

ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА АЗОТА И СВЕТА ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА НАКОПЛЕНИЕ АСТАКСАНТИНА В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

**Самович Т.В., Вязов Е.В., Гончарик Р.Г., Каляга Т.Г., Мананкина Е.Е.,
Козел Н.В.**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск,
samovich77@gmail.com*

Микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) является источником каротиноида астаксантина. Накопление этого пигмента в клетках водоросли происходит при попадании их в неблагоприятные для роста условия: свет высокой интенсивности, дефицит элементов минерального питания, высокая температура и др. [2–4]. В таких условиях клетки *H. pluvialis* переходят в состояние цисты, формирование которой сопровождается редукцией фотосинтетического аппарата, утолщением клеточной стенки и появлением в цитоплазме липидных включений, содержащих астаксантины в форме эфиров с жирными кислотами.

H. pluvialis культивируют в промышленных условиях с целью получить природный астаксантин, активность которого выше синтезированных аналогов. Полученный из водоросли пигмент используют в качестве биологически активных и кормовых добавок, лекарственных препаратов, в косметологии. При культивировании *H. pluvialis* возникает ряд трудностей, включающих низкий выход пигмента, низкую скорость роста, неустойчивость существующих штаммов к контаминациям [3, 5]. В связи с этим усилия ученых направлены на получение новых штаммов и исследование возможности увеличить количество накапливаемого астаксантина, создавая условия с разными комбинациями и интенсивностью стрессовых факторов [2, 3, 6, 7, 9, 10].

В ряде работ показано, что свет высокой интенсивности в сочетании с азотным голоданием вызывают существенное увеличение содержания астаксантина в клетках *H. pluvialis* [2, 10]. Однако во всех подобных исследованиях азотное голодание инициировали на стадии активного роста культуры, что приводило к полному прекращению деления клеток и, соответственно, увеличения биомассы водоросли [2, 10]. Существенно более эффективной с точки зрения выхода астаксантина является схема индукции каротиногенеза, состоящая из двух стадий. На первой стадии (стадия активного роста) добиваются максимального прироста биомассы водоросли при нормальных условиях культивирования с последующим переходом клеток в неподвижное состояние. На второй стадии (стадия покоя) выносят полученную культуру на свет высокой интенсивности для индукции накопления астаксантина в клетках водоросли. В данной работе в дополнение к действию

света высокой интенсивности на второй стадии мы инициировали азотную недостаточность.

В работе использовали альгологически чистую культуру одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм ИВСЕ Н-17, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [1]. Клетки гематококка, взятые из альгологической коллекции, стерильно пересевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ВВМ [8], подращивали на свету в течение 7–10 сут при температуре 23 ± 2 °С, после чего смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика [7] и выращивали в накопительном режиме при освещении светом люминесцентных ламп Philips TD-36/765, освещенности 1500 лк и режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре в световом периоде 23 ± 2 °С. Через 7 сут выращивания суспензию гематококка, содержащую около 80 % неподвижных клеток, использовали в экспериментах. При этом часть клеток переводили на свежую среду Рудика, другую – на среду Рудика без азота и культивировали оба варианта при нормальном освещении (1500 лк) и освещении высокой интенсивности (10000 лк). При постановке эксперимента и через 21 сутки культивирования определяли количество клеток в суспензии, их размер и содержание астаксантина. Количество клеток в культуре водоросли оценивали при помощи камеры Горяева. Диаметр клеток гематококка определяли с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2, используя программное обеспечение NIS-Elements Advanced Solutions v. 4.40 (Nikon, Япония). Количество астаксантина в клетках гематококка определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия) и спектрофотометрического детектора с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония).

Установлено, что через 21 сутки эксперимента количество клеток в суспензии снижалось во всех вариантах. Более значительное снижение отмечено в вариантах на полной среде Рудика вне зависимости от интенсивности освещения (рис. 1). В этих же вариантах наблюдали увеличение диаметра клеток, что является признаком стрессового состояния клеток водоросли [5]. В вариантах на среде Рудика без азота количество клеток несколько снижалось, но диаметр не изменялся, по сравнению с начальным значением.

В исходной культуре (начало эксперимента) были зарегистрированы следовые количества астаксантина. Однако после 21 суток культивирования в вариантах на полной среде Рудика как на ярком свету, так и при нормальном освещении выявлено значительное накопление астаксантина в клетках *H. pluvialis* (рис. 2). В вариантах опыта, полностью лишенных азота, содержание астаксантина

было существенно ниже (более чем в 5 раз) по сравнению с вариантами на полной среде Рудика независимо от интенсивности освещения.

