

НАКОПЛЕНИЕ АСТАКСАНТИНА В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ СВЕТА ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ И АЦЕТАТА НАТРИЯ

Вязов Е.В.¹, Гончарик Р.Г.¹, Куликов Е.А.²

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск,
viazau@yahoo.com

²НИЦ «Курчатовский институт», Россия, Москва

Введение. Кетокаротиноид астаксантин является эффективным природным антиоксидантом. Одним из наиболее перспективных источников астаксантина является микроводоросль гематококк (*Haematococcus pluvialis*), в клетках которой может содержаться до 5% этого каротиноида. Известно, что накопление астаксантина в клетках гематококка происходит в стрессовых условиях, что свидетельствует о его защитной функции.

За последнее десятилетие было опубликовано большое количество исследований, посвящённых индукции накопления каротиноидов, в первую очередь астаксантина, в клетках *Haematococcus pluvialis* и изучению его антиоксидантных свойств. Установлено, что в определенных условиях астаксантин проявляет значительную антиоксидантную активность [3, 8]. Большим преимуществом астаксантина, выделенного из гематококка, по сравнению с искусственно синтезированными аналогами, является его более высокая биологическая активность [1, 2]. В большинстве исследований антиоксидантной активности астаксантин используется в его полностью-транс-изоформе (all-trans) [7, 9, 10]. В то же время, Liu и Osawa показали, что цис-изоформы астаксантина и, в частности, цис-9-изоформа, проявляют более сильное антиоксидантное действие (тушение свободных радикалов, ингибирование перекисного окисления липидов), чем транс-изоформы [6]. Таким образом, при изучении индукции каротиногенеза в клетках гематококка стоит обращать особое внимание на то, какие именно изоформы астаксантина синтезируются при исследуемом воздействии.

В данной работе изучали накопление транс- и цис-астаксантина, а также его жирнокислотных эфиров в клетках *Haematococcus pluvialis* при совместном воздействии света высокой интенсивности и ацетата натрия в питательной среде.

Объект и методы исследования. Объектом исследования выступала альгологически чистая культура одноклеточной зелёной жгутиковой водоросли *Haematococcus pluvialis*. Использовали штамм IBCE H-17 из коллекции водорослей Республиканского центра альгологии при Институте биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси.

Водоросль культивировали 5–7 суток на среде В.Ф. Рудика при освещении люминесцентными лампами Philips TD-36/765 (1,5 клк) с

фотопериодом 14 часов при температуре 23 ± 2 °С. Затем в суспензию вносили исходные растворы ацетата натрия и (в одном варианте) сульфата железа. В итоге получали требуемые концентрации ацетата натрия (1 г/л или 2 г/л) и ионов Fe^{2+} (50 мкМ) в среде. Суспензию помещали под свет высокой интенсивности (освещённость – 9 клк). Через 20 суток клетки из суспензии осаждали центрифугированием, осадок промывали дистиллированной водой и далее хранили перед анализом при -24°C .

Содержание сухого вещества в суспензии определяли по её оптической плотности и рассчитывали по формулам Katsuda et al. [5].

Содержание пигментов определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии [11] с использованием хроматографа Shimadzu Prominence LC 20 и рассчитывали на сухую массу. Отдельно анализировали сапонифицированный с помощью КОН экстракт, в котором весь астаксантин переведён в свободную форму.

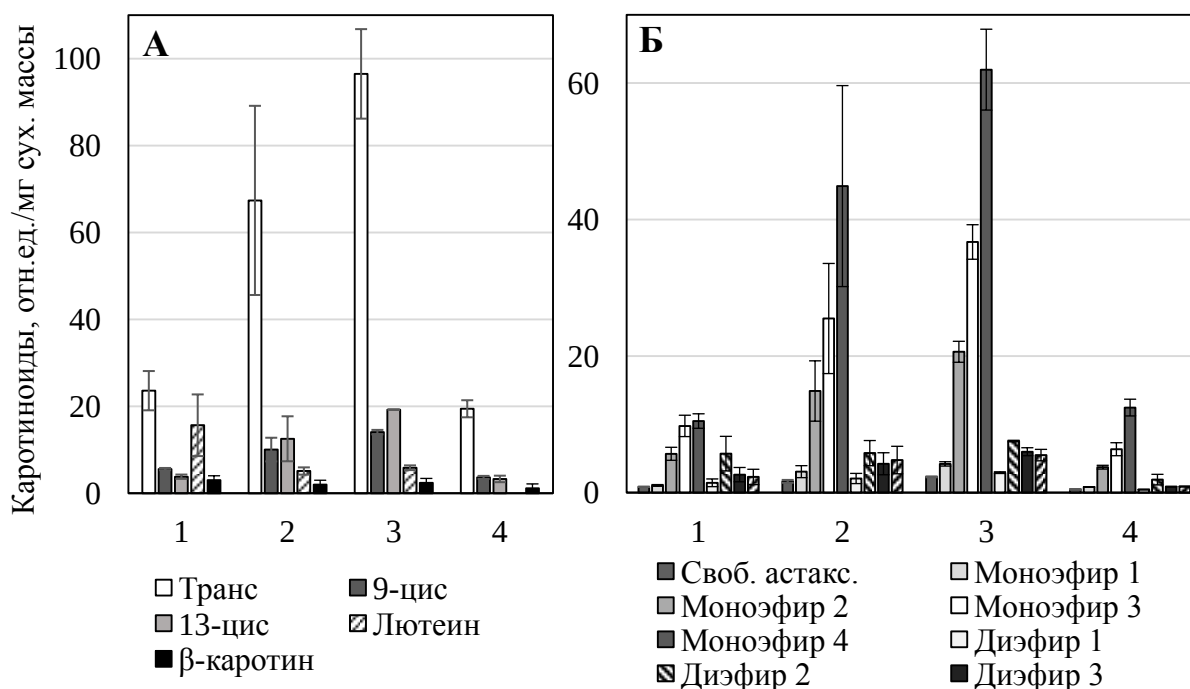
Результаты и их обсуждение. Предварительно был проведён постановочный эксперимент, результаты которого показали, что сочетание действия света высокой интенсивности и добавления ацетата натрия в питательную среду вызывает индукцию накопления астаксантина или каротиногенеза в целом в клетках гематококка. Варианты, наиболее перспективные с точки зрения возможности получения относительно чистых экстрактов астаксантина с малым количеством других каротиноидов, были использованы в данной работе:

