

УДК 581.192.115

ВЛИЯНИЕ ОСВЕЩЕННОСТИ И АЗОТНОГО ГОЛОДАНИЯ НА РОСТ И НАКОПЛЕНИЕ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ У ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ВОДОРОСЛИ *PARIETOCHLORIS INCISA*

А.Е. Соловченко, М.Н. Мерзляк, О.Б. Чивкунова, И.В. Решетникова,
И. Хозина-Голдберг, Ш. Диди-Коэн, Ц. Коэн

(кафедра физиологии микроорганизмов, биологический факультет МГУ,
e-mail: m_merzlyak@mail.ru;

Лаборатория биотехнологии микроводорослей, Институт изучения пустынь им. Дж. Блаштейна,
Университет Бен-Гуриона, Израиль, e-mail: khozin@bgu.ac.il)

Введение

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК*), витамины группы F, являются важными компонентами питания животных и человека. Среди них особое значение имеют длинноцепочечные (C20) жирные кислоты (ЖК) ω6 серии. В частности, арахидоновая кислота (АК, 20:4ω6) входит в состав мембран, фосфолипидов нейронов головного мозга и является источником таких физиологически активных веществ, как лейкотриены и простагландины (Hansen et al., 1997). Показано ее положительное влияние на развитие детей (Koletzko, Brown, 1991). Поэтому способность некоторых микроводорослей к синтезу ПНЖК и, в частности, АК может иметь практическое значение (Cohen, 1990, 1999; Bigogno et al., 2002).

У большинства фотосинтезирующих микроводорослей ПНЖК присутствуют преимущественно в хлоропластах в полярных фосфо- и галактолипидах мембран, состав которых достаточно консервативен (Thompson 1996; Cohen, 1999). Вместе с тем в определенных условиях ряд одноклеточных водорослей обнаруживает способность к индукции синтеза нейтральных липидов в виде триацилглицеридов (ТАГ), в результате чего ЖК накапливаются клетками в больших количествах (Shifrin, Chisholm, 1981). Длинноцепочечные ПНЖК ω3-серии часто присутствуют в клетках одноклеточных водорослей, тогда как ω6-ЖК встречаются существенно реже и их содержание, как правило, существенно ниже (Cohen et al., 1992). В частности, АК практически не обнаруживается в липидах пресноводных и большинства морских водорослей (Bigogno et al., 2002).

Одноклеточная пресноводная водоросль *Parietochloris incisa* comb. nov. (Chlorophyta, Trebuxiophyceae) (Watanabe et al., 1996) способна накапливать в цитоплазматических липидных глобулах (т.н. “жировых тельцах”) большие количества ТАГ,

обогащенных ПНЖК. Существенно, что АК доминирует в ЖК составе *P. incisa*: ее содержание достигает соответственно 33,6% и 42,5% общих ЖК на логарифмической и стационарной фазах роста. При замедлении роста культуры в неблагоприятных условиях биосинтез липидов усиливается. Так, при азотном голодании до 30% сухого веса клеток приходится на долю ТАГ, в которых до 60% ЖК представлено АК. Сопоставление с другими водорослями показало, что этот организм является одним из богатейших природных источников АК (Bigogno et al., 2002; Khozin-Goldberg et al., 2002; Merzlyak et al., 2007). Проведенные ранее опыты показали, что оптимизация условий культивирования *P. incisa* с точки зрения максимальной продукции АК и биомассы является достаточно нетривиальной. Отчасти это связано с тем, что при низкой освещенности замедляется рост культуры, а при высокой — часто наблюдается ее фотоповреждение, особенно при азотном голодании (Cheng-Wu et al., 2002).

С целью выяснения условий, благоприятствующих накоплению АК, в настоящей работе исследовали влияние интенсивности освещения и наличия азота в среде на образование культурой *P. incisa* биомассы, ЖК и АК.

Материалы и методы

Условия культивирования. Культуру *P. incisa*, выделенную со склона горы Татейма в Японии (Watanabe et al., 1996), выращивали на полной (+N) и безазотной (–N) среде BG-11 (Stanier et al., 1971) в стеклянных цилиндрах при постоянном освещении люминесцентными лампами дневного света трех различных интенсивностей (табл. 1). Культуры барботировали смесью CO₂ и воздуха (1:99), температура поддерживалась на уровне 25°. Исходное содержание хлорофилла (Хл) составляло 30 мг/л во всех вариантах. Культуру, служившую иноку-

* Список сокращений: АК — арахидоновая кислота; ЖК — жирные кислоты; Кар — каротиноиды; ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты; ТАГ — триацилглицериды; Хл — хлорофилл(ы).

