

И. Н. ГУДВИЛОВИЧ, Н. М. БЕРЕГОВАЯ, А. Б. БОРОВКОВ

**ДИНАМИКА СУММАРНЫХ КАРОТИНОИДОВ И ХЛОРОФИЛЛА-а  
В КЛЕТКАХ *DUNALIELLA SALINA* В КВАЗИНЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЕ**

В результате изучения динамики суммарных каротиноидов и хлорофилла-а в клетках морской микроводоросли *Dunaliella salina* (Dunal) Teod. в квазинепрерывной культуре в течение 25 сут отмечено изменение уровня суммарных каротиноидов в 5 раз и хлорофилла в 4 раза на фоне изменения биомассы в 1,5 раза. Наиболее стабильным уровень пигментов был с 10 по 20 сутки культивирования. Динамика концентрации хлорофилла, в основном, совпадала с динамикой роста клеток культуры, в то время как динамика суммарных каротиноидов находилась в обратной зависимости.

Вопросы управления биосинтезом микроводорослей, в том числе и *Dunaliella salina*, необходимо изучать, рассматривая динамику роста культуры в сочетании с различными факторами, лимитирующими их рост и развитие. Управляемый биосинтез пигментов микроводорослей является одной из наиболее актуальных задач биотехнологии. Наиболее ценные компоненты микроводорослей, в том числе и *D. salina*, пигменты: β-каротин, который составляет большую часть суммарных каротиноидов, а также хлорофилл [1]. Наличие этих пигментов, богатство ненасыщенными жирными кислотами обуславливают повышенный интерес к *D. salina* как к объекту биотехнологии. Поэтому изучение условий, наиболее благоприятных для культивирования микроводорослей с максимальным содержанием указанных компонентов является актуальным. В данной работе рассмотрена динамика суммарных каротиноидов и хлорофилла в клетках *D. salina* в режиме квазинепрерывной культуры.

**Материал и методы.** Объект исследования - зеленая галообная микроводоросль *Dunaliella salina* (Dunal) Teod. из коллекции культур ИнБЮМ НАН Украины.

Описание системы для культивирования микроводорослей приводится в [2]. Водоросли выращивали на модифицированной питательной среде Тренкеншу [5] в режиме квазинепрерывной культуры с удельной скоростью протока 0,1 сут<sup>-1</sup>. В процессе выращивания культура непрерывно снабжалась газовой смесью с концентрацией углекислоты, обеспечивающей оптимальную рН среды (8 - 9 ед.). Поверхностная освещенность рабочей поверхности культиватора в среднем составляла 21 клк, температура – 26 - 28°C. Оптические характеристики (оптическая плотность D при длине волны 750 нм и 0,5 см кювете) использовали как косвенный показатель концентрации клеток культуры. Измерения проводили с помощью фотоэлектроколориметра КФК-2. Концентрацию суммарных каротиноидов и хлорофилла а определяли из одной навески [3]. Навеску биомассы (15 мг), предварительно высушенную при 45° С, заливали 3 – 5 мл смеси хлороформа и этанола (2:1), центрифугировали при 3000 об./мин. на лабораторной центрифуге ОПН-3-УХЛ 42; супернатанты сливали в мерную пробирку. Операцию проводили до обесцвечивания экстракта. Параллельно 0,8 – 1 г биомассы помещали в бюкс, предварительно доведенный до постоянного веса, и выдерживали при 105°C в сушильном шкафу в течение суток. Операцию проводили для определения влажности в пробе и внесения соответствующей поправки в величину массы (m). Экстракты пигментов промеряли на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения на спектрофотометре СФ – 16. Концентрацию суммарных каротиноидов рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{4 \times D \times V}{m}, \quad (1)$$

где: D - оптическая плотность при 480 нм, V – объем экстрактов в мл, m – масса в г.

