СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НАКОПЛЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ ШТАММАМИ IBSS-1 И IBSS-2*DUNALIELLASALINA* TEOD. В ИНТЕНСИВНОЙ КУЛЬТУРЕ

А. Б. БОРОВКОВ, И. Н. ГУДВИЛОВИЧ
Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского,
пл. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ,
e-mail: spirit2000@ua.fm; gudirina2008@yandex.ru

The specialty of the carotenoids accumulation of the two strains of Dunaliella salina on the 2nd stage of mass cultivation were studied. During experiments the illumination of cultivators' working surfaces was varied – 200 and 80 Watt·м$^{-2}$, as well as the temperature – 35 ° and 28 ° C, and the concentration of sea salt – 240 and 120 g ·dm^{-3}. It was experimentally shown that the investigated strains respond differently to the influence of stress factors, what is proved by different contents of β-carotene in the cells of microalgae. The need to take the genetic characteristics of strains into account within the selection for their industrial production was underlined.

Ключевые слова: β-каротин, D. salina, стрессовые факторы, штаммы

Введение

Общеизвестно, что *D. salina* в определенных условиях способна к гиперсинтезу β-каротина. Его содержание может достигать более 10 % от сухой массы водорослей, что является наиболее высоким показателем по сравнению с другими продуцентами β-каротина. Это позволяет считать микроводоросль *D. salina* наиболее перспективным источником β-каротина для биотехнологической промышленности [6, 10, 11, 12].

В современной научной литературе широко представлены результаты исследования накопления β-каротина в клетках *D. salina* в различных условиях её культивирования. По литературным данным основными стрессовыми факторами для индукции гиперсинтеза β-каротина признаны: дефицит элементов минерального питания, повышенный уровень освещённости и солёности. Кроме того, необходимо учитывать генетические особенности различных штаммов данного вида [2, 5, 6, 10, 11, 13].

Представленные сведения очень разнородны, не систематичны и, иногда, противоречивы, кроме того, практически отсутствуют данные для интенсивных культур *D. salina*. Таким образом, исследование влияния различных физико-химических факторов среды на накопление β-каротина различными штаммами *D. salina* остается актуальным и в наши дни.

Материалы и методы

Объект исследования – зеленая эвригалобная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (штаммы IBSS-1 и IBSS-2) из коллекции культур ИнБЮМ.

Установка для культивирования микроводорослей состояла из шести стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа объемом 6 л с рабочей толщиной 5 см, осветителя – лампы ДРЛ-700, термостабилизирующей и газораспределительной систем. Объем суспензии в каждом культиваторе поддерживали на уровне 5 л.

Эксперимент проводили в два этапа: первоначально культуру *D. salina* выращивали в накопительном режиме на модифицированной питательной среде по Тренкеншу [9], при приготовлении которой использовали морскую соль до концентрации в растворе 120 г·дм$^{-3}$ [1]. Первый этап культивирования длился до стационарной фазы роста и исчерпания в среде элементов минерального питания. На этом этапе освещенность рабочей поверхности культиваторов составляла – 80 Вт/м^2, температура – 26–28 °С, pH культуральной среды – 6–7 единиц. В процессе выращивания культура непрерывно снабжалась газо-воздушной смесью с концентрацией углекислоты 3 % по объему.

Далее, выросшую биомассу распределяли по экспериментальным культиваторам, таким образом, чтобы плотность культуры была одинаковой (эксперимент 1, табл. 1) или так, чтобы в одном из них плотность культуры была в 10 раз ниже (эксперимент 2,табл. 2).

Таблица 1.

Условия проведения эксперимента 1 (штамм IBSS-2)

Параметры	Варианты эксперимента					
	1	2	3	4	5	6 (контроль)
Начальная плотность культуры, г·дм$^{-3}$	2,1±0,2	2,1±0,2	2,1±0,2	2,1±0,2	2,1±0,2	2,1±0,2
Концентрация морской соли, г·дм$^{-3}$	240	120	120	120	240	120
Поверхностная освещённость, Вт·м$^{-2}$	200	80	80	200	80	80
Температура, °С	35	28	35	28	35	28
Дополнительные элементы мин. Питания	N, P, МЭ	N, P, МЭ	–	–	–	–

Таблица 2.

