

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2016, 26(1):33-45

<http://dx.doi.org/10.15407/alg26.01.033>

УДК 577.11

О.В. СИТАР<sup>1</sup>, О.П. ОЛЬХОВИЧ<sup>1</sup>, Е.В. КАРАУШУ<sup>1</sup>, Р. ШТОРАНДТ<sup>2</sup>, П. ВАЛДЕК<sup>2</sup>,  
Н.Ю. ТАРАН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра физиологии и экологии растений, ННЦ Институт биологии,  
Киевский национальный ун-т им. Тараса Шевченко,  
ул. Владимирская, 64, Киев 01601, Украина  
e-mail: o\_sytar@ukr.net

<sup>2</sup>Отдел биотехнологии, Институт переработки зерна,  
Артур Шонер аллея, 40/41, Нюзетал 14558, Германия

### **ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА КЛЕТОК *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* СС-124 ДИКОГО ШТАММА [137С] В УСЛОВИЯХ МИКСОТРОФНОГО И ФОТОТРОФНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Исследованы особенности метаболизма клеток *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 дикого штамма [137с], мутантного по генам *nit1* и *nit2*, характеризующихся невосприимчивостью клеток *Chlamydomonas* к нитратной среде в условиях фото- и миксотрофного культивирования. Установлено, что по содержанию хлорофиллов и сульфолипида в клетках *Ch. reinhardtii* в условиях миксо- и фототрофного питания лучшими оказались фототрофные условия. Показано, что общее содержание исследуемых аминокислот в *Ch. reinhardtii* при переходе от фото- к миксотрофному способу питания увеличилось в 1,5 раза. Среди исследуемых аминокислот выявлено 5 незаменимых: валин, триптофан, фенилаланин, метионин и лейцин. Общее содержание незаменимых аминокислот увеличилось почти в 2 раза. Показатель соотношения суммы заменимых к сумме незаменимых аминокислот при фототрофном питании составлял 3,27, а при миксотрофном – 2,56, что свидетельствует о росте содержания незаменимых аминокислот и лучшей сбалансированности аминокислотного состава при миксотрофных условиях выращивания. Обсуждается возможность регулирования с помощью условий выращивания продукции определенных метаболитов *Ch. reinhardtii* СС-124 дикого штамма [137с].

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 дикий штамм [137с], биотехнология водорослей, аминокислоты, сульфолипиды, белок, фото- и миксотрофное питание.

#### **Введение**

Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. – модельный организм, широко используемый для изучения фундаментальных аспектов фотосинтеза, фото- и хемотаксиса, циркадных клеточных циклов, механизмов фоторецепции, биосинтеза белка, адаптации к стрессовым условиям окружающей среды и т.д. Большое значе-

© О.В. Ситар, О.П. Ольхович, Е.В. Караушу, Р. Шторандт, П. Валдек, Н.Ю. Таран, 2016

ние имеют работы, выполненные с использованием диких и мутантных штаммов *Ch. reinhardtii* и связанные с разработкой основ биотехнологии получения фотоводорода (Hemschemeier et al., 2008; Zolotareva et al., 2010; Pinto et al., 2013), а также исследования роли углеродного питания в накоплении липидов клетками микроводоросли (Siaut et al., 2011; Merchant et al., 2012; Ramanan et al., 2013).

*Chlamydomonas reinhardtii* может расти как автотрофно – с использованием энергии света и атмосферного  $\text{CO}_2$  в качестве единственного источника углерода, так и гетеротрофно, ассимилируя ацетат. Другие источники углерода, такие как сахароза, глюкоза или экзогенные аминокислоты, не утилизируются *Ch. reinhardtii* (Harris, 1989). Ацетат поддерживает также миксотрофный рост *Ch. reinhardtii* при освещении. При всех условиях культивирования клетки микроводоросли остаются зелеными и сохраняют нормально развитые хлоропласты, что свидетельствует об их способности адаптироваться к утилизации восстановленного углерода из различных источников – как внутрихлоропластного депо (крахмал), так и цитоплазматического ацетата. Это обстоятельство позволяет рассматривать *Chlamydomonas* в качестве хорошей модели для изучения взаимосвязи между фотосинтетическим и нефотосинтетическим метаболизмом углерода.