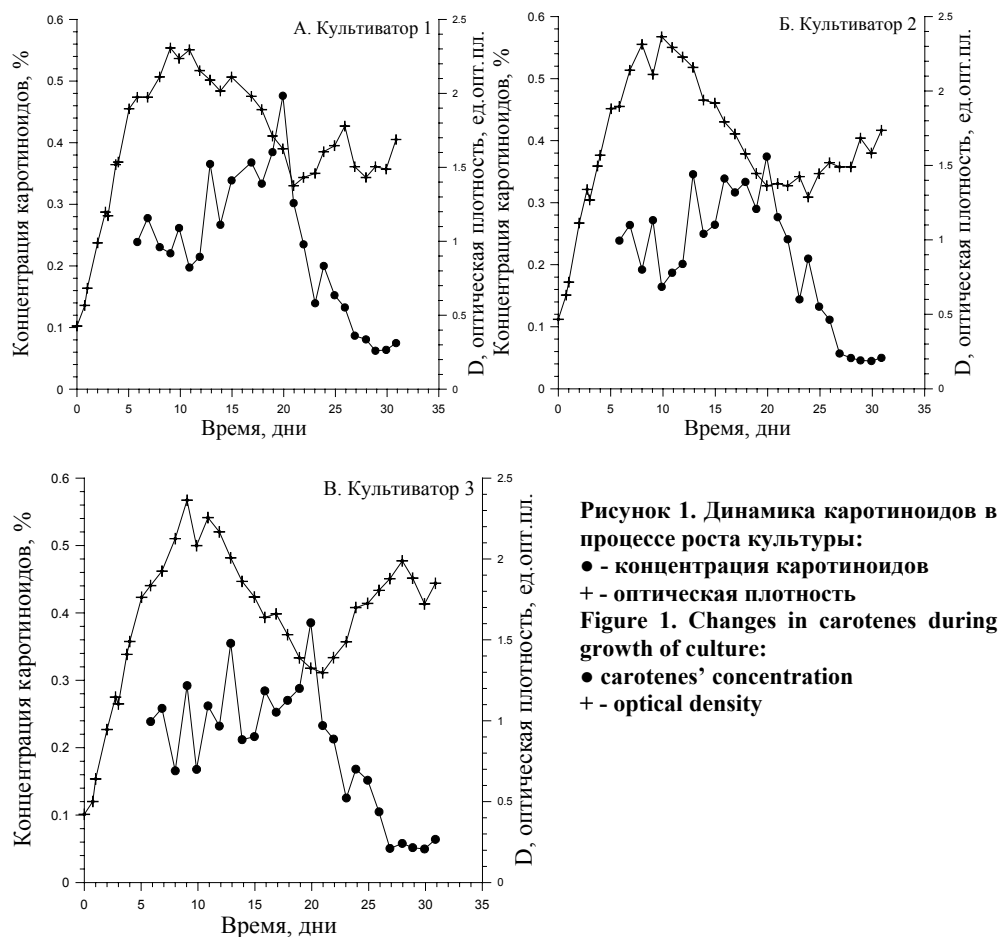
Концентрацию хлорофилла рассчитывали по формуле:

© И. Н. Гудвилович, Н. М. Береговая, А. Б. Боровиков, 2005

$$C = \frac{(11,85D_{644} - 1,54D_{647} - 0,08D_{630})}{m \times 1000} \times V \times 100, \quad (2)$$