Условия проведения эксперимента 2 (штамм IBSS-1)

Параметры	Варианты эксперимента					
	1	2	3	4	5	6 (контроль)
Начальная плотность культуры, г·дм$^{-3}$	4,8±0,2	4,8±0,2		4,8±0,2	4,8±0,2	4,8±0,2
Концентрация морской соли, г·дм$^{-3}$	240	240	120	120	120	120
Поверхностная освещённость, Вт·м$^{-2}$	200	80	80	200	80	80
Температура, °С	35	28	28	28	35	28
Дополнительные элементы мин. Питания	N, P, МЭ	–	N, P, МЭ	–	–	–

Разбавление культуры в 10 раз (эксперимент 2, вариант 3) проводили для повышения средней пространственной облученности клеток примерно в 10 раз, так как повышение поверхностной освещённости свыше 200 Вт/м^2 было сопряжено с техническими трудностями.

На этой стадии экспериментов варьировали освещенность рабочей поверхности культиваторов – 200 и 80 Вт/м^2, температуру – 35 и 28 °С, концентрацию морской соли – 240 и 120 г·дм$^{-3}$. Кроме того, в некоторые культиваторы дополнительно вносили элементы минерального питания (см. табл. 1, 2), что по литературным данным способствует адаптации культуры к стрессовым условиям среды и снижает процент отмерших клеток [8]. При проведении экспериментов в соответствующие варианты вносили 0,059 г N/л, 0,012 г P/л и микроэлементы в количестве, соответствующем прописи среды по Тренкеншу [9].

Плотность культуры, а также содержание сухого вещества (СВ) определяли объемно-весовым [9], а также фотометрическим методами [1, 7]. Определяемые показатели химического состава выражали в пересчете на органическое вещество (ОВ). Массовую долю зольного остатка в сырой биомассе микроводорослей определяли путем предварительного высушивания навесок при 105 °С в течение 24 ч и последующего сжигания в муфельной печи при t = 500 °С до постоянного веса [7]. Содержание суммарных ка-

ротиноидов определяли спектрофотометрическим методом [7]. Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном. Спектры экстрактов пигментов промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0,1 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным Wellburn [15] по значениям оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов.

Результаты и обсуждения

За время эксперимента со штаммом IBSS-2 относительное содержание каротиноидов в клетках дуналиеллы постепенно увеличивалось, их содержание для большинства культиваторов к 21–27 суткам повысилось в 2–3 раза по сравнению с начальным значением (рис. 1 А). Самым неэффективным по сравнению с другими оказалось влияние температурного фактора (вариант 3), содержание каротиноидов при воздействии субоптимальной температуры увеличилось на 50–70 %. Относительное содержание каротиноидов под действием факторов повышенной освещённости и комбинации солёности и субоптимальной температуры было аналогичным и на 42-е сутки соответствовало содержанию их в контроле. Для этих же вариантов эксперимента содержание хлорофилла *a* в клетках *D. salina* в этот период (1–2 % ОВ) и цвет культуры соответствовали «зелёной форме» микроводоросли.

