

ДИНАМИКА ЛИПИДНОГО СОСТАВА В КЛЕТКАХ *SPIRULINA PLATENSIS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЕГИДРАТАЦИИ

Исследован липидный состав *Spirulina platensis* (Nordst) Geitler и выявлена динамика фракционного состава в зависимости от температуры дегидратации. Зарегистрировано, полное отсутствие триацилглицеридов не зависимо от температуры дегидратации. При увеличении температуры дегидратации до 70°C наблюдали резкое увеличение содержания суммарных липидов в 2 раза. Липидные экстракты цианобактерий разделились следующим образом: температура дегидратации 30°C только фосфолипиды, 60°C - фосфолипиды, ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты, 70°C – фосфолипиды и ненасыщенные жирные кислоты.

Липиды выполняют важную биологическую роль в организмах, они являются структурными компонентами мембран, служат формой депонирования запасов метаболического топлива и выполняют защитную роль.

К собственно липидам относят наиболее часто встречающиеся в живых организмах простые (триацилглицериды, стерины, воска) и сложные липиды (фосфо-, глико-, и сфинголипиды). Качественный состав липидов, выделенных из разных растительных организмов, примерно одинаков, но соотношение отдельных фракций в них заметно различается [5].

Липиды играют жизненно важную роль в устойчивости цианобактерии к различным физиологическим стрессам. Устойчивость к высушиванию обеспечивают фосфолипиды. Мембрана состоит из бислоя липидных молекул, которые повернуты друг к другу гидрофобными концами, они жестко не закреплены и постоянно меняются местами в пределах одного монослоя или путем перестановки двух липидных молекул из разных монослоев. В жидкие слои липидов погружены специализированные белковые комплексы. Белки и липиды взаимосвязаны в мембране непостоянно и образуют подвижную, гибкую, временно связанную в единое целое структуру, способную к структурным перестройкам [2, 7].

Ненасыщенные жирные кислоты также защищают микроорганизмы от осмотического стресса. Водородные атомы, находящиеся у двойных связей, восприимчивы к окислению. Липиды, богатые этими связями, являются начальным звеном перекисного окисления, образующиеся при этом вещества являются высокоактивными и способны модифицировать белки и ДНК [11].

Цель данной работы – исследовать динамику липидного состава в клетках *Spirulina platensis* в зависимости от температуры дегидратации.

Материал и методы. Объектом исследования была культура *S. platensis* (штамм IBBS – 31), выращиваемая в отделе биотехнологии и фиторесурсов ИнБЮМ НАН Украины [1].

Водоросли культивировали в накопительном режиме, при постоянном круглосуточном освещении и автоматическом перемешивании с использованием насоса для удаления избытка кислорода из среды и равномерного прогрева всего слоя питательного

раствора культуры. Интенсивность света на поверхности раствора составляла 8 кЛк. Температура среды колебалась в диапазоне 20 - 25°C.

В качестве питательной среды использовали среду Заррука [9]. Выращивали водоросли в двухлитровых стаканах. Объем среды в культиваторах составлял 2 л, при высоте слоя раствора 18 см.

Концентрирование всей биомассы проводили однократно на планктонном сите 100 – 105 ПЭ [10]. Биомассу промывали изотоническим раствором углекислого аммония [3] для максимально полного удаления солей и увеличения сохранности целостности клеточных мембран и оболочек. Затем пасту из цианобактерий разделяли на три части и высушивали до воздушно-сухого состояния в термостате при температурах 30, 60, 70°C. Остаточная влажность $\leq 10\%$.

Липиды экстрагировали смесью хлороформ : метанол в соотношении 2:1 (реактив Фолча) из навески массой 15 мг. Очистку экстракта от водорастворимых примесей проводили добавлением к экстракту дистиллированной воды из расчёта 10 % на весь объём. После разделения содержимого на две фазы верхний водно-спиртовый слой декантировали. Из нижнего (хлороформенного) слоя, представляющего смесь липидов и пигментов, растворитель удаляли при температуре 40°C. Общее содержание липидов определяли весовым методом [6].