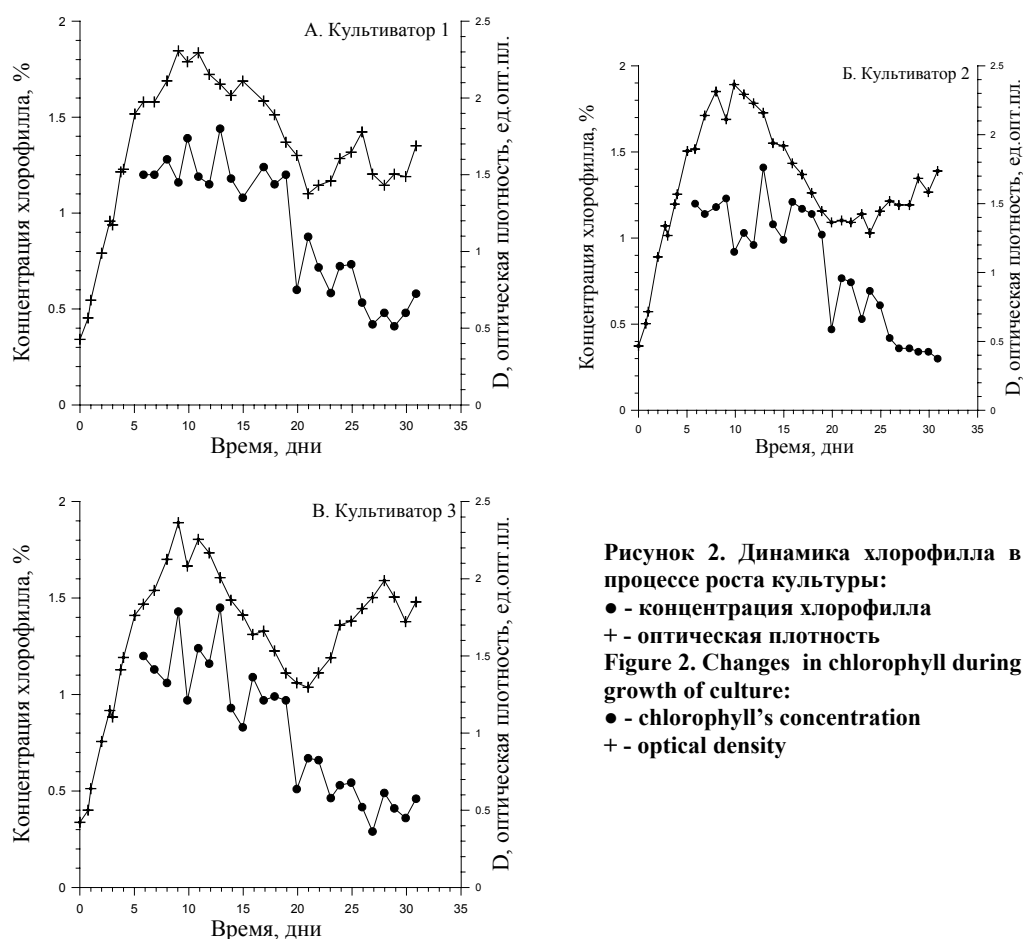
где: D – оптическая плотность, V – объем экстракта в мл, m – масса в мг.

**Результаты и обсуждение.** Период активного роста сопровождался увеличением концентрации хлорофилла до максимальных значений на десятые сутки и понижением концентрации суммарных каротиноидов с 6 по 10-е сутки (рис.1).



В условиях полного минерального обеспечения, позволяющего культуре давать неограниченный рост, в качестве лимитирующего фактора выступает обеспеченность клеток светом или структура фотосинтетического аппарата. Культура на девятые сутки достигла высокой плотности, и можно предположить, что фактором, лимитирующим рост, являлся свет в связи с самозатенением клеток, возникшим при данном режиме. На 9-й день режим подачи углекислоты изменили на периодический, т.е. осуществили 4-разовую подачу углекислоты в течение дня по 30 мин. С 10-го дня наблюдали падение значения pH культуры до субоптимального уровня: 7 - 7,5 ед. Данный режим поддерживали до 20-ых суток, и на указанном временном отрезке наблюдали отрицательную продуктивность культуры. В этот период отметили понижение концентрации хлорофилла, которое практически совпадало по срокам с периодом отрицательного прироста культуры микроводоросли (рис. 2).

С другой стороны, содержание общих каротиноидов в клетках *D. salina* резко нарастало и достигало максимальных значений на 19 - 20-е сутки культивирования. Этот период также сопровождался изменением содержания пигментов в клетках микроводоросли: концентрация общих каротиноидов резко понижалась до минимальных значений с последующей стабилизацией после 26-х суток культивирования, концентрация хлорофилла также снижалась, но незначительно, и мало изменялась после 26 дней культивирования (рис. 2).