Таблица 1

Схема эксперимента

Условия культивирования	Вариант					
	LL* + N	ML + N	HL + N	LL-N	ML-N	HL-N
Наличие азота в среде	+	+	+	-	-	-
Освещенность, мкЭйнштейн/(м ² · с)	35	200	400	35	200	400

*Обозначения уровней освещенности: LL — низкая освещенность; ML — средняя освещенность; HL — высокая освещенность.

ломом, ежедневно разбавляли с целью поддержания ее логарифмического роста. Азотное голодание моделировали следующим образом. Клетки, осажденные центрифугированием, трехкратно отмывали стерильной дистиллированной водой и ресуспендировали в безазотной среде BG-11, после чего выращивали в описанных выше условиях.

Анализ жирных кислот и пигментов. Лиофильно высушенные клетки, экстракты липидов либо отдельные липиды трансметилировали путем инкубации с 2% H₂SO₄ в метаноле в течение 1 ч при 80°. В качестве внутреннего стандарта к образцам добавляли гептадекановую (маргариновую) кислоту. Газовую хроматографию метиловых эфиров ЖК выполняли согласно Cohen et al. (1992). Идентификацию метиловых эфиров ЖК проводили путем ко-хроматографии с чистыми веществами (Sigma, США) и по эквивалентной длине углеродной цепи (Ackman, 1969). Содержание Хл и каротиноидов (Кар) в хлороформных экстрактах определяли спектрофотометрически с использованием коэффициентов Wellburn (1994). При анализе использовали минимум две биологические повторности и по две аналитические для каждой из них.

Результаты

Влияние освещенности и азотного голодания на образование биомассы. Как видно из рис. 1, скорость роста (накопление биомассы) зависела как от наличия азота в среде, так и от интенсивности освещения. У культуры, выращиваемой при высокой интенсивности освещения на полной среде (HL + N, см. табл. 1), наблюдали самый быстрый рост; в этих условиях к 14-м суткам ее биомасса оказалась максимальной. У культур, росших при более низкой освещенности (ML + N и LL + N), накопление биомассы было в 2—2,5 раза меньше по сравнению с HL + N.

В отсутствие азота к третьим суткам культивирования культура, выращиваемая при максималь-

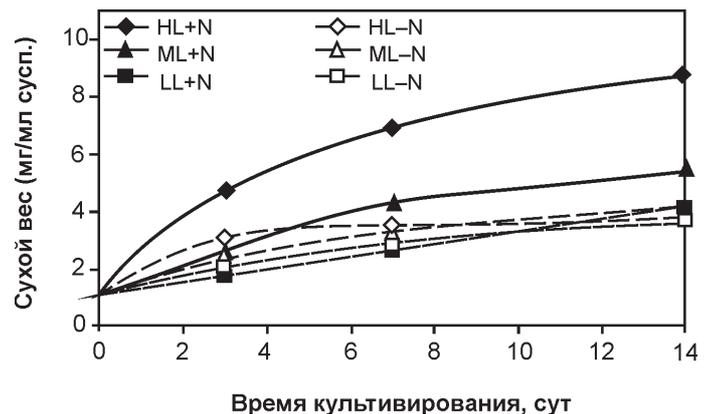


Рис. 1. Влияние освещенности и азотного голодания на рост культуры *P. incisa*

ной интенсивности света (HL-N), накопила больше биомассы, чем ML-N и LL-N, после чего ее рост остановился. В результате на безазотной среде максимальное количество биомассы накопила культура, выращиваемая при средней освещенности (ML-N), однако продукция биомассы была ниже, чем на полной среде. К 14-м суткам у культуры HL-N были зарегистрированы симптомы фотоокислительного повреждения — выцветание пигментов при синхронном снижении содержания Хл и Кар и появление пика с максимумом 410 нм на спектрах экстрактов клеток (данные не приводятся), принадлежащего продуктам фотодеструкции Хл (Мерзляк и др., 1996). Вскоре эта культура HL-N погибала. В то же время у культур ML-N и LL-N не наблюдали значительного снижения содержания Хл.

У всех культур, выращиваемых при средней и высокой освещенности, наблюдали повышение соотношения Кар и Хл, более выраженное у культур, голодавших по азоту. При этом на полной среде содержание Кар было вдвое выше, чем на безазотной среде. За счет более низкого содержания Хл культуры, росшие на среде без азота, демонстрировали существенно более высокое соотношение Кар/Хл.

