

**ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA SALINA* ПРИ ЛИМИТИРОВАНИИ УГЛЕРОДНОГО ПИТАНИЯ**

В результате исследования динамики суммарных липидов в клетках морской микроводоросли *Dunaliella salina* (Dunal) Teod. в квазинепрерывной культуре отмечено изменение концентрации суммарных липидов в 8 раз на фоне изменения биомассы в 1,5 раза. Динамика изменения концентрации липидов, была сходна с динамикой содержания клеток культуры и зависела от обеспеченности углеродным питанием

За последние 20 лет водоросли стали перспективным объектом биотехнологии [3]. В процессе жизнедеятельности они синтезируют и накапливают разнообразные биологически активные вещества, многие из которых, в частности витамины, липиды, белки, углеводы, являются ценными пищевыми и фармакологическими продуктами.

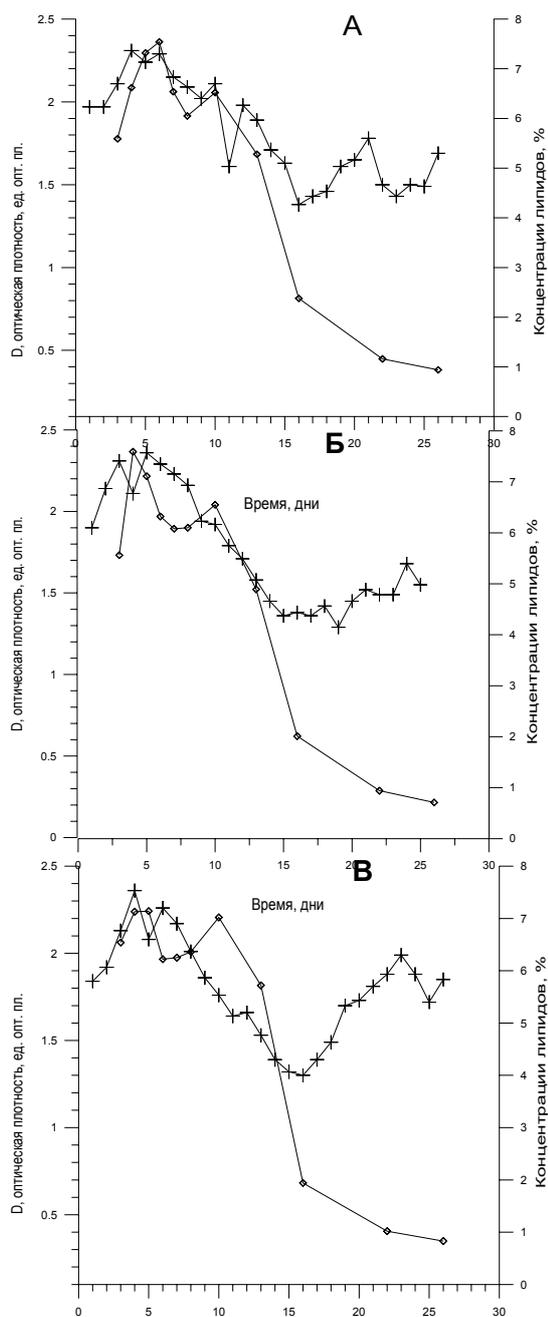
Липидная фракция представлена нейтральными жирами, жирowymi кислотами и жироподобными веществами – липоидами и стеролами. Часть липидов (около 1 % от сухого вещества) образует сложные соединения с белком, которые являются основным структурным элементом клетки [2]. Липиды - самые эффективные источники сохранения энергии, выполняют барьерную функцию как изоляторы внутренних компонентов клетки, играют важную роль как структурные элементы большинства клеточных мембран, и обеспечивают устойчивость к разным физиологическим стрессам [10]. Изучение условий культивирования микроводорослей, в том числе *Dunaliella salina*, с целью получения максимальных концентраций данных компонентов - актуальная задача сегодняшнего дня. Известно, что 27,61 % органической массы *D. salina* представлено липидами. В составе липидов обнаружено свыше 20 жирных кислот [6], а среди них преобладают ненасыщенные соединения, которые делают *D. salina* ценным объектом биотехнологии.