Фракционный состав липидов изучали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) [4] с некоторой модификацией. Она заключается в переходе к однокамерному варианту, при этом размеры этой камеры позволяют работать с ТСХ пластинами размером 15 x 15 см. Это, в свою очередь, дает возможность наносить на пластину сразу 3 пробы и стандартные растворы липидов. В качестве стандарта триацилглицеридов использовали растительное масло, очищенное пропусканием через окись алюминия, ненасыщенных жирных кислот – олеиновая кислота, фосфолипидов – лецитин. В работе использовали хроматографические пластины «Силуфол», предварительно обработанные обнаруживающим реагентом – 10 % раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле. Пластины высушивали на воздухе и промывали в ненасыщенной камере хлороформом.

Липиды растворяли в 1 мл хлороформа. Аликвоту (10 мкл) наносили на ТСХ пластины и проводили хроматографирование. После завершения процесса разделения пластины ставили на 10 – 15 мин в сушильный шкаф с температурой 100°C. Обнаруженные фракции имели черный цвет на зеленоватом фоне. Количественное детектирование осуществляли посредством сканирующего денситометра ERI – 65 (CARL ZEISS IENA).

Результаты и обсуждение. Известно, что триацилглицериды являются основным источником энергии в клетке. Однако при разделении липидных фракций *Spirulina platensis* было отмечено полное отсутствие триацилглицеридов независимо от температуры дегидратации (рис. 1). Отсутствие триацилглицеридов является очень интересным фактом. Можно предположить, что их отсутствие является следствием того, что отбор образцов производился в тот момент, когда культура находилась на стадии экспоненциального роста. Как известно, эта стадия характеризуется интенсивным приростом биомассы и в этот период не наблюдается накопления продуктов биосинтеза. Возможно, синтез триацилглицеридов происходит по достижению культурой плато своего развития, т. е. клетки прекращают интенсивное деление и начинают накапливать запасные вещества.

Литературные данные по суммарным липидам разнятся, так одни авторы [8, 13] утверждают, что спирулина содержит 6 – 13 % липидов из расчёта на сухую биомассу, а другие [12] до 16,6 %. Хотелось бы отметить, что оптимальная температура для роста спирулины составляет 25 - 35°C, а процесс получения воздушно-сухой биомассы

происходит при 25 – 35°C. Общее содержание липидов в образцах дегидрированных при 30°C равно 11,3 % (табл. 1), полученные результаты совпадают с результатами других исследователей. Количество липидов при 60 и 70°C составляет 14 и 27,3 % соответственно. Возможно, увеличение количества суммарных липидов происходит в результате повышения температуры, которая в свою очередь подстёгивает биохимические процессы и как результат мы отмечаем увеличение количества липидов. Известно, что накопление липидов у многих микроводорослей, включая цианобактерии *Spirulina platensis*, происходит во время стационарной фазы роста, т. е. когда культура достигла пика своего развития. Однако, возможно, что высокие температуры, в частности 70°C, инактивируют ферменты осуществляющие метаболизм липидов и происходит остановка метаболических процессов, и как следствие, осуществляется накопление продуктов биосинтеза, чем и объясняется резкий скачок суммарных липидов.