- 1) «Контроль» (под светом высокой интенсивности),
- 2) «Свет + ацетат (1 г/л)»,
- 3) «Свет + ацетат (2 г/л)»,
- 4) «Свет + ацетат (2 г/л) + Fe^{2+} (50 мкМ)».

Астаксантин накапливался при добавлении ацетата натрия в питательную среду (рис. 1А). Исключение составил вариант с присутствием в среде 2 г/л ацетата натрия и 50 мМ ионов Fe^{2+} , в котором не наблюдалось накопления астаксантина. Увеличение суммарного содержания астаксантина составило 2,7 и 3,9 раза по сравнению с контролем для вариантов 2 и 3, соответственно. Во всех опытных вариантах наблюдали небольшое (на 11–18%) уменьшение доли цис-изомеров астаксантина по сравнению с контролем, наиболее выраженное в вариантах 2 и 3. Учитывая литературные данные о том, что цис-изоформы астаксантина имеют наибольшую антиоксидантную активность [6], можно предположить, что одной из причин такого уменьшения может быть более активное их потребление в результате нейтрализации активных форм кислорода в указанных условиях индукции накопления астаксантина.

Нам удалось выделить и идентифицировать как моноэфиры, так и диэфиры астаксантина и жирных кислот (рис. 1Б). Показано, что в опытных вариантах увеличивается доля эфирных форм астаксантина. Так, для вариантов 2 и 3 увеличение составило 27% по сравнению с контролем. По-видимому, это

связано с активным накоплением астаксантина, поскольку в ходе этого процесса он аккумулируется в липидных везикулах, где связывается с жирными кислотами. Стоит также отметить увеличение в 2,3–2,5 раза по сравнению с контролем доли моноэфиров астаксантина при добавлении в среду ацетата натрия.



А – сапонифицированный экстракт, Б – исходный экстракт.

Рисунок 1 – Содержание астаксантина и других каротиноидов в клетках *H. pluvialis* после 20 дней инкубации под светом высокой интенсивности в питательной среде, обогащённой ацетатом натрия.

Отметим, что во всех проведённых экспериментах добавление ацетата натрия приводило к увеличению продуктивности водоросли.

Результаты показывают, что ацетат натрия может действовать как индуктор накопления астаксантина в клетках гематококка. Добавление его в питательную среду переводит культуру гематококка в миксотрофный (фотогетеротрофный) режим питания, а также, по-видимому, приводит к увеличению соотношения углерода и азота в среде и, как следствие, к постепенной трансформации клетки в цисту и накоплению астаксантина в ней вследствие снижения потребления азота из питательной среды (эффект, схожий с настоящим дефицитом азота в среде) [4]. Комбинированное действие света высокой интенсивности и ацетата натрия позволяет значительно увеличить накопление астаксантина.

В дальнейшем планируется работа по изучению антиоксидантной активности экстрактов астаксантина из клеток гематококка в системе

окисления хлорофилла, чтобы показать роль разных изоформ и эфиров астаксантина в защите хлорофилла от окисления при воздействии света высокой интенсивности или химического окислителя. Поиск эффективных методов индукции накопления астаксантина в гематококке без активации каротиногенеза в целом имеет также большую практическую значимость с точки зрения упрощения получения препаратов астаксантина для применения в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант №Б19РМ-010) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант №19-54-04003).

Литература

1. Guerin M., Huntley M.E., Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition // Trends in Biotechnology. 2003. V. 21, N 5. P. 210–216.
2. Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2006. V. 46, N 2. P. 185–196.
3. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition // J. Nat. Prod. 2006. V. 69, N 3. P. 443–449.
4. Kakizono T., Kobayashi M., Nagai S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* // J. Ferment. Bioeng. 1992. V. 74. P. 403 – 405.
5. Katsuda T., Shimahara K., Shiraishi H., Yamagami K., Ranjbar R., Katoh S. Effect of flashing light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* // J. Bioscience Bioengineering. – 2006. – Vol. 102, N 5. – P. 442–446.
6. Liu X., Osawa T. *Cis* astaxanthin and especially 9-*cis* astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-*trans* isomer // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007. V. 357. P. 187–193.
7. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids // Pure Appl. Chem. 1991. V. 63. P. 141–146.
8. Naguib Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids // J. Agric. Food Chem. 2000. V. 48. P. 1150–1154.
9. Palozza P., Krinsky N.I. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model / Arch. Biochem. Biophys. 1992. V. 297. P. 291–295.
10. Terao J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution // Lipids. 1989. V. 24. P. 659–661.
11. Yuan J-P., Chen F. Hydrolysis Kinetics of Astaxanthin Esters and Stability of Astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during Saponification. // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. P. 31–35.