus pluvialis* under condition of single-stage semi-continuous culture has been investigated. It has been shown that the maintenance of minimum level of biogenic elements in a medium within the limits of 0.2 – 0.4 mM N and 0.01 – 0.02 mM P is necessary for keeping of monad cell structure, long-term cell division and astaxanthin accumulation.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, cultivation, astaxanthin, nitrogen, phosphorus