ЗЕЛЁНАЯ МИКРОВОДОРОСЛЬ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* КАК ВОЗОБНОВЛЯЕМЫЙ ИСТОЧНИК ПРИРОДНОГО АСТАКСАНТИНА

Н. В. Данцюк, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, Э. С. Челебиева

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, РФ,
nterent@mail.ru

В работе обобщены результаты многолетних экспериментальных исследований зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* как промышленного источника высокоценного кетокаротиноида астаксантина. Показано, что морфологические, физиолого-биохимические и продукционные характеристики вида существенно зависят от условий культивирования и географического происхождения его штаммов.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*, культивирование, вторичный каротиногенез, астаксантин

Получение кетокаротиноида астаксантина (Аст) из одноклеточной водоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow 1984 (Chlorophyceae, Volvocales) как альтернатива его производству путём химического синтеза является одним из приоритетных направлений современной биотехнологии микроводорослей [1]. Актуальность исследований в данном направлении обусловлена высокой биологической активностью Аст, обладающего мощными антиоксидантными и регуляторными свойствами [2]. По содержанию Аст в сухой биомассе (2–5 %) *H. pluvialis* превосходит все известные природные источники пигмента [3]. Экспериментально и клинически доказанные преимущества природной формы каротиноида над его синтетическим аналогом (по лечебно-профилактическим свойствам и безопасности), определяют увеличение спроса на него в аквакультуре, медицине и производстве БАД. Тем не менее только 1 % производимого в мире Аст получают из *H. pluvialis*. При этом его рыночная цена (\$2500–15000/кг) в несколько раз превышает цену синтетического продукта (\$1500–2000). Такое положение сохраняется на протяжении последних 10–15 лет и объясняется невысокой коммерческой эффективностью используемых технологий массового культивирования этого вида, обусловленной рядом его биологических особенностей и недостаточными знаниями путей минимизации их негативного проявления [1, 4].

Целью данной работы было исследование влияния физико-химических факторов внешней среды на рост, вторичный каротиногенез (ВКГ) и сопряжённые с ним морфофизиологические адаптации клеток *H. pluvialis* к стрессу в зависимости от географического происхождения штаммов и условий их культивирования. Для достижения поставленной цели решали два блока задач, определяющихся особенностями методов и приёмов культивирования водоросли:

1. В условиях двухстадийного культивирования исследовать скорости роста культур *H. pluvialis* в зависимости от биологических особенностей штаммов, состава питательных сред и освещённости.

2. В условиях квазинепрерывной культуры исследовать влияние скорости потока среды и концентрации азота и фосфора в среде на морфотип и физиолого-биохимические показатели ВКГ в монадных клетках *H. pluvialis*.

Материал и методы. Объектами исследования служили пять штаммов *H. pluvialis*, выделенных в различные годы в различных районах Европы. Штамм CALU-79 (Mainx) (= LАВІК 927-1) выделен в Чехословакии (~ в 1927–1931 гг.), получен из Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН в 2002 г, штамм IPPAS H-239

(Vischer), выделен в Швейцарии (г. Базель) в 1923 г, получен из Института физиологии растений РАН в 2004 г. Три собственных полевых изолята «Адлер», «Кавказ» и «Севастополь» выделены нами в различных районах Причерноморья в 2003–2008 гг. Для культивирования водоросли использовали методы двухстадийной накопительной культуры и квазинепрерывной культуры со скоростью протока $0,1-0,3 \text{ сут}^{-1}$. Базовой питательной средой служила среда ОНМ [5]. Условия культивирования и методы анализа морфометрических и физиолого-биохимических характеристик штаммов (численности и объёмов (V) клеток, содержания сухого вещества (СВ), суммарных каротиноидов (Кар) и Аст) детально описаны ранее в [5, 4, 6].