В данной работе представлены результаты изучения динамики концентрации липидов *D. salina* в режиме квазинепрерывной культуры при лимитировании углеродного питания.

**Материал и методы.** Объектом исследования была культура *Dunaliella salina* выращиваемая в отделе биотехнологии и фиторесурсов ИнБЮМ НАНУ. Описание системы для культивирования микроводорослей и условий культивирования приводятся в [4, 5]. Водоросли культивировали в режиме квазинепрерывной культуры. В качестве питательной среды использовали среду Тренкеншу [7].

Концентрирование биомассы проводили центрифугированием. Пасту водорослей высушивали до воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при 45° С. Для определения липидов, брали навеску массой 15 – 20 мг экстрагировали смесью хлороформ:метанол в соотношении 2:1 (реактив Фолча). Далее определение суммарных липидов проводили калориметрически по методу, предложенному Агатовой Л. И. [1] с некоторыми модификациями. Для определения липидов брали 0,1 – 0,2 мл смеси и упаривали её на кипящей водяной бане. Затем добавляли 0,2 мл серной кислоты, выдерживали на бане 10 мин. Пробирки охлаждали, прибавляли 1 мл фосфованилинового реактива, тщательно перемешивали и ставили на кипящую водяную баню ещё на 15 мин. После этого содержимое пробирок охлаждали и калориметрировали на приборе КФК-3 при  $\lambda = 540$  нм,  $l = 1$  см. Замеряли против холостой пробы. Холостая проба - все реактивы без аликвоты смеси. Содержание липидов рассчитывали по калибровочному графику.

**Результаты и обсуждение.** Изменения концентрации липидов *Dunaliella salina* показаны на рис. 1.



**Рисунок 1. Динамика концентрации липидов в процессе роста культуры в культиваторах: А - № 1; Б - № 2; В - № 3**

+ - оптическая плотность культуры

○ - концентрация липидов

**Figure 1. Changes in lipid concentration during growth of culture cultivators: А - № 1; Б - № 2; В - № 3**

+ - optical density culture; ○ - concentration lipids

В ходе эксперимента было выявлено увеличение концентрации липидов на 4 – 6-е сутки и её понижение с 10-х суток. Изменение концентрации липидов совпало с периодом активного роста.

В условиях полного минерального обеспечения, позволяющего культуре давать неограниченный рост, в качестве лимитирующего звена выступает обеспеченность клеток светом или структура фотосинтетического аппарата. На 4-е сутки плотность культуры достигла максимальных значений; возможно, свет был фактором, лимитирующим рост в результате самозатенения клеток в данном режиме [5].

До 4-го дня отмечалось стойкое возрастание плотности культуры, чему способствовала постоянная подача углекислоты, но, несмотря на это, потребность в углеродном питании оставалась высокой. Вероятно, фактором, лимитирующим рост, выступает углекислота, что способствовало накоплению липидов. Известно, что ограничение углеродного питания сопровождается процессом накопления липидов [8, 9].

Далее в культиваторах отмечали понижение оптических плотностей биомассы культур в связи с тем, что на 4-й день режим подачи углекислоты был изменён на периодический. Осуществляли 4-х разовую подачу углекислоты в течение дня по 30 мин. Поэтому с 5-го дня наблюдали падение значения рН культуры до 7 - 7,5. Данный режим поддерживали до 20-х суток, и на указанном временном отрезке наблюдали понижение продуктивности культуры. В этот период было зарегистрировано снижение концентрации липидов в биомассе культивируемых микроводорослей. Содержание липидов резко понижалось до минимальных значений и достигало минимума на 26-ой день.