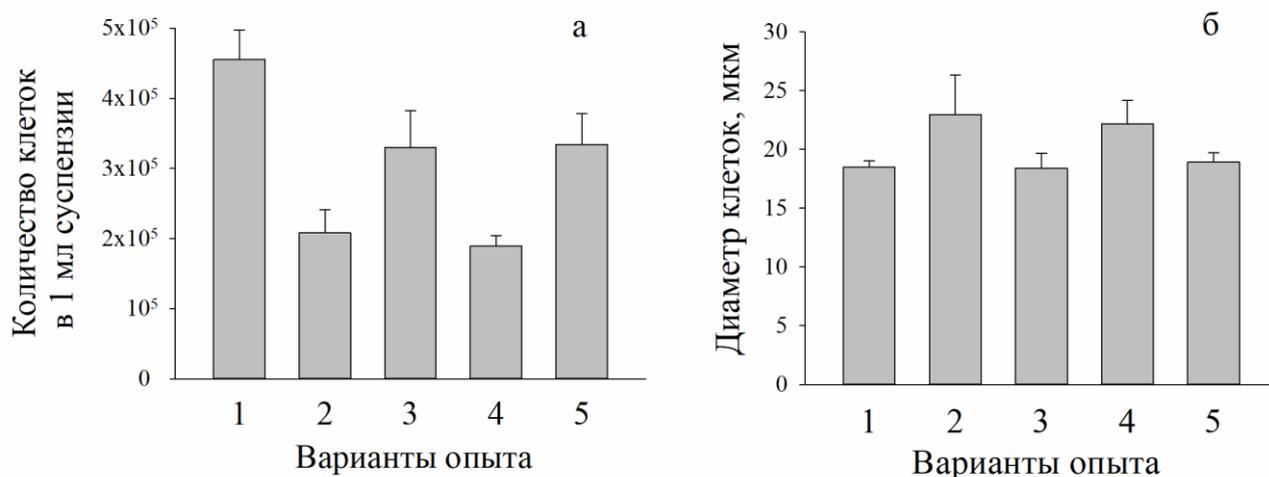


Рисунок 1 – Количество (а) и диаметр (б) клеток *H. pluvialis* в начале (1) и через 21 сутки (2–5) эксперимента на полной среде Рудика (1, 2, 4) и среде Рудика без азота (3, 5) при освещенности 1500 лк (2, 3) и 10000 лк (4, 5)

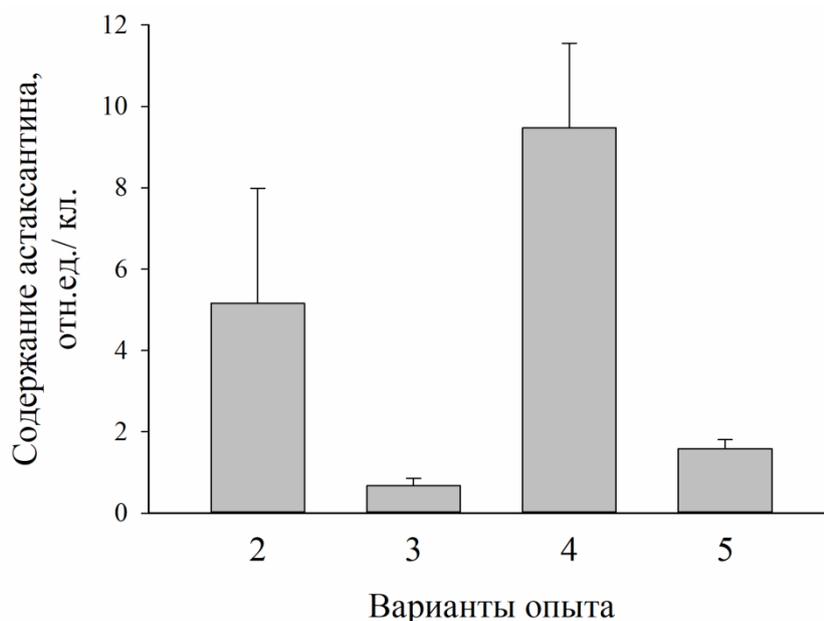


Рисунок 2 – Количество астаксантина в клетках *H. pluvialis* через 21 сутки эксперимента на полной среде Рудика (2, 4) и среде Рудика без азота (3, 5), при освещенности 1500 лк (2, 3) и 10000 лк (4, 5)

Таким образом, азотная недостаточность, инициированная на стадии покоя *H. pluvialis*, не является эффективным стрессовым фактором в сочетании со светом высокой интенсивности для индукции астаксантина в клетках водоросли. При этом важно отметить, что количества астаксантина в клетках *H. pluvialis*

при отсутствии азота были ниже, чем в вариантах с использованием полной среды Рудика независимо от интенсивности освещения. Этот факт указывает на необходимость наличия некоторого количества азота в среде для функционирования системы синтеза астаксантина, что подтверждается литературными данными [9].

Литература

1. Мельников С.С. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С.С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2011. 101 с.
2. Dong Q. et. al. Concomitant NH_4^+ Secretion during astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* under high irradiance and nitrogen deficient conditions // Chinese Journal of Chemical Engineering. 2007. Vol. 15. P. 162–166.
3. Han D., Li Y., Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications // Algae. 2013. Vol. 28. P. 131–147
4. Imamoglu A., Conk Dalay M., Vardar Sucan F. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis* // New biotechnology. 2009. Vol. 26. P. 199–204.
5. Kakizono T., Kobayashi M., Nagai S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* // J. of fermentation and bioengineering. 1992. Vol. 74. P. 403–405.
6. Kobayashi M., Kakizono T., Nishio N., Nagai S. Effect of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* // J. of fermentation and bioengineering. 1992. Vol. 74. P. 61–63.
7. Mamoglu E., Conk Dalay M., Fazilet S.-V. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of Astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis* // New Biotechnology. 2009. Vol. 26. P. 199–204.
8. Nichols, H. W. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. / H.W. Nichols, H.C. Bold // J. of Phycology. 1965. Vol. 1. P. 34–38.
9. Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* // Bioresource technology. 2005. Vol. 96. P. 373–378.
10. Scibilia L. et. al. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis* // Algal Research. 2015. Vol. 12. P. 170–181.