

УДК 57.042:577.13

Пигментный состав зелёной водоросли *Haematococcus pluvialis* в условиях действия нескольких индукторов накопления астаксантина

© 2020 Е.В. ВЯЗОВ^{1*}, Р.Г. ГОНЧАРИК¹, Е.А. КУЛИКОВ², А.А. СЕЛИЩЕВА^{2,3}¹ Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», Минск, 220072² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991

*e-mail: viazau@yahoo.com

Поступила в редакцию 04.03.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 03.07.2020 г.

Изучено содержание астаксантина, в том числе его моно- и диэфиров и фотосинтетических пигментов в клетках *H. pluvialis* штамма IVSE-N17 при одновременном действии в течение продолжительного времени нескольких индукторов накопления астаксантина. Показана эффективная индукция его накопления, преимущественно в виде моноэфиров жирных кислот, после 20-суточного культивирования под светом высокой интенсивности при внесении в среду культивирования 1–2 г/л ацетата натрия. В этих условиях в клетках *H. pluvialis* одновременно происходило снижение содержания хлорофиллов и лютеина. Использование ацетата натрия совместно с хлоридом натрия не вызывало заметных изменений в содержании астаксантина по сравнению с применением одного ацетата натрия. Полученные данные могут быть использованы в биотехнологическом процессе получения биомассы гематококка, обогащённой хозяйственно ценными соединениями.

Ключевые слова: астаксантин, *Haematococcus pluvialis*, пигменты, ацетат натрия, хлорид натрия, свет высокой интенсивности

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-29-33

В клетках зелёной водоросли гематококка (*Haematococcus pluvialis*) содержится каротиноид астаксантин, широко используемый в качестве биологически активной добавки в пищу, в косметологии, в фармацевтике, а также в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

При действии стрессовых факторов в клетках *H. pluvialis* может накапливаться значительное количество этого соединения в основном в этерифицированной форме [1, 2]. Такая реакция может быть индуцирована светом высокой интенсивности (фотоокислительный стресс), ультрафиолетом, дефицитом или избытком

биогенов, засолением среды [3]. Аккумуляция астаксантина происходила под действием высоких концентраций CO₂, что приводило к увеличению отношения C/N, и, как следствие, воспринималось как дефицит азота [4]. При добавлении в среду культивирования ацетата натрия и ионов двухвалентного железа также показано увеличение содержания данного каротиноида и активация экспрессии ключевых генов пути его биосинтеза [5–8]. Добавление в среду культивирования хлорида натрия, вызывающего солевой стресс, может индуцировать повышенное образование астаксантина [9]. В клетках *H. pluvialis* может содержаться до 3–5%

Список сокращений: АФК – активные формы кислорода, *H. pluvialis* – *Haematococcus pluvialis*, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, МС – масс-спектрометрия.

этого вещества в пересчёте на сухой вес [10], что делает эту водоросль одним из наиболее перспективных источников данного пигмента. Величина и динамика ответа на действие стрессора во многих случаях могут существенно зависеть от используемого штамма, а также от времени воздействия и базового состава среды культивирования. К сожалению, в большинстве работ, посвящённых этой теме, внимание исследователей направлено на изучение общего содержания астаксантина [4, 6, 11], что не позволяет судить о содержании и функциях его моно- и диэфиров. Таким образом, актуальной задачей является оценка содержания этого каротиноида в первую очередь в форме моно- и диэфиров, и фотосинтетических пигментов в клетках *H. pluvialis* штамма IBCE-N17 при продолжительном культивировании и одновременном действии нескольких индукторов накопления астаксантина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследований служила альгологически чистая культура одноклеточной зелёной жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм IBCE-N-17, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Культуру пересевали с агаризованной среды BVM на жидкую среду Рудика и подращивали 4–5 сут на свету нормальной интенсивности (освещённость 1500 лк) в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре в световом периоде 23 ± 2 °C. Далее клетки культивировали в стрессовых условиях в течение 20 сут при освещённости поверхности суспензии 9000 лк. Образец, в котором клетки находились в стандартной среде Рудика без дополнительных добавок, служил контролем. К остальным образцам при культивировании

добавляли: 1 г/л ацетата натрия (Ацетат 1), 2 г/л ацетата натрия (Ацетат 2); 2 г/л ацетата натрия и 50 мМ FeSO₄ (Ацетат 2 + Fe), 1 г/л ацетата натрия и 100 мМ NaCl (Ацетат 1 + NaCl).