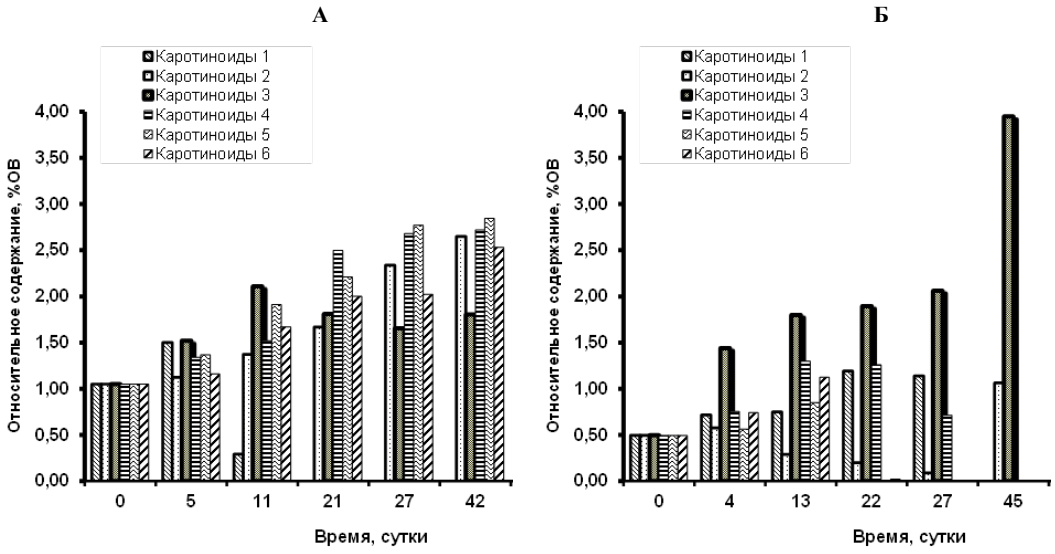


Рис. 1. **Динамика относительного содержания каротиноидов. А – штамм IBSS-2. Б – штамм IBSS-1.**

Показано, что действие стрессовых факторов вызывает накопление β-каротина у штамма IBSS-1, но в различной степени. Самым неэффективным оказалось повышение солености (вариант 2). Данный фактор вызвал повышение содержания β-каротина на 30% от начального на 4-е сутки. В варианте одновременного действия всего комплекса исследуемых факторов (№ 1) и варианте повышения освещенности в 2,5 раза (№ 4) наблюдался рост содержания в клетках β-каротина на 50% от начального на 22-е сутки. Действие субоптимальной температуры не вызывало существенного накопления β-каротина (вариант 5), но приводило к быстрому отмиранию культуры.

Таким образом, показано что повышение температуры до субоптимального уровня требуется применять для активации каротиногенеза с осторожностью, так как вероятно снижение, как относительного содержания пигментов, так и плотности культуры (вплоть до гибели последней).

Опыт со штаммом IBSS-1 продлился 1,5 месяца. И к концу эксперимента живая культура сохранилась только в 2-х вариантах: с повышенной соленостью и разбавлением культуры в 10 раз. В варианте с повышенной концентрацией соли относительное содержание каротиноидов сначала снизилось в 5,5 раза (от 0,5 до 0,09 %ОВ), а затем выросло в 11 раз (от 0,09 до 1,06 %ОВ). Это свидетельствует, по-видимому, об адаптации культуры в этом варианте к заданным экстремальным условиям среды, но по сравнению с начальным значением содержание пигментов увеличилось только в 2,1 раза. Наиболее действенным оказался фактор разбавления. Это фактор, приводящий к повышению облученности культуры. Кроме того, в культиватор с разбавленной культурой дополнительно вносили элементы минерального питания для повышения адаптационных возможностей культуры и снижения количества отмерших клеток [8]. Таким образом, наиболее значительное увеличение относительного содержания каротиноидов наблюдалось для варианта 3, главным отличием которого от остальных вариантов была повышенная в 10 раз облучённость клеток. Именно этот фактор вызвал резкое увеличение содержания каротиноидов в 8 раз по сравнению с первоначальным, и их содержание достигло на 45-е сутки максимальных значений в данном эксперименте – около 4% ОВ.