Влияние освещенности и азотного голодания на состав ЖК у *P. incisa*. По данным хроматографического анализа (табл. 2), индукция синтеза ЖК и липидов происходила не только при азотном голодании, но и при выращивании *P. incisa* при высокой освещенности на полной среде. Более того, культура HL + N к 14 суткам обладала максимальным содержанием ЖК, достигавшим 35,7% сухого веса клеток, но доля АК среди них не превышала 38,4% (13,7% сухого веса). Общее содержание ЖК у культуры ML + N было ниже (17,2% сухого веса), причем почти половину (45%) из них составляла АК.

В отсутствие азота в среде во всех вариантах наблюдали повышение содержания ЖК в клетках

Таблица 2

Влияние азотного голодания и освещенности на состав и содержание (% сухого веса) жирных кислот у *P. incisa*

Вариант	Сутки культивирования	Содержание жирных кислот								АК	Сумма ЖК
		16 : 0	18 : 0	18 : 1 ω9	18 : 2	18 : 3 ω6	18 : 3 ω3	20 : 3 ω6	20 : 4 ω6		
HL + N	3	14,0	3,0	18,6	19,1	2,1	3,6	1,7	27,6	4,2	15,4
	7	9,7	2,6	22,3	15,6	1,1	1,7	1,5	36,5	9,0	24,6
	14	8,6	2,2	23,9	15,8	0,7	1,2	1,0	38,4	13,7	35,7
HL-N	3	11,4	2,0	25,0	12,5	1,6	1,6	1,1	36,5	6,8	18,6
	7	10,4	2,5	19,1	11,8	0,8	1,0	1,0	46,4	12,2	26,7
	14	9,5	2,2	14,5	10,9	0,7	0,7	0,9	52,2	15,1	28,9
ML + N	3	16,8	1,9	7,5	25,3	0,9	4,8	0,4	28,1	3,7	13,3
	7	15,2	2,3	7,7	23,7	1,1	2,7	0,7	32,2	3,7	11,7
	14	11,5	2,8	10,5	16,6	0,8	1,0	1,1	46,1	7,9	17,2
ML-N	3	13,2	2,4	11,0	13,3	1,6	2,1	1,4	44,4	6,7	15,1
	7	11,6	3,0	11,9	11,5	1,0	1,1	1,3	54,6	13,2	25,1
	14	10,4	2,7	11,1	9,7	0,7	0,7	1,2	56,5	19,0	33,5
LL-N	3	17,9	1,5	7,1	22,3	0,8	5,1	0,6	26,3	2,3	8,6
	7	16,8	1,7	7,7	23,3	0,5	3,5	0,5	24,9	2,2	8,7
	14	14,9	2,0	7,5	23,9	0,8	2,1	0,7	30,9	3,4	11,0
LL-N	3	13,5	2,4	7,3	17,7	1,7	2,9	0,9	41,4	5,3	12,8
	7	10,7	2,8	8,0	12,4	1,0	1,1	1,2	55,0	11,8	21,5
	14	10,4	2,5	7,9	10,7	0,7	0,8	1,2	58,2	14,9	25,6

Примечание. Содержание ЖК в инокулюме (0 сут) — 8,0% сухого веса, включая 1,8% АК.

водорослей. Максимальное содержание ЖК и АК (33,5 и 19,0% сухого веса соответственно) наблюдали у культуры ML-N. Содержание ЖК у культуры HL-N увеличивалось лишь на протяжении первых 7 суток культивирования, после чего практически не изменялось. При выращивании на безазотной среде при минимальной интенсивности света (LL-N) доля АК в общих ЖК была максимальной (58%), однако абсолютное содержание ЖК

у этой культуры было сравнительно низким (25,6% сухого веса).

При сопоставлении результатов анализа ЖК и пигментов (Хл и Кар) оказалось, что существует линейная зависимость ($r^2 > 0,90$) между содержанием АК и соотношением Кар/Хл у культур, голодавших по азоту и росших при средней и низкой освещенности (рис. 2). В культуре HL-N данная зависимость также существовала, но имела иной характер вследствие резкого снижения содержания Хл после 7 суток культивирования. Таким образом, соотношение Кар/Хл позволяет оценивать содержание АК в голодающих по азоту клетках *P. incisa*, растущих при низкой и средней (до 200 мкЭйнштейн/(м² · с) освещенности.