Поглощение ацетата – АТФ-зависимый процесс, в ходе которого он трансформируется в ацетилкоэнзим А (ацетил-КоА) либо с участием ацетил-КоА-синтетазы в ходе прямого преобразования, либо в двухстадийной реакции, катализируемой ацетаткиназой и фосфат-ацетилтрансферазой (Perez-Garcia et al., 2011; Merchant, 2012). Ацетил-КоА метаболизируется преимущественно в митохондриях и глиоксисомах, вступая в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) и глиоксилатный цикл соответственно. Установлено, что глиоксилатный цикл, продуцирующий сукцинат (С4), активен преимущественно на свету, тогда как в темноте основное количество ацетил-КоА поступает в ЦТК (Sweetlove et al., 2010). При функционировании ЦТК образуется НАДФН, энергетически обеспечивающий окислительное фосфорилирование, а углерод из ацетата высвобождается в форме  $\text{CO}_2$  (Johnson, Alric, 2013). Очевидно, что в метаболизации ацетата в миксотрофной культуре принимают участие четыре клеточных компартмента – хлоропласты, митохондрии, глиоксисомы и цитозоль, однако механизмы согласования процессов, протекающих в этих компартментах, также как и механизмы, отвечающие за переход от автотрофии к гетеротрофии и миксотрофии, до настоящего времени не установлены (Singh et al., 2014).

В условиях миксотрофного культивирования ацетат частично ингибирует фотосинтез (Endo, Asada, 1996) и подавляет экспрессию ядерных генов, кодирующих полипептиды светособирающего комплекса и белки, участвующие в фиксации неорганического углерода (Heifetz et al., 2000). В присутствии ацетата на свету стимулируется дыхание (Endo, Asada, 1996), что, очевидно, связано с активацией альтернативной

оксидазы. Эти процессы могут индуцировать накопление липидных капель (Merchant, 2012) или светоиндуцированное выделение водорода (Fouchard et al., 2005). В последнем случае присутствие ацетата в культуральной среде необходимо.

Помимо изменений в метаболическом состоянии клетки и восстановительного состояния фотосинтетической электронтранспортной цепи, ацетат в среде может непосредственно влиять на фотосистему II (ФСII). Скорость фотосинтеза даже в присутствии 5 % CO<sub>2</sub> в клетках *Ch. reinhardtii*, культивирующихся миксотрофно, снижается по сравнению с автофототрофной культурой (Heifetz et al., 2000). Предполагается, что ацетат замещает бикарбонат, прочно связанный с негемовым железом в ФСII, и частично ингибирует фотосинтетическое выделение кислорода (Roach et al., 2013), что способствует формированию микроанаэробных условий, необходимых для индукции гидрогеназной активности.

Таким образом, в присутствии ацетата – единственного метаболита, утилизирующегося *Ch. reinhardtii*, происходит глубокая трансформация целого ряда биохимических систем в клетках микроводоросли, изученная к настоящему времени лишь фрагментарно.

Целью данной работы было изучение изменения биохимического состава клеток *Ch. reinhardtii* при различных условиях культивирования.

### Материалы и методы

В работе был использован *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 дикого штамма [137с], полученный Смитом и изолированный в 1945 г. Амхерстом. Есть основания считать его эквивалентным штамму 11/32d из коллекции Центра культуры водорослей и простейших. Данный штамм был транспортирован в университет Дюка в 1968 г. из лаборатории Левина в Гарварде.

СС-124 вызывает мутации генов *nit1* и *nit2*; данные штаммы *Chlamydomonas* не могут утилизировать нитраты и, следовательно, расти на среде, где нитраты выступают в качестве единственного источника азота. *Chlamydomonas* в качестве источника азота вместо нитратов использует аммиак или мочевины. Эта особенность была учтена при создании мутаций генов *nit1* и *nit2* в процессе выращивания *Chlamydomonas* на среде, содержащей аммиак (Pröschold et al., 2005).

СС-124 несет аллель AGG1 фотозависимой агрегации. AGG1 аллель был обнаружен в штамме дикого типа СС-124 (Smyth, Ebersold, 1985) как негативно фототаксичный. AGG1 клетки проявляют сильный негативный фототаксис и образуют плотный осадок на дне жидкой культуры.