Следует отметить, что штамм IBSS-2 более устойчив к воздействию стрессовых факторов: пять из шести вариантов опыта были жизнеспособными около 1,5 месяцев. Данный штамм в интенсивной культуре содержит в 2 раза больше каротиноидов (1 %ОВ), чем IBSS-1 (0,5 %ОВ) [2, 3]. Любой из действующих факторов (кроме температурного) вызывает накопление каротиноидов в клетках микроводоросли. Причем воздействие по отдельности повышенной освещенности, солености и микроколичеств

биогенных элементов (азот, фосфор и микроэлементы) вызывают рост относительного содержания пигментов в 2,5-2,7 раза, что незначительно выше (на 4-11%) накопления каротиноидов в контрольном варианте. Всё вышеперечисленное свидетельствует о большей устойчивости штамма IBSS-2 к стрессовым воздействиям среды и большей «предрасположенности» (вероятно генетической) к накоплению каротиноидов. Как известно, каротиноиды являются протекторными пигментами и участвуют в функциональном ответе на любое стрессовое воздействие [3, 4]. Способность культуры к гиперсинтезу каротиноидов, которая обуславливает её устойчивость к стрессу, позволит с меньшими потерями и более надежно получать конечный продукт в условиях промышленного производства. Таким образом, необходимо учитывать генетические особенности используемых штаммов микроводорослей при организации промышленного биотехнологического производства.

Выводы

Экспериментально показано, что в условиях интенсивной культуры *D. salina* штамм IBSS-1 накапливает до 1,5 %ОВ, а IBSS-2 – до 2,8 %ОВ. Штамм IBSS-2 характеризуется повышенным относительным содержанием каротиноидов по сравнению с IBSS-1 и более устойчив к воздействию стрессовых факторов. Предварительные экспериментальные данные показывают, что разбавление культуры в 10 раз способствует значительному увеличению накопления каротиноидов (до 4 %ОВ вместо 1,5 %ОВ).

Список литературы

1. Боровков А. Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Teod.: автореф. дисс… канд. биол. наук: спец. 03.00.17. – Севастополь, 2008. – 28 с.
2. БоровковА. Б. *Dunaliella salina* Teod. IBSS-2 – перспективний штам для промислового культивування / А. Б. Боровков, І. М. Гудвілович, Р. П. Тренкеншу // Актуальні проблеми ботаніки та екології: зб. наук. праць. – Київ, 2008. – Вип. 2. – С. 25–27.
3. Гудвилович И. Н., Боровков А. Б. Ростовые и биохимические показатели квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* // Біотехнологія. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 105 – 111.
4. Дробецкая И. В. Влияние условий минерального питания на рост и химический состав *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler: автореф. дисс…канд. биол. наук: спец. 03.00.17. – Севастополь, 2005. – 26 с.
5. Ефремова Н. Разработка способов получения антиоксидантных препаратов на основе биоактивных веществ цианобактерий и микроводорослей: Автореф. дис. … докт. биол. – Кишинёв, 2009. – 29 с.
6. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod. – К. : Наук. думка, 1973. – 487 с.

7. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев : Наук. думка, 1975. – 247 с.
8. Терентьева Н. В., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. Особенности вторичного каротиногенеза в вегетативных клетках *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) при различных условиях минерального обеспечения // Мор. Экол. Журн. – 2008. –Т. 7, № 4. – С. 66–74.
9. Тренкеншу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: Автореф. дис. … канд. биол. наук. – Красноярск, 1984. – 28 с.
10. Ben-Amotz A. New mode of Dunaliella biotechnology: two-phase growth for β -carotene production // J. of Appl. Phycol. – 1995. – Vol. 7. – P. 65– 68.
11. Ben-Amotz A., Shaish A., Avron M. Mode of action of the massively accumulated β-carotene of *Dunaliella bardawil* in proteting the algae aqainst damaqe by excess irradiation // Plant. Physiol. – 1989. – Vol. 91, No 3. – P. 1040–1043.
12. García-González M., Moreno J., Cañavate J. P. et al. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain // J. Appl. Phycol. – 2003. – Vol. 15. – P. 177–184.
13. Lamers P. P., Van de Laak C. C.W., Kaasenbrood P. S. et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina* // Biotechnol. and Bioeng. – 2010. – Vol. 106, No 4. – P. 638–648.
14. Lee Y.K. Microalgae mass culture system and methods: Their limitation and potential // J. Appl. Phycol. – 2001. – Vol. 13. – P. 307–315.
15. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Phys. – 1994. – Vol. 144. – P. 307–313.