Результаты и обсуждение. Характерной особенностью штаммов CALU-79 и IPPAS H-239 было почти 90-летнее хранение на агаризованных средах в различных коллекциях и при разных условиях, что не могло не отразиться на их свойствах [5]. Прежде всего, следует отметить длительность адаптации этих штаммов к условиям автотрофного роста при пересеве клеток с агаризованных сред на жидкие минеральные среды. Процесс получения генерации быстро делящихся клеток у этих штаммов может занимать 1,5–2,0 месяца (с пересевом каждые 7–10 дней), в то время как у более молодых причерноморских штаммов он длится не более 14 суток (с 2 пересевами). Таксономический статус полевых изолятов, определённый первоначально по морфофенотипическим критериям, подтверждён молекулярно-генетическим методом по нуклеотидной последовательности фрагмента ядерного гена 18S рДНК [7]. У всех штаммов вегетативные клетки представлены двумя морфотипами – крупными двухжгутиковыми монадами (зооспорами) эллипсоидной и круглой формы ($L = 15-30 \text{ мкм}$, $D = 11-28 \text{ мкм}$) и неподвижными шаровидными пальмеллоидными клетками, сохраняющими способность активно делиться (диаметр клеток $16-30 \text{ мкм}$). Соотношение вегетативных клеток различного морфотипа в культурах зависит как от их возраста, так и от индивидуальных особенностей штаммов. На экспоненциальной и линейной стадиях роста у крупноклеточных штаммов «Адлер» и «Севастополь» ($L = 23-45 \text{ мкм}$) преобладали монадные эллипсоидные и шаровидные клетки (70–80 % от общего числа), в то время как у более мелкого высокогорного штамма «Кавказ» ($L = 17-34 \text{ мкм}$) доля подвижных клеток составляла лишь 40–50 %. В редких случаях в культурах *H. pluvialis* встречаются мелкие чрезвычайно подвижные голые микрозооспоры (или гаметы?). Стадия покоя представлена толстостенными красными апланоспорами, заполненными липидными глобулами с Аст [5, 4, 8]. Их средние объёмы у штамма «Севастополь» составляют $4,3 \cdot 10^3 \text{ мкм}^3$, у штаммов «Адлер» и «Кавказ» сходны ($V_{\text{ср.}} = 2,8-3 \cdot 10^3 \text{ мкм}^3$). У штамма CALU-79 они в 2 раза крупнее ($V_{\text{ср.}} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ мкм}^3$), а у штамма IPPAS H-239 – в 2 раза мельче. Основным способом деления у всех штаммов, за исключением CALU-79, является схизогония (как в подвижном, так и в неподвижном состоянии) с образованием 2, 4 и реже 8 дочерних клеток. В молодых культурах CALU-79 преобладает редко встречающийся у данного вида способ деления – протоцитотомия [4, 7].

Сопоставление физиолого-биохимических характеристик двух кавказских штаммов в условиях двухстадийной культуры показало, что близкие по географическому происхождению, но разные по экологии штаммы могут существенно различаться по скорости роста на «зелёной» стадии культивирования и выходу Кар из литры исходной культуры. Так, у равнинного штамма «Адлер», выделенного в районе Имеритинской низменности (субтропический климат, высота над уровнем моря – 0–60 м), максимальная удельная скорость роста ($\mu_{\text{макс}}$) на «зелёной» стадии составляла $0,94 \text{ сут}^{-1}$ и была в 2 раза выше, чем у штамма «Кавказ» ($\mu_{\text{макс.}} = 0,4 \text{ сут}^{-1}$), выделенного на ледни-

ковом склоне ущелья Безенги (холодный высокогорный климат, высота над уровнем моря – 2000 м). На «красной» стадии равнинный штамм заметно превосходил высокогорный по продуктивности (P) культур по СВ (0,1 и 0,07 мг·л⁻¹·сут⁻¹ соответственно) и выходу Кар из литра исходной культуры (19 и 13 мг·л⁻¹·сут⁻¹). По этим признакам штамм «Адлер» более сходен со штаммом «Севастополь» ($\mu_{\text{макс.}} = 0,75 \text{ сут}^{-1}$; $R_{\text{СВ}} = 0,105 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$; $R_{\text{Кар}} = 20 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$). При этом по содержанию Аст все причерноморские штаммы не различались (2,7–2,8 % СВ) и существенно превосходили чешский штамм CALU-79 (1,7 % СВ), служивший в этом исследовании контролем.

На примере штамма CALU-79 оценена возможность увеличения продуктивности культур *H. pluvialis* миксотрофным культивированием с использованием ряда органических субстратов: ацетата натрия (NaAc), щелочного мидийного гидролизата, карбамида и β -Са-глицерофосфата. Показано, что при низкой освещённости (1500 лк) синергизм фотосинтеза и органотрофии приводит к интенсификации метаболизма и ускорению деления. Наилучшие результаты получены при однократном внесении в минеральные среды ацетата натрия до конечной концентрации ($C_{\text{ац.}}$) 10 ммоль. В этом варианте время достижения миксотрофными культурами максимума биомассы сокращалось в 4–5 раз. Повторное внесение NaAc на поздней стационарной фазе роста (до $C_{\text{ац.}} = 45 \text{ ммоль}$) в сочетании NaCl (до $C_{\text{NaCl}} = 17 \text{ ммоль}$) существенно интенсифицировало биосинтез Аст в клетках даже при относительно низкой освещённости (5500 лк). При этом время созревания апланоспор сокращалось до 7–8 суток, а содержание Кар, на 90 % состоящих из эфиров Аст, достигало более 200 пг·кл⁻¹ (или 2 % СВ). Помимо низкой освещённости необходимым условием использования такого приёма является внесение солей в голодающие культуры, частично перешедшие в пальмеллоидное состояние. Тогда отход клеток в результате стресса не превышает 3–5 % против 30–45 % при стрессировании ещё растущих и не лимитированных по питанию культур. В последнем случае концентрацию NaAc следует снижать до 15 ммоль [4, 8].