Питательной средой при фототрофном культивировании *Chlamydomonas* была стандартная среда HSM (Sueoka, 1960), а при миксотрофном – TAP-среда (Gorman, Levine, 1965). Температура выращивания поддерживалась на уровне 25 °С; pH 7, а освещение ~ 100 μmol квантов м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. Известно (Stepanov, Zolotareva, 2014), что

культура *Ch. reinhardtii* при начальной концентрации клеток 1 млн/мл выходит на экспоненциальную фазу роста через три недели и достигает стационарной фазы через 7–10 суток культивирования. Культуры для исследования отбирали на третью неделю после начала культивирования в экспоненциальной фазе роста и высушивали до воздушно-сухого состояния.

*Определение содержания пигментов и сульфолипида.* Навеску воздушно-сухой биомассы водоросли (0,2 г) гомогенизировали с 0,5 г стеклянного порошка и 0,5 г  $\text{Na}_2(\text{SO}_4)$  безводн. Гомогенат переносили в стеклянную колонку с фильтром, добавляли 3 мл ацетона и отфильтровывали. Для определения содержания пигментов 100 мкл ацетонового экстракта переносили в пробирку и добавляли 3 мл ацетона. Экстракт пигментов анализировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 при длине волны 440,5; 644 и 664 нм.

Для определения содержания сульфолипида к ацетоновому фильтрату добавляли 1 мл раствора гексан/бензола (4 : 1) и 2 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , центрифугировали при 1500 г в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем к 1 мл раствора, отобранного из нижней фракции, добавляли 1 мл 0,01 % азура (в растворе ацетона), 2 мл бензола и снова центрифугировали при 1500 г в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее раствор из верхней фракции отбирали в кювету и измеряли оптическую плотность при 610 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1800. Содержание сульфолипида рассчитывали по стандартной калибровочной кривой по додецилсульфату натрия с применением метода Кона (Kean, 1968).

*Определение белка биуретовым методом.* Сухую массу, оставшуюся на фильтре после отмывания ацетоном, переносили в пробирку и добавляли 4 мл 2,5 % трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования в течение 5 мин при 1500 г супернатант удаляли и всю процедуру повторяли. Далее проводили аналогичный опыт с использованием 5 мл дистиллированной воды, добавляли 5 мл 0,05 н. NaOH и центрифугировали, отбирали 3 мл верхней фракции и смешивали с 0,5 мл биуретового реактива (Gornall et al., 1949). Оптическую плотность при 550 нм измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800.

*Определение содержания аминокислот с помощью тандемной масс-спектрометрии.* Содержание аминокислот определяли методом тандемной масс-спектрометрии (Mikhaylova et al., 2004) с помощью масс-спектрометра AB Sciex 2000 с автосамплером Ultimate 3000 (Dionex). Для анализа использовали диск диаметром 3 мм. При подготовке образцов к каждой пробе (20 мкл экстракта, который использовали для определения белка) добавляли внутренний стандарт (смесь меченых дейтерием аминокислот с известными концентрациями) в количестве 200 мкл на образец. После инкубации с внутренним стандартом образцы высушивали и проводили дериватизацию с помощью 3N бутанол/HCl. Высушенные образцы растворяли в реконституционном буфере и загружали в автосамплер Ultimate 3000.

Для расчета количества аминокислот в опытном образце на колонку автоматического анализатора предварительно наносили стандартную смесь с известной концентрацией каждой аминокислоты. На хроматограмме рассчитывали площадь пика каждой аминокислоты. Количество микромолей для каждой аминокислоты ( $X_1$ ) в исследуемом растворе вычисляли по формуле:

$$X_1 = S_1 / S_0,$$

где  $S_1$  – площадь пика аминокислоты в исследуемом образце;  $S_0$  – площадь пика этой же аминокислоты в растворе стандартной смеси аминокислот, что соответствует 1 мкмолью каждой аминокислоты.

Количество микромолей в миллиграммах получали, умножая количество микромолей определенной аминокислоты на соответствующую ей молекулярную массу. Качественный состав смеси аминокислот определяли, сравнивая хроматограмму опытного образца со стандартной смесью аминокислот (Ovchinnikova, 1974).