Число клеток в единице объёма суспензии подсчитывали с помощью камеры Горяева и светового микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония). Содержание пигментов в клетках гематококка определяли методом ВЭЖХ с помощью хроматографа высокого давления Prominence LC 20 (Shimadzu, Япония) согласно [5, 9], не проводя предварительную сапонификацию астаксантина, и перерасчитывали на число клеток. Содержание астаксантина рассчитывали по калибровке, построенной с использованием препарата с известной концентрацией. Жирные кислоты в составе моноэфиров астаксантина идентифицировали при помощи метода ВЭЖХ-МС как описано в [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения содержания астаксантина и его эфиров использовали клетки, подвергнутые действию избыточного освещения в течение 20 сут, которые служили контролем. При культивировании опытных образцов в состав среды добавляли ацетат или хлорид натрия, или сульфат железа. Результаты определения содержания астаксантина, в том числе в форме моно- и диэфиров, методом ВЭЖХ в метанольных экстрактах клеток, представленные на рис. 1, показывают существенное увеличение накопления как моно-, так и диэфиров астаксантина при совместном действии света высокой интенсивности и ацетата натрия по сравнению с контролем (только светом). Преимущественно накапливались моноэфиры, содержавшие остатки следующих жирных кислот (по убыванию содержания): олеиновая, линолевая, линоленовая, гексадекатриеновая. Интересно, что по

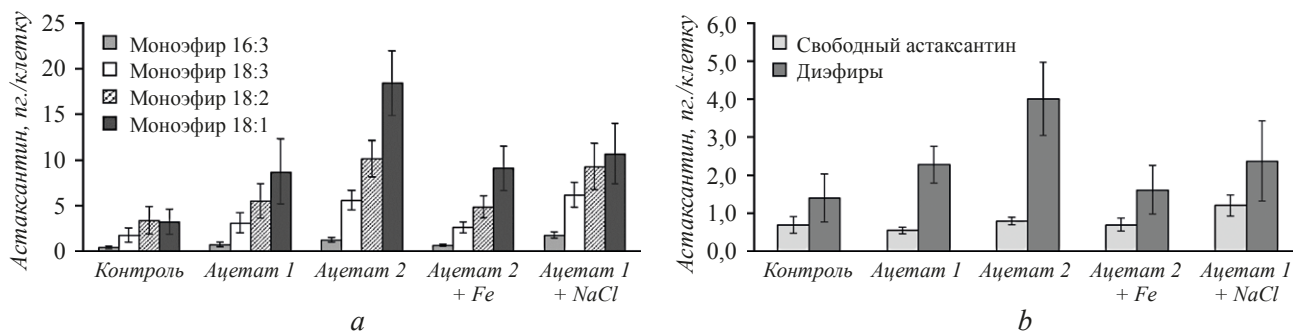


Рис. 1. Содержание моноэфиров астаксантина (а), а также свободного астаксантина и его диэфиров (б) в клетках *H. pluvialis* на 20 сут. культивирования в стрессовых условиях. Моноэфиры: 16:3 – гексадекатриеновой, 18:3 – линоленовой, 18:2 – линолевой, 18:1 – олеиновой кислот.

Fig. 1. The content of astaxanthin monoesters (a), and free astaxanthin and its diesters (b) in *H. pluvialis* cells on the 20th day of cultivation under stress conditions. Monoesters of 16:3 – hexadecatrienoic, 18:3 – linolenic, 18:2 – linoleic, 18:1 – oleic acid.