Обсуждение

Неблагоприятные условия и стрессы, например дефицит минерального (азотного) питания при чрезмерно интенсивном освещении, вызывают у некоторых одноклеточных водорослей усиление биосинтеза липидов. Предполагается, что в данных случаях избыточные фотоассимиляты, которые в отсутствие азота не могут быть утилизированы для синтеза белка и других соединений, запасаются в форме этих углеродсодержащих соединений (Thompson, 1996). Согласно существующим представлениям, об-

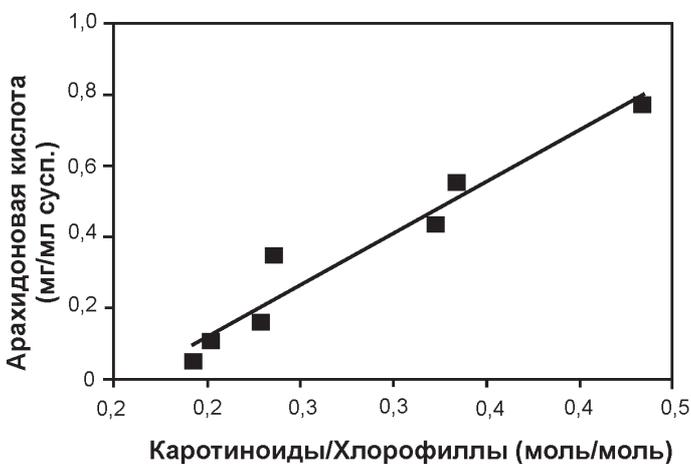


Рис. 2. Корреляция между отношением Кар/Хл и содержанием АК в *P. incisa* при росте в отсутствие азота при средней и низкой освещенности (NL-N и LL-N)

разование в этих условиях цитоплазматических липидных глобул способствует накоплению в них неполярных Кар (обычно β -каротина) либо кетокаротиноидов (например, астаксантина), которые синтезируются de novo либо секвестрируются из деградирующих тилакоидных мембран, возможно, вместе с мембранными липидами (Mendoza et al., 1999). Эти Кар, по-видимому, выполняют фотопротекторные функции (Wang et al., 2003; Zhekisheva et al., 2002; Merzlyak et al., 2007), защищая липиды, локализованные в глобулах, от фотоокисления. Подобные механизмы обнаружены у таких представителей Chlorophyta, как *Dunaliella salina* (Mendoza et al., 1999) и *Haematococcus pluvialis* (Boussiba, 2000; Zhekisheva et al., 2002).

У *P. incisa* при дефиците азота в среде также наблюдалось усиление синтеза ТАГ, содержащих высокие количества АК (табл. 2; Khozin-Goldberg et al., 2002; Merzlyak et al., 2007) и образование многочисленных липидных глобул (Merzlyak et al., 2007). Кроме того, даже при росте на полной среде высокая освещенность вызывала у этой водоросли усиление биосинтеза липидов (табл. 2), что согласуется с результатами экспериментов по культивированию *P. incisa* на открытом воздухе (Cheng-Wu et al., 2002). В этих условиях (полная среда и высокая освещенность) выход АК вдвое повышается за счет интенсивного роста и накопления биомассы культурой. Это позволяет предположить, что механизмы адаптации к дефициту азота и интен-

сивному освещению у *P. incisa* и других зеленых водорослей сходны.

Результаты работы показывают, что наряду с наличием азота в среде интенсивность освещения является важным фактором, регулирующим количественный и качественный состав липидов, а также содержание АК у *P. incisa*. Освещенность порядка 400 мкЭйнштейн/(м²·с) оптимальна для получения максимального выхода биомассы с достаточно высоким содержанием АК при выращивании на полной среде. При азотном голодании такие уровни освещенности могут вызывать фотоповреждение клеток, чего можно избежать, например, используя плотный инокулюм.

Из полученных данных также следует, что голодающие по азоту клетки более подвержены фотоповреждению. Можно предположить, что ограниченные возможности белкового синтеза негативно отражаются на функционировании систем детоксикации форм активированного кислорода и процессах репарации фотосинтетического аппарата.