Исследование влияния освещённости на скорость автотрофного роста *H. pluvialis* в условиях двухстадийной культуры показало, что вопреки распространённым представлениям о тенелюбивости данного вида увеличение освещённости от 2000 до 6000 лк приводит к возрастанию средней скорости роста в 3 раза, а выхода Кар из литра начальной культуры – в 2,2 раза. При этом следует учитывать, что повышение освещённости до 6000 лк сопровождается изменением молярного отношения поглощённых из среды биогенных элементов (N/P) от 11 до 17 [6].

При проведении исследований по оптимизации методов индукции биосинтеза Аст установлено, что ВКГ не обязательно сопряжён с переходом вегетативных клеток в стадию покоя. В условиях квазинепрерывной культуры со скоростью протока (ω) 0,1–0,3 сут⁻¹ этот процесс может протекать с достаточно высокой эффективностью и в монадных клетках, не имеющих плотной, трудноразрушаемой оболочки, характерной для зрелых апланоспор. Преимущества такого способа культивирования заключаются в существенном увеличении биодоступности Аст в получаемой биомассе и снижении расходов на дезинтеграцию клеток при экстракции Аст. По результатам серии экспериментов установлено, что наиболее эффективным способом индукции биосинтеза Аст в монадных клетках, обеспечивающим их устойчивое преобладание в культурах (85–97 %), является создание резкого отрицательного градиента содержания N и P в среде (с добавлением 15 мМ NaAc) при интенсивности ФАР 120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. При $\omega = 0,2 \text{ сут}^{-1}$ с ежедневным внесением N и P до концентрации 0,2 и 0,01 мМ соответственно

выход Аст в течение 20-дневного технологического цикла составляет около 1,9 мг·л⁻¹·сут⁻¹, а содержание пигмента в биомассе достигает 1,8–2,6 % СВ [9].

Выводы. 1. Штаммы *H. pluvialis*, имеющие разное географическое происхождение и экологическую специализацию, могут существенно различаться по важным для массового культивирования характеристикам (размерам клеток, скорости роста, стресс-толерантности, скорости накопления астаксантина в клетках). **2.** Выраженную способность *H. pluvialis* к миксотрофному росту на различных источниках органического углерода можно использовать при его массовом культивировании в закрытых фотобиореакторах. **3.** Предложенный метод одностадийной квазинепрерывной культуры со скоростью потока 0,2 сут⁻¹ не уступает традиционной двухстадийной технологии и одновременно с этим обладает такими преимуществами, как повышенная биодоступность астаксантина в биомассе и снижение расходов на экстракцию астаксантина.

1. Shah Md. M., Liang R. Y., Cheng J. J., Daroch M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>.
2. Yang Y., Kim B., Lee J. Y. Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits // *J. Hum. Nutr. Food Sci.* 2013. V. 1. P. 1001–1011.
3. Ranga Rao A., Siew Moi P., Ravi S., Aswathanarayana R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications – a review // *Mar. Drugs.* 2014. Vol. 12. P. 128–152.
4. Минюк Г. С., Ерохин В. Е., Гордиенко А. П., Терентьева Н. В., Чубчикова И. Н., Дробецкая И. В. Физиолого-биохимические и биофизические характеристики одноклеточной водоросли *Haematococcus pluvialis* – перспективного источника природного астаксантина // *Микроводоросли Чёрного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования* / ред. Ю. Н. Токарев, З. З. Финенко, Н. В. Шадрин; НАН Украины, ИнБЮМ. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. С. 353–392.
5. Минюк Г. С., Терентьева Н. В., Дробецкая И. В. Сравнительная характеристика морфологических и физиолого-биохимических признаков трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyta, Chlamydomonadales) // *Альгология.* 2007. Т. 17, № 2. С. 148–159.
6. Терентьева Н. В., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н., Минюк Г. С. Влияние освещённости на физиолого-биохимические характеристики зеленой микроводоросли *Haematococcus pluvialis* // *Экология моря.* 2008. Вып. 75. С. 82–88.
7. Данцюк Н. В., Челебиева Э. С., Чеканов К. А. Новые изоляты зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) из различных районов Причерноморья // *Международная научно-практическая конференция, посвященная 105-летию со дня рождения профессора Эмилии Андриановны Штиной «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах»: тез. докл. Киров, 2015.* С. 98–102.
8. Данцюк Н. В. Влияние ацетата натрия на интенсивность вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* // *Экология моря.* 2010. Вып. 80. С. 44–50.
9. Терентьева Н. В., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. Одностадийное культивирование зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow для получения астаксантина // *Экология моря.* 2008. Вып. 76. С. 72–80.

GREEN ALGAE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* AS RENEWABLE SOURCE OF NATURAL ASTAXANTHIN

N. V. Dantsyuk, G. S. Minyuk, I. V. Drobetskaya, I. N. Chubchikova, E. S. Chelebieva

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS, Sevastopol, RF, nterent@mail.ru

The results of many years' experimental research of green algae *Haematococcus pluvialis* as a commercial source of high-value ketocarotenoid astaxanthin are summarized. It is shown that the morphological, physiological, biochemical and production characteristics of the algae depend substantially on the culture conditions and geographical origin of the strains.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, cultivation, secondary carotenogenesis, astaxanthin