сравнению с 1 г/л ацетата натрия использование 2 г/л этой соли приводило к заметному увеличению содержания эфира только олеиновой кислоты (имеющей наименьшее число двойных связей из всех четырёх кислот). Содержание свободного (неэтерифицированного) астаксантина при совместном действии света высокой интенсивности и ацетата натрия в клетках *H. pluvialis* также увеличивалось, однако не так выражено, как для моноэфиров, что приводило к уменьшению доли свободного астаксантина в опытных вариантах по сравнению с контролем. Схожая картина была получена для диэфиров этого каротиноида. Добавление NaCl в целом не оказывало заметного влияния на содержание астаксантина.

Следует отметить негативное влияние на содержание астаксантина внесение в среду культивирования ионов двухвалентного железа. В этом случае увеличение содержания по сравнению с контролем зарегистрировано лишь для моноэфиров, и оно оказывалось ниже значений для других опытных образцов. Возможно, причина негативного действия Fe^{2+} связана с усилением накопления активных форм кислорода (АФК) за счёт реакции Фентона, в которой участвуют ионы Fe^{2+} [14, 15], на фоне действия света высокой интенсивности, это приводит к нарушению синтеза пигментов в целом.

Учитывая то, что основным местом генерации АФК [14, 15], а также основной их мишенью в высших растениях и фотосинтезирующих водорослях при воздействии света высокой интенсивности является фотосинтетический аппарат, важно проанализировать содержание фотосинте-

тических пигментов в таких условиях. Вероятно, накопление астаксантина и образование цист *H. pluvialis* при этом обусловлены попыткой сохранения фотосинтетического аппарата клеток водоросли, что бы их нормальное функционирование было возможно после снятия действия стрессора. Результаты проведённого нами анализа приведены на рис. 2.

Содержание хлорофиллов *a* и *b* снижалось в вариантах Ацетат 1, Ацетат 2 и Ацетат 2 + Fe на 16–52% и 31–56% соответственно. Схожий эффект показан для лютеина. Снижение его содержания под действием ацетата натрия может быть обусловлено конкуренцией путей синтеза астаксантина и лютеина из одного исходного предшественника – ликопина. Полученные данные соответствуют литературным сведениям о снижении содержания хлорофилла в условиях индукции накопления астаксантина [1, 7, 11]. При этом наименьшие значения содержания хлорофиллов и лютеина получены при добавлении в среду культивирования двухвалентного железа и ацетата натрия. Это согласуется с высказанным выше предположением о нарушении синтеза пигментов, вызванном совокупным деструктивным действием АФК, которые генерируются под действием двух факторов. Добавление хлорида натрия в среду культивирования с ацетатом натрия позволяло нормализовать содержание фотосинтетических пигментов относительно контрольных значений.

Снижение содержания хлорофиллов на фоне накопления эфиров астаксантина при совместном действии света высокой интенсивности и ацетата натрия по сравнению с контролем, по-видимому,