Известно, что суммарные каротиноиды, являясь компонентом антиоксидантной системы, отражают адаптационные возможности живых организмов, и могут служить показателем «отклика» организма на неблагоприятное воздействие [4]. Причем, реакция на неблагоприятное воздействие сопровождается ростом концентрации каротиноидов. В нашем эксперименте мы наблюдали снижение каротиноидов в период улучшения ростовых характеристик, связанных с активизацией питания по углероду, и возрастание уровня суммарных каротиноидов в период угнетения роста, что не противоречит литературным данным. Динамика концентрации хлорофилла, в основном, совпадала с динамикой роста концентрации клеток в культуре, что можно объяснить прямой зависимостью между содержанием в клетках микроводорослей хлорофилла и белка (на долю белка в биомассе приходится до 60 % в пересчете на абсолютно сухой вес).

Таким образом, на разных этапах культивирования микроводоросли *D. salina* в квазинепрерывной культуре наблюдалось значительное изменение пигментного состава клеток культуры, что зависело от активности роста клеток и лимитирующих факторов (освещенности клеток и режима подачи углекислоты). Поскольку целью культивирования микроводорослей является получение биомассы, содержащей заданные концентрации необходимых биологически активных веществ, в том числе β-каротина и хлорофилла, то решение этой проблемы должно быть только комплексным. С одной стороны, на основе знаний механизмов функционирования клеток микроводорослей, а с другой – на основе технологических разработок, которые позволяют обеспечить поддержание оптимальных условий роста культуры и получение конечного продукта с необходимым биохимическим составом.

**Выводы 1.** В период роста квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* в течение 25 сут концентрация каротиноидов в клетках изменялась в 5 раз, хлорофилла – в 4 раза на фоне изменения биомассы в 1,5 раза. **2.** Наиболее стабильный уровень каротиноидов и хлорофилла наблюдался во время падения прироста культуры. **3.** Динамика концентрации хлорофилла, в основном, совпадала с динамикой концентрации клеток культуры и обеспеченности углеродным питанием. **4.** Динамика концентрации суммы каротиноидов находилась в обратной зависимости от динамики концентрации клеток культуры и обеспеченности углеродным питанием.

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
2. Геворгиз Р. Г., Шахматов А. П. Установка для культивирования морских микроводорослей // Экология моря. Вып. 67. – С. 44 – 47.
3. Дивавин И. А., Копытов Ю. П. Динамика изменений биохимического состава отдельных органов мидии *Mytilus galloprovincialis* при интоксикации соляром // Экология моря. – 1988. – Вып. 26. – С. 80 – 86.
4. Карнаухов В. Н. Роль моллюсков с высоким содержанием каротиноидов в охране средфы от загрязнения. – Пушино, 1978. – 73 с. (Препринт / Науч. центр биол. Исслед. АН СССР. Ин – т биол. Физики АН СССР).
5. Тренкениш Р. П., Беянин В. Н., Сидько Ф. Я. Модель светозависимого роста морских микроводорослей (с учетом фотоингибирования). – Красноярск. ИФСО, 1981. – 63 с. (Препринт № ИФСО – 18 Б).

Институт биологии южных морей НАН Украины,  
г. Севастополь

Получено 25.05.2005

I. N. GUDVILOVITCH, N. M. BEREGOVAYA, A. B. BOROVKOV

#### DYNAMICS OF TOTAL CAROTINOIDS AND CHLOROPHYLLS IN *DUNALIELLA SALINA* CELLS IN SEMICONTINUOUS CULTURE

##### Summary

As a result of studying of total carotinoids and chlorophyll dynamics in the cells of the sea microalga *Dunaliella salina* Teod. in semicontinuous culture within 25 days a level of total carotinoids is changed in 5 times and chlorophyll - in 4 times on a background of biomass change in 1,5 times. The most stable level of pigments was since 10 till 20-day cultivation. Dynamics of chlorophyll concentration, basically coincided with growth dynamics of culture cells while dynamics total carotinoids was in inverse relationship.