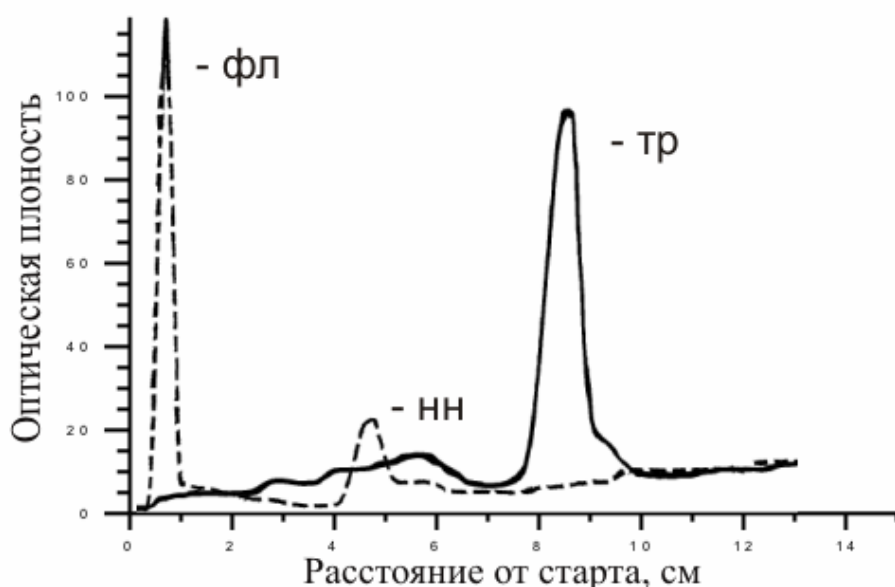


Рисунок 1. Денситограмма фракционного распределения липидов *Spirulina platensis* при температуре дегидратации 70°C. — стандарт, - - - образец; фл - фосфолипиды, нн - ненасыщенные липиды, тр - триациглицериды

Figure 1. Densitogramme of fractional distribution lipid *Spirulina platensis* at temperature dehydration 70°C. — the standart, - - - a sample; фл - phospholipids, нн - nonsaturated lipids, тр - triacylglycerides

Известно, что половина суммарных липидов приходится на жирные кислоты [13]. Из приведённых в таблице данных, видно, что во фракционном составе липидов спироулины доминируют фосфолипиды на долю которых приходится от 68 до 100 %. Остальные липиды представлены жирными кислотами (20 - 30 %), среди которых преобладают ненасыщенные жирные кислоты (от их суммы 20 - 23 %).

В составе липидов образцов, дегидрированных при температуре 30°C, были обнаружены только фосфолипиды. Липиды, содержащиеся в образцах высушенных при 60°C, распределились следующим образом: фосфолипиды - 68,2 %, ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты – 31,8 %. Состав липидного экстракта культур, обезвоженных при 70°C, был представлен фосфолипидами и ненасыщенными жирными кислотами.

Такое распределение липидного состава может быть объяснено, тем, что фосфолипиды являются основными компонентами биомембран. Структурные перестройки в мембранах в значительной мере касаются фосфолипидов. Температура дегидратации 30°C соответствует физиологическому оптимуму роста спироулины и поэтому, возможно, изменений в составе липидов не происходило.

Таблица. 1. Фракционный состав липидов в *Spirulina platensis* при разных температурах дегидратации, % от всех липидов

Table. 1. Fractional structure a lipid in *Spirulina platensis* at different temperatures dehydration, % from all a lipid

Температура дегидратации С	Общее содержание липидов сухого вещества	Липидные фракции		
		Фосфолипиды	Ненасыщенные жирные кислоты	Насыщенные жирные кислоты
30	11,3	100,0	-	-
60	14,0	68,2	22,9	8,9
70	27,3	80,5	19,5	-

Из литературных источников известно [2, 7], что в сложной молекуле фосфолипидов все наиболее важные элементы строго детерминированы качественно и количественно. Только жирные кислоты подвержены влиянию генетического контроля и условий среды. Именно жирные кислоты относятся к самым быстро обновляемым компонентам молекулы фосфолипидов. При действии стрессора могут происходить сдвиги в соотношении различных групп жирных кислот, изменяется степень их ненасыщенности. Помимо этого возможно изменение длины цепей жирных кислот, позиционного расположения двойных связей, количества полярных групп. Дегидратация при 60 и 70°C, является стрессом для спироулины и, возможно, по этому происходит сдвиг в соотношении насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Также известно, что увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот при различных воздействиях способствует повышению устойчивости мембран. Поскольку повышение степени ненасыщенности жирных кислот наблюдается при самых разнообразных воздействиях внешней среды, оно представляет, по-видимому, неспецифическую реакцию [7]. Поэтому, возможно, в начале воздействия температурного фактора, изменения жирнокислотного состава можно рассматривать как адаптивные, а позднее они могут являться проявлением истощения защитных возможностей организма. Вероятно, данное явление мы наблюдали у образцов обезвоженных при температуре 70°C.