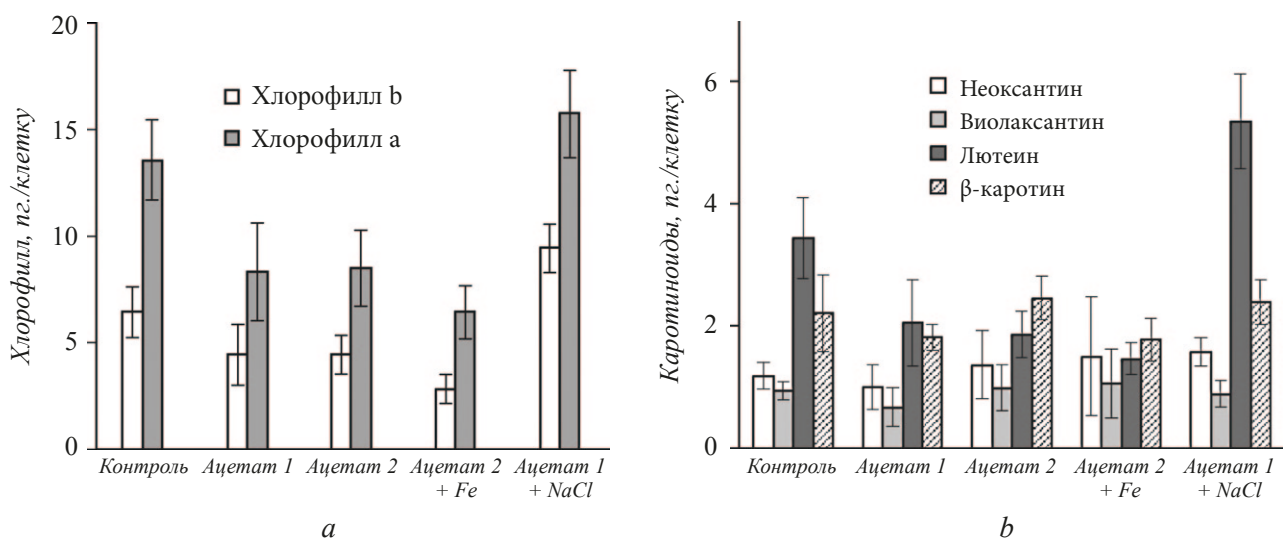


Рис. 2. Содержание хлорофиллов (a) и каротиноидов (b) в клетках *H. pluvialis* на 20-е сутки культивирования в стрессовых условиях.

Fig. 2. The contents of chlorophylls (a) and carotenoids (b) in *H. pluvialis* cells on the 20th day of cultivation under stress conditions.

свидетельствует о действии самого ацетата натрия как субстрата питания ввиду отсутствия такого эффекта при добавлении NaCl. Что касается защитного действия астаксантина, то, с одной стороны, содержание хлорофилла как правило падает в условиях действия индукторов накопления астаксантина [1, 7, 11], а с другой стороны, он может защищать хлорофилл при действии света высокой интенсивности как минимум двумя способами: экранируя свет и нейтрализуя образующиеся АФК. В пользу защитного эффекта астаксантина свидетельствуют также данные о гибели клеток при ингибировании синтеза астаксантина [16]. Возможно, отсутствие корреляции между содержанием хлорофилла и астаксантина при продолжительном действии индукторов его накопления в наших опытах связано с избыточным накоплением последнего на поздних этапах воздействия, когда часть хлорофилла уже разрушена, и различной величиной такого избыточного накопления под действием разных факторов и их комбинаций.

Приведённые результаты показывают неэффективность одновременного внесения в среду культивирования нескольких индукторов накопления астаксантина, вызывающих солевой стресс и накопление АФК (ацетат натрия + двухвалентное железо, ацетат натрия + хлорид натрия) на фоне действия света высокой интенсивности для штамма ИВСЕ-Н17 по сравнению с комбинацией (свет+ацетат натрия), если рассматривать только содержание свободного астаксантина и его эфиров. С другой стороны, комбинация (свет + ацетат натрия + хлорид натрия) оказывается эффективной с точки зрения возможности получения биомассы, богатой как астаксантином, так и фотосинтетическими пигментами. Полученные данные могут быть использованы в биотехнологическом процессе получения биомассы гематококка, обогащённой хозяйственно ценными соединениями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант №Б19РМ-010) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант №19-54-04003).