Итак, в нашем эксперименте мы наблюдали повышение количества липидов в период активного роста с максимумом концентрации на 4 – 6-е сутки после перехода на периодический режим подачи углекислоты. Затем концентрация липидов понижалась, возможно, из-за того, что углекислота в данный период не являлась лимитирующим фактором.

Таким образом, динамика изменения концентрации липидов, совпадала с динамикой роста клеток в культуре, данный факт может быть объяснён высокой взаимосвязью липидов и белка. В культивируемых микроводорослях белок составляет до 57 % сухого веса биомассы. В связи с тем, что целью культивирования микроводорослей является получение биомассы, клетки которой будут содержать ценные биологически активные вещества, решение этой проблемы может быть только комплексное и связанное с управлением процессов культивирования.

**Выводы 1.** В период роста квазинепрерывной культуры *D. salina* отмечено изменение концентрации липидов в 8 раз на фоне изменения биомассы в 1,5 раза. **2.** Динамика изменения концентрации липидов, сходна с динамикой количества клеток культуры и зависит от обеспеченности углеродным питанием.

1. Агатова Л. И. Рекомендации по определению биохимического состава различных форм органического вещества в морских водах. - М., 1983. - С. 30 – 33.
2. Бекер М. Е. Обезвоживание микробной биомассы и экстрацеллюлярных метаболитов. - Рига: Зинатне, 1967. - С. 74 – 77.
3. Божков А. И., Мензянова Н. Г. Динамика роста, липидный состав и содержание β-каротина в клетках *Dunaliella viridis* Teod. при культивировании в разных типах фотореакторов // Альгология. - 1997. - 7, № 1. - С. 78 – 86.
4. Геворгиз Р. Г., Шахматов А. П. Установка для культивирования микроводорослей // Экология моря. 2005. - вып. 67. - С. 44 – 47.
5. Гудвилович И. Н., Береговая Н. М., Боровков А. Б. Динамика суммарных каротиноидов и хлорофилла-а в клетках *Dunaliella salina* в квазинепрерывной культуре // Экология моря. - 2005. - Вып. 67. - С. 52 – 55.
6. Масюк Н. П. Морфология, систематика, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы его практического использования - К.: Наук. думка, 1973. - С. 61 – 62.
7. Тренкениц Р. П., Белянин В. Н., Сидько Ф. Я. Модель светозависимого роста морских микроводорослей (с учетом фотоингибирования). - Красноярск: ИФСО, 1981. - 63 с. - (Препринт. № 18 Б)
8. Butow B., Wynne D., Sukenik A. et al. The synergistic effect of carbon concentration and high temperature on lipid peroxidation in *Peridinium gatunense* // J. Plankton Research. - 1998. - 20, No. 2. - P. 355 – 369.
9. Skorokhod T. F., Tupik N. D., Chernya V. F. Dependence of lipid composition of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. (Cyanophyta) in the mode of energetic existence of culture from photoautotrophy to chemoheterotrophy // Algologiya, 1996. - 6, No. 3. - P. 235 – 241.
10. Suresh C. Singh, Rajeshwar P. Sinha, Donat P. Hader. Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria // Acta Protozool. 2002, 41. - P. 297 – 308.

Институт биологии южных морей НАН Украины,  
г. Севастополь

Получено 05.05.2005

I. A. KHARCHUK, Y. P. KORITOV

#### DYNAMICS OF LIPID CONCENTRATION IN *DUNALIELLA SALINA* CELLS IN CONDITIONS OF LIMITED CARBON FEED

##### Summary

Dynamics of total lipid in microalga *Dunaliella salina* (Dunal) Teod. cells in semicontinuous culture are studied. The change of total lipid concentration in 8 times on a background of biomass change in 1,5 times has been marked. Changes of lipid concentration were similar to dynamics of culture cells maintenance and depended on a carbon feed security.