Выводы. 1. При увеличении температуры дегидратации до 70°C наблюдали резкое увеличение содержания суммарных липидов в 2 раза. **2..** На экспоненциальной стадии роста во всех образцах было отмечено полное отсутствие триацилглицеридов. **3.** В цианобактериях дегидрированных при 30°C липидная фракция была представлена только фосфолипидами, при 60°C - фосфолипидами, ненасыщенными и насыщенными жирными кислотами, при 70°C – фосфолипидами и ненасыщенными жирными кислотами.

1. Брянцева Ю. В., Дробецкая И. В., Харчук И. А. Характеристика цианобактерий *Spirulina (Arthrospira) platensis* // Экология моря – 2006. вып. 70. – С. 24 – 30.
2. Владимиров Ю. А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки // СОЖ. – 2000. – 9. – С. 2–9.
3. Воронова О. К. Методика определения сухой биомассы микроводорослей в условиях интенсивного культивирования // Альгология. – 1994. – 4, вып. 4. – С. 59 – 62.
4. Копытов Ю. П. Новый вариант тонкослойной хроматографии липидов и углеводов // Экология моря. – 1983. – 13. – С. 76 – 80.
5. Методы биохимического анализа растений. Под ред. проф. Полевого В. И. доц. Максимова Г. Б. Л.: Изд. Ленингр. Универ. 1978. – С. 82 – 83.
6. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наукова Думка. 1975. – С. 145.
7. Чиркова Т. В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // СОЖ. – 1997. – 9. – С. 12–17.
8. Durand-Chastel H. Production of *Spirulina* biomass rich in gamma-linolenic acid and sulfolipids // Bull. de l'Institut oceanograph. Monaco. – 1999. – 19. – P. 541 – 546.
9. Faucher O., Coupal B., Leduy A., Utilization of seawater – urea as a culture medium for *Spirulina maxima* // National Research Counsel of Canada – 1979. – P. 752 – 759.
10. Richmond A., Lichtenberg E., Stahl B & Vonshak A. Quatitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways // Journal of Applied Phycology. – 1990. – 2. – P. 195 – 206.
11. Suresh C. Singh, Rajeshwar P. Sinha and Donat-P. Hader. Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria // Acta Protozool. – 2002.- 41. – P. 297 – 308.
12. Tornabene T. G., Bourne T. F., Rziuddin S., Ben-Amiz A. Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales) // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1985. – 22. – P. 121 – 125.
13. Zvi Cohen. The chemicals of *Spirulina* // *Spirulina platensis* (Arthrospira) Phisiology, cell-biology and biotechnology. Taylor & Francis Ltd. - 1997 – P. 175 – 204.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 29.09.2005

I. A. KHARCHUK, Y. P. KOPITOV

DYNAMICS LIPIDS OF STRUCTURE IN CELLS *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDS) GEITLER DEPENDING ON TEMPERATURE DEHYDRATION

Summary

It has been investigated, that the *Spirulina platensis* lipids structure and dynamics of fractional structure is depending on temperature dehydration. It has been that registered, full absence of triacylglycerides is not dependent on temperature dehydration. It has been observed that at temperature dehydration increase up to 70°C sharp increase of maintenance total lipid was in 2 times. Cyanobacterium lipids extracts were divided as follows: at temperature dehydration 30°C only phospholipids, at 60°C - phospholipids, the nonsaturated and sated fat acids, at 70°C - phospholipids and nonsaturated fat acids.