ЛИТЕРАТУРА

- Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin-Goldberg I., Zarka A., Cohen Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*. 2002, 38(2), 325–331. doi: 10.1046/j.1529-8817.2002.01107.x
- Boussiba S., Bing W., Yuan J.P., Zarka A., Chen F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stress. *Biotech. Lett.* 1999, (21), 601–4. doi: 10.1023/A:1005507514694
- Lemoine Y., Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*. 2010, 106(1–2), 155–177. doi: 10.1007/s11120-010-9583-3
- Christian D., Zhang J., Sawdon A.J., Peng C.A. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresour Technol.* 2018, 256, 548–551. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.074
- He B., Hou L., Dong M., Shi J., Huang X., Ding Y., Cong X., Zhang F., Zhang X., Zang X. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe²⁺. *International journal of molecular sciences*. 2018, 19(1), 175. doi: 10.3390/ijms19010175
- Kobayashi M. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl Environ Microbiol.* 1993, 59(3), 867–873. doi: 10.1128/AEM.59.3.867-873.1993
- Zhang C., Zhang L., Liu J. Exogenous sodium acetate enhances astaxanthin accumulation and photoprotection in *Haematococcus pluvialis* at the non-motile stage. *Journal of Applied Phycology*. 2019, (31), 1001–1008. doi: 10.1007/s10811-018-1622-z
- Ota S., Morita A., Ohnuki S., Hirata A., Sekida S., Okuda K., Ohya Y., Kawano S. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports*. 2018, 8, 5617. doi: 10.1038/s41598-018-23854-w
- Аверина Н.Г., Козел Н.В., Щербаков Р.А., Радюк М.С., Мананкина Е.Е., Гончарик Р.Г., Шальго Н.В. Влияние NaCl на продуктивность водоросли *Haematococcus pluvialis*, содержание фотосинтетических пигментов, активных форм кислорода и астаксантина. *Весті НАН Беларусі, сер. біял. навук.* 2018, 63(3), 263–275. doi: 10.29235/1029-8940-2018-63-3-263-275
- Johnson E.A., Schroeder W.A. Microbial carotenoids. *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*. 2006, 53, 119–178. doi: 10.1007/bfb0102327
- Kakizono T., Kobayashi M., Nagai S. Effect of Carbon/Nitrogen Ratio on Encystment Accompanied with Astaxanthin Formation in a Green Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1992, 74(6), 403–405. doi: 10.1016/0922-338X(92)90041-R
- Аверина Н.Г., Щербаков Р.А., Козел Н.В., Мананкина Е.Е., Гончарик Р.Г., Шальго Н.В. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на продуктивность и пигментный состав водоросли *Haematococcus pluvialis*. *Вест. Нац. акад. Беларусі. Сер. біял. навук.* 2017, (4), 21–32

13. Weesepeel Y., Gruppen H., de Bruijn W., Vincken J.P. Analysis of palmitoyl apo-astaxanthinals, apo-astaxanthinones, and their epoxides by UHPLC-PDA-ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62(42), 10254-10263. doi: 10.1021/jf503520q.
14. Yu X., Chen L., Zhang W. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 56. doi: 10.3389/fmicb.2015.00056
15. Focsan A.L., Polyakov N.E., Kispert L.D. Photo Protection of *Haematococcus pluvialis* Algae by Astaxanthin: Unique Properties of Astaxanthin Deduced by EPR, Optical and Electrochemical Studies. *Antioxidants (Basel)*. 2017, 6(4), E80. doi: 10.3390/antiox6040080
16. Fan L., Vonshak A., Zarka A., Boussiba S. Does Astaxanthin Protect *Haematococcus* against Light Damage? *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 1998, 53(1-2), 93–100. doi: 10.1515/znc-1998-1-217

Pigment Composition of *Haematococcus pluvialis* Green Alga under the Action of Several Inducers of Astaxanthin Accumulation

Y.V. VIAZAU^{1*}, R.G. GONCHARIK¹, E.A. KULIKOV², and A.A. SELISHCHEVA^{2,3}

¹ Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

² Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, 123182 Russia

³ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: viazau@yahoo.com

Received March 4, 2020

Revised March 25, 2020

Accepted July 3, 2020

Abstract—The content of astaxanthin, including its mono- and diesters, and photosynthetic pigments, has been analyzed in cells of *H. pluvialis* strain IBCE-H17 under the combined prolonged action of several inducers of astaxanthin accumulation. The effective induction of the astaxanthin accumulation, mainly in the form of monoesters of fatty acids, was shown after a 20-day cultivation under high-intensity light and with the addition of 1–2 g/l of sodium acetate to the culture medium. A simultaneous decrease in the content of chlorophylls and lutein in the *H. pluvialis* cells was observed under these conditions. The use of sodium acetate in combination with sodium chloride did not lead to noticeable changes in the content of astaxanthin compared with the use of sodium acetate alone. The obtained data can be helpful in the biotechnological production of *Haematococcus* biomass enriched with economically valuable compounds.

Key words: astaxanthin, *Haematococcus pluvialis*, pigments, sodium acetate, sodium chloride, high-intensity light.

Funding—This work was supported by Grant no. Б19PM-010 of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research and Grant no. 19-54-04003 of the Russian Foundation for Basic Research.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-29-33