Биологические и аналитические исследования проводили в 3-кратной повторности. Результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Office Excel, они считались достоверными (по  $t$ -критерию Стьюдента) при уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ влияния миксо- и фототрофного питания на *Ch. reinhardtii* CC-124 показал, что более эффективными по содержанию сульфолипида в тиллакоидных мембранах оказались фототрофные условия культивирования (рис. 1). При фототрофном питании исследуемый показатель составлял 0,8 мг/г сух. вещества, тогда как при миксотрофном – 0,62, т.е. превышал на 20 %. Известно, что у *Ch. reinhardtii* максимальное содержание сульфолипида может достигать 11 % (Sato, 2004).

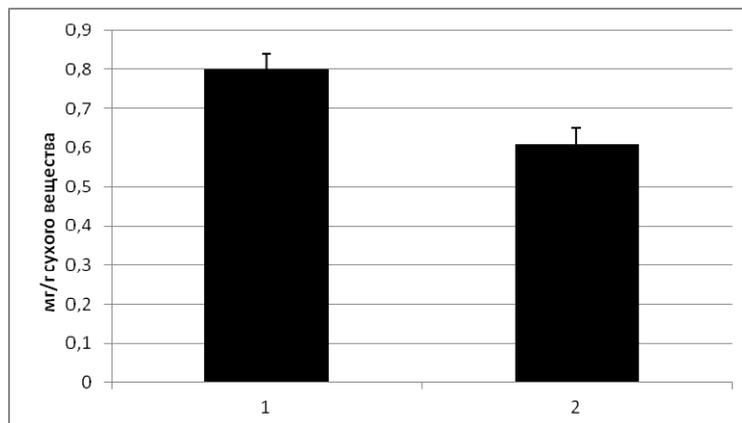


Рис. 1. Содержание сульфолипида (мг/г сух. вещ.) у *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 при фото- (1) и миксотрофном (2) питании

При фототрофных условиях питания у *Ch. reinhardtii* СС-124 наблюдалось увеличение содержания хлорофиллов: общее – в 4,5 раза, хлорофилла *a* – в 3 раза, хлорофилла *b* – в 7 раз (рис. 2).

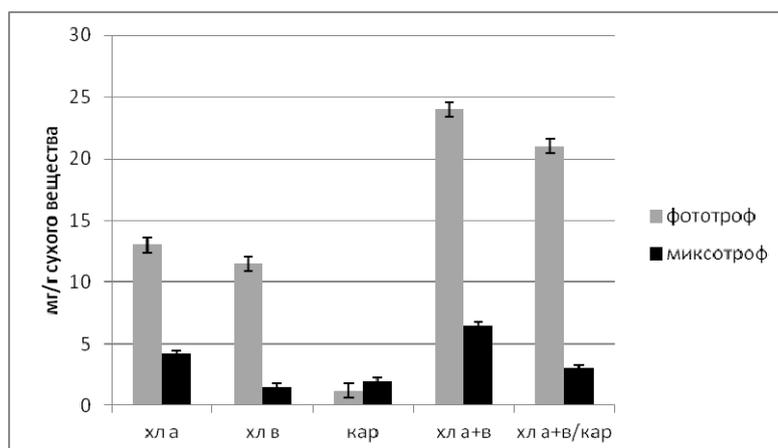


Рис. 2. Содержание пигментов (мг/г сух. вещ.) у *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 при фото- и миксотрофном питании

Поскольку содержание белка в биомассе водорослей зависит не только от видовых особенностей, но и от условий культивирования (Mushak, 2007), предполагалось, что белковый обмен клеток водоросли *Ch. reinhardtii* СС-124 будет различным в зависимости от типа культивирования в условиях фото- и миксотрофного питания. Однако нами не выявлено существенных различий в содержании общего белка в опытных вариантах (рис. 3). В то же время было установлено различие в количестве и соотношении аминокислот при фото- и миксотрофном питании микроводорослей. У микроводоросли *Ch. reinhardtii* СС-124 нами было идентифицировано 17 аминокислот и определены их количества в условиях фото- и миксотрофного выращивания (рис. 4).