* * *

Авторы благодарят за финансовую поддержку Институт изучения пустынь им. Дж. Блауштейна (BIDR, Israel), Российский фонд фундаментальных исследований (грант № 06-04-48883), а также Совет по грантам Президента РФ (грант № МК-4008.2005.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Лехи-мена Л., Жигалова Т.В., Хозина И.Ф., Коен Ц., Хрущев С.С. 1996. Спектральная характеристика продуктов фотоокисления хлорофилла в растворе и при фотоповреждении цианобактерии *Anabaena variabilis* // Физиол. раст. **43**. № 2. 186—195.
- Askman R.G. 1969. Gas-liquid chromatography of fatty acids and esters // Meth. Enzym. / Ed. J.M. Lowenstein. Vol. 14. New York. P. 329—381.
- Bigogno C., Khozin-Goldberg I., Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z. 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid // Phytochem. **60**. 497—503.
- Boussiba S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response // Physiol. Plant. **108**. 111—117.
- Cheng-Wu Z., Cohen Z., Khozin-Goldberg I., Richmond A. 2002. Characterization of growth and arachidonic acid production of *Parietochloris incisa* comb. nov (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // J. Appl. Phycol. **14**. 453—460.
- Cohen Z. 1999. Production of polyunsaturated fatty acids by the microalga *Porphyridium cruentum* // Production of Chemicals by Microalgae / Ed. Z. Cohen London. P. 1—24.
- Cohen Z., Didi S., Heimer Y. M. 1992. Over-production of γ -linolenic and eicosapentaenoic acids by algae // Plant Physiol. **98**. 569—572.
- Cohen Z. 1990. The production potential of eicosapentaenoic and arachidonic acids by the red alga *Porphyridium cruentum* // J. Am. Oil Chem. Soc. **67**. 916—920.
- Hansen J., Schade D., Harris C., Merkel K., Adamkin D., Hall R., Lim M., Moya F., Stevens D., Twist P. 1997. Docosa-hexaenoic acid plus arachidonic acid enhance preterm infant growth // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. **57**. 157.
- Khozin-Goldberg I., Bigogno C., Shreshta P., Cohen Z. 2002. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae) // J. Phycol. **38**. 1—5.
- Koletzko B., Braun M. 1991. Arachidonic acid and early human growth: is there a relation? // Ann. Nutr. Metabol. **35**. 128—131.
- Mendoza H., Martel A., Jimenez del Rio M., Garcia Reina G. 1999. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina* // J. Appl. Phycol. **11**. 15—19.
- Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Gorelova O.A., Reshetnikova I.V., Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Cohen Z.

2007. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. **43**. N 4. (в печати).

Shifrin N.S., Chishlom S.W. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate, and light—dark cycles // J. Phycol. **17**. 374—384.

Stanier R.Y., Kunisawa M.M., Cohen-Bazir G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chlorococcales) // Bacteriol. Rev. **35**. 171—201.

Thompson Jr. G.A. 1996. Lipids and membrane function in green algae // Biochim. Biophys. Acta **1302**. 17—45.

Wang B., Zarka A., Trebst A., Boussiba S. 2003. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus*

pluvialis (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance // J. Phycol. **39**. 1116—1124.

Watanabe S., Hirabashi S., Boussiba S., Cohen Z., Vonshak A., Richmond A. 1996. *Parietochloris incisa* comb. Nov. (Trebuxiophyceae, Chlorophyta) // Phycol. Res. **44**. 107—108.

Wellburn A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Physiol. **144**. 307—13.

Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin-Goldberg I., Zarka A., Cohen Z. 2002. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters // J. Phycol. **38**. 325—31.

EFFECTS OF LIGHT IRRADIANCE AND NITROGEN STARVATION ON THE ACCUMULATION OF ARACHIDONIC ACID BY THE MICROALGA *PARIETOCHLORIS INCISA*

A.E. Solovchenko, M.N. Merzlyak., O.B. Chivkunova, I.V. Reshetnikova, I. Khozin-Goldberg, S. Didi-Cohen, Z. Cohen

Parietochloris incisa is a unicellular, fresh water green alga, capable of accumulating high amounts of the valuable very long chain polyunsaturated arachidonic acid (AA) in triacylglycerols (TAG) of cytoplasmic oil-bodies. To find out the cultivation conditions providing maximum AA yield, the effects of light irradiance and N- availability on the dry weight (DW), chlorophyll, carotenoid and AA content have been studied. Under nitrogen starvation, TAG accounted for over 30% of dry weight (DW) and AA content became as high as ~ 55% of total fatty acids. From the standpoint of biomass accumulation, light intensity of ca. 400 $\mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ was found to be optimal for growing *P. incisa* on complete medium. Lower light intensities (or higher cell density of inoculum) resulted in higher AA yield when the alga was cultivated on nitrogen-free media. In the absence of nitrogen, algal cells were unable to cope with high light and suffered from photooxidative damage, whereas the nitrogen-sufficient culture survived under such illumination conditions probably due to accumulation of carotenoids. Nitrogen-deprived *P. incisa* cells displayed elevated sensitivity to light.