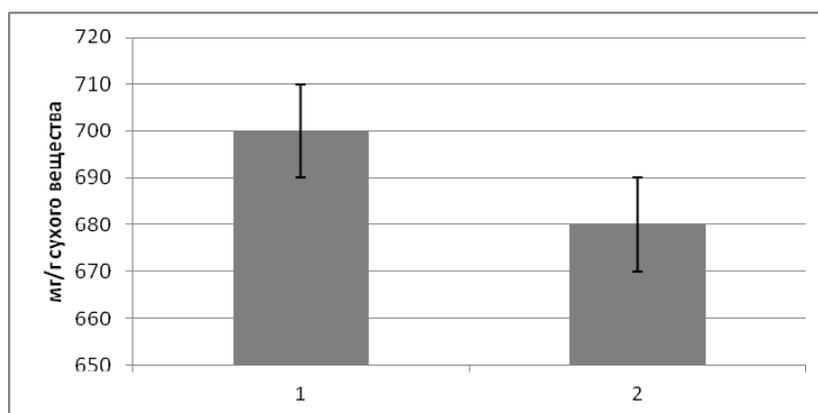


Рис. 3. Содержание белка (мг/г сух. вещ.) в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 при фото- (1) и миксотрофном (2) питании

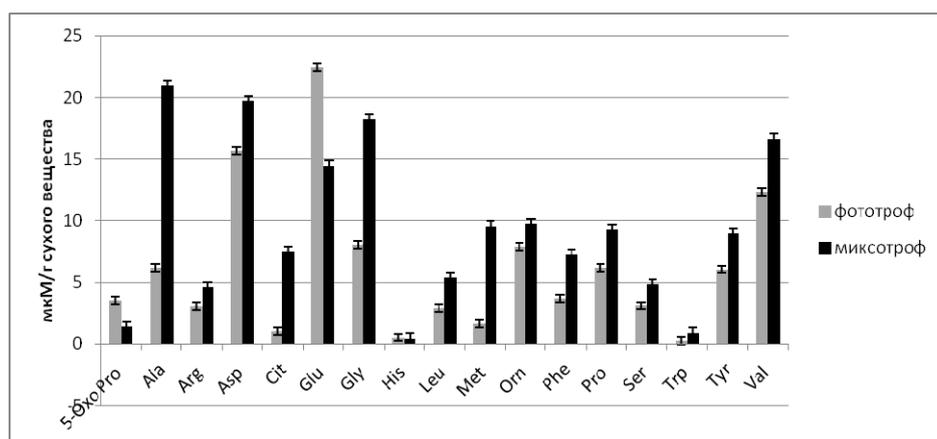


Рис. 4. Содержание аминокислот (мкМ/г сух. вещ.) в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 при фото- и миксотрофном питании (5-Охо-Pro – 5-оксипролин, Ala – аланин, Arg – аргинин, Asp – аспарагин, Cit – цитруллин, Glu – глутаминовая кислота, Gly – глицин, His – гистидин, Leu – лейцин, Met – метионин, Orn – орнитин, Phe – фенилаланин, Pro – пролин, Ser – серин, Trp – триптофан, Tyr – тирозин, Val – валин)

Общее содержание исследуемых аминокислот в *Ch. reinhardtii* СС-124 при переходе от фото- к миксотрофному способу питания увеличилось в 1,5 раза – с 104,62 до 159,75 мкМ/г. Такие различия обусловлены увеличением содержания 14 из 17 исследуемых аминокислот. Существенно изменялось содержание аланина (более чем в 3 раза), глицина (более чем в 2 раза), фенилаланина (почти в 2 раза), пролина и серина (в 1,5 раза) (см. рис. 4).

При переходе от фотосинтетического к миксотрофному питанию достоверно повысилось содержание аланина, глицина и метионина, а содержание глутаминовой кислоты снизилось в 1,5 раза. Она образуется на втором этапе глутаматсинтезного цикла в результате присоединения кетоглутарата к глутамину с использованием энергии НАДН или восстановленного ферредоксина. Глутамат принимает участие во многих аминотрансферазных реакциях и выступает донором аминогруппы в реакциях биосинтеза как аминокислот, так и вторичных метаболитов, поэтому снижение его уровня в клетках *Ch. reinhardtii* свидетельствует об уменьшении роли глутаматсинтезного цикла при переходе от автотрофии к гетеротрофии. Имеются также данные о повышении содержания внутриклеточного НАДФН, водорасстворимых протеинов и свободных аминокислот при добавлении в культуру *Ch. reinhardtii* метанола, который является источником энергии и карбона (Stepanov, Zolotareva, 2014).

Содержание аланина при миксотрофных условиях культивирования увеличилось в 3 раза. Было показано, что внутриклеточное содержание аланина увеличивается при выращивании *Ch. reinhardtii* в атмосфере

насыщенной CO<sub>2</sub> (Renberg et al., 2010) при одновременном увеличении глутамин и аспартата.

В условиях миксотрофии увеличилось содержание аминокислот цикла дыхания – серина и глицина. Глицин у *Ch. reinhardtii* образуется в митохондриях из глиоксилата путем трансминирования с глутаматом. В цитоплазме глицин может синтезироваться из серина в обратимой серингидроксиметилтрансферазной реакции в присутствии N<sub>4</sub>-фолат (Hanson, Roje, 2001), а также в митохондриях вследствие трансминирования серина с глиоксилатом (Ho, Saito, 2001). При этом из двух молекул глицина при участии глициндекарбоксилазного комплекса образуется одна молекула серина.

При миксотрофных условиях культивирования *Ch. reinhardtii* в его клетках более чем в 2 раза увеличивается содержание глицина и немного меньше – серина. В цитоплазме глицин и серин могут быстро взаимно превращаться благодаря активности серингидроксиметилтрансферазы.

При адаптации *Ch. reinhardtii* к пониженному содержанию CO<sub>2</sub> одновременно со значительным увеличением содержания глицина усиливается синтез гликолата (Renberg et al., 2010). Таким образом, при переходе от автотрофии к гетеротрофии можно предположить активизацию работы цикла на уровне образования гликолата.

При переходе к миксотрофии значительно (в 5 раз) увеличивается внутриклеточное содержание свободного метионина. Такое увеличение может быть результатом общего снижения биосинтеза протеинов, которое наблюдалось в наших исследованиях.

Синтез циклических аминокислот (триптофана, тирозина и фенилаланина) у *Ch. reinhardtii* происходит так же, как и у высших растений. Они все образуются из общего предшественника хоризмата. При миксотрофном культивировании в клетках *Ch. reinhardtii* увеличивается содержание всех трех циклических аминокислот, что можно объяснить активацией специфической гидроксилазы ароматических аминокислот. Кроме того, у *Ch. reinhardtii* клеточная обложка содержит обогащенный тирозином гликопротеин (Waffenschmidt et al., 1993), содержание которого может увеличиваться в качестве адаптивной реакции в связи с изменением условий выращивания.

Среди исследуемых аминокислот обнаружено 5 незаменимых: валин, триптофан, фенилаланин, метионин и лейцин. Их количество увеличилось почти в 2 раза (с 20,92 до 39,73 мкМ/г): содержание триптофана – на 8,89 мкМ/г, метионина – на 7,88, валина – на 4,31, фенилаланина – на 3,53 и лейцина – на 2,45 мкМ/г. Такие изменения содержания аминокислот подтверждаются предыдущими исследованиями по фото- и миксотрофным особенностям питания микроводоросли *Chlamydomonas*. В частности, было показано, что при выращивании на свету и с добавлением *трис*-ацетатфосфата в питательную среду клетки *Ch. reinhardtii* СС-124 используют следующие L-аминокислоты в качестве единственного источника азота: аспарагин,

глутамин, аргинин, лизин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, метионин, гистидин и фенилаланин, тогда как при отсутствии ацетата, клетки используют только L-аргинин (Mucoz-Blanco et al., 1990). При миксотрофном культивировании *Ch. reinhardtii* СС-124 нами отмечено увеличение суммарного содержания заменимых и незаменимых аминокислот (рис. 5).

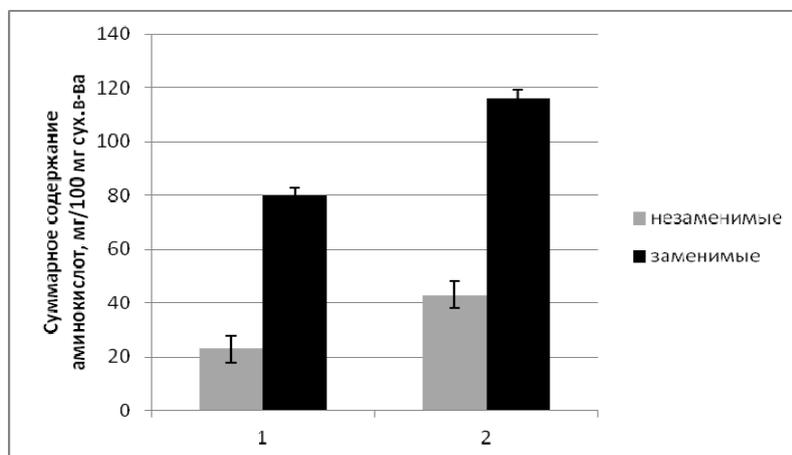


Рис. 5. Суммарное содержание заменимых и незаменимых аминокислот (мг/100 мг сух. вещ.) в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124 при фото- (1) и миксотрофном (2) питании

Показатель соотношения суммы заменимых к сумме незаменимых аминокислот при фототрофном питании составлял 3,27, а при миксотрофном – 2,56, что свидетельствует об увеличении содержания незаменимых аминокислот и изменении баланса аминокислотного состава при миксотрофных условиях выращивания.

В последние годы особое внимание ученых сосредоточено на исследовании содержания сульфоинозитил-диацилглицерола (СХДГ) в клетках микроводорослей, поскольку его можно использовать для профилактики и лечения заболеваний кожи, особенно псориаза, он обладает также СПИД-антивирусными свойствами. В настоящее время ведется активный поиск источников сырья из цианобактерий, растений и водорослей (Kirk et al., 1989). В 2012 г. было установлено, что СХДГ ограничивает рост микобактерий туберкулеза в человеческих макрофагах в результате видоспецифических взаимодействий (Gilmore et al., 2012), что может быть использовано при лечении туберкулеза. Значительный интерес к серосодержащим липидным соединениям определяет еще один очень перспективный и важный аспект промышленного выращивания водорослей – регуляцию содержания ценных метаболитов в процессе культивирования.

Сульфолипиды найдены почти во всех фотосинтезирующих растениях и цианобактериях, за исключением *Gloeobacter violaceus* PCC 7421

(Selstam, Campbell, 1996; Palsdottir, Hunte, 2004; Athenstaedt, Daum, 2006). В цианобактериях их количество, как правило, значительно выше, чем в хлоропластах высших растений и зеленых водорослей.

Известно, что синтез сульфолипида осуществляется путем двух последовательных реакций. В результате первой реакции УДФ-сульфохиновоза синтезируется из УДФ-глюкозы и сульфита с участием УДФ-сульфохиновазилсинтетазы, которая у растений и цианобактерий кодируется SQD1 и sqdB генами. Во время второй реакции сульфохиновоза транспортируется из УДФ-сульфохиновозы в диацилглицерол с участием СХДГ (сульфохиновазилдиацилглицерол)-синтазы, которая кодируется SQD2 и sqdX генами (Sato, 2004). Изучение мутантов, дефектных по данным генам, способствовало установлению физиологической роли сульфолипида в жизнедеятельности водорослей, в частности зеленых.

Содержание сульфолипида в мембранах тиллакоидов определенным образом связано с содержанием пигментов (Okanenko et al., 2011). Одним из главных мембранных липидов, которые входят в состав тиллакоидных мембран хлоропластов, является СХДГ, который используют как их специфический маркер.

Сульфолипид благодаря своим свойствам имеет большое значение в процессе биосинтеза белка. От количества сульфолипида в клетках *Ch. reinhardtii* зависит и содержание белка. В условиях серного голодания может происходить деградация СХДГ (до 85 %) с последующим включением его серы в значительную часть белковой фракции. Можно предположить, что при определенных условиях сульфолипид может выступать основным внутренним источником серы для биосинтеза белка.

Известно, что у штаммов, которые не испытывают дефицита серы, распад СХДГ не происходит. Более того, при недостатке в организме серы деградация СХДГ предшествует синтезу такого важного белка, как РУБИСКО, т.е. его синтез также связан с эндогенным происхождением серы. Установлена также роль СХДГ для стабилизации фотосистемы I. Именно поэтому содержание СХДГ может комплексно влиять на рост и развитие микроводорослей (Sugimoto et al., 2010).

Большое значение для жизнедеятельности водорослей имеет белковый обмен. Количество белка является качественным показателем производительности и жизнеспособности водорослей. В силу различных свойств белковых соединений именно они обуславливают многообразие ответных реакций водорослей на различные воздействия. Известно, что в условиях выращивания водорослей в миксотрофной и автотрофной культурах можно получить биомассу с совершенно разным выходом белка, аминокислот, каротиноидов, липидов и других важных соединений (Wan et al., 2011).

Таким образом, регулируя рост и развитие микроводорослей, подбирая для каждого вида оптимальные условия выращивания, можно получить максимальный выход конкретных промышленно ценных

соединений. Поскольку именно аминокислотный состав является главным критерием оценки биологической ценности белка, это может иметь существенное значение при промышленном культивировании *Ch. reinhardtii* СС-124.

#### Выводы

Биомасса *Chlamydomonas reinhardtii* СС-124, полученная при миксотрофном питании, отличается повышенным содержанием хлорофиллов, сульфолипида и аминокислот от биомассы при фототрофном питании. Общее содержание исследуемых аминокислот у *Ch. reinhardtii* СС-124 при переходе от фото- к миксотрофному способу питания увеличивается в 1,5 раза, с 104,62 до 159,75 мкМ/г, при этом изменяется содержание и соотношение отдельных аминокислот, в т.ч. незаменимых.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного агентства по вопросам науки, инноваций и информации Украины (договор М/266-2012).*

#### REFERENCES

- Athenstaedt K. and Daum G., *Cell. and Mol. Life Sci.*, 2006, 63:1355-1369.
- Endo T. and Asada K., *Plant Cell Physiol.*, 1996, 37:551-555.
- Fouchard S., Hemschemeier A., Caruana A., Pruvost J., Legrand J., Happe T., Peltier G., and Cournac L., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(10):6199-6205.
- Gilmore S., Schelle M., Holsclaw C., Leigh C., Jain M., Cox J., Leary J., and Bertozzi C., *ACS Chem. Biol.*, 2012, 7:863-870.
- Gorman D.S. and Levine R.P., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1965, 54:1665-1669.
- Gornall A.G., Bardawill C.J., and David M.M., *J. Biol. Chem.*, 1949, 177(2):751-766.
- Hanson A.D. and Roje S., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 2001, 52:119-137.
- Harris E.H., *A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, Acad. Press, San Diego, 1989, 780 p.
- Heifetz P.B., Förster B., Osmond C.B., Giles L.J., and Boynton J.E., *Plant Physiol.*, 2000, 122(4):1439-1446.
- Hemschemeier A., Fouchard S., Cournac L., Peltier G., and Happe T., *Planta*, 2008, 227(2):397-407.
- Ho C.L. and Saito K., *Amino Acids.*, 2001, 20:243-259.
- Johnson X. and Alric J., *Eucaryot. Cell*, 2013, 12:776-793.
- Kean E., *J. Lipid Res.*, 1968, 9:319-329.
- Kirk R. Gustafson, John H., Cardellina I.I., Richard W. Fuller, Owen S. Weislow, Rebecca F. Kiser, Kenneth M. Snader, Gregory M.L. Patterson, Michael R., and Boyd, *JNCI J. Natl. Canc. Inst.*, 1989, 81:1254-1258.
- Merchant S.S., Kropat J., Liu B., Shaw J., and Warakanont J., *Curr. Opin. Biotech.*, 2012, 23:352-363.
- Mikhaylova S.V., Baydakova G.V., Boukina A.M., Boukina T.M., Shechter O.V., Ilina E.S., and Zakharova E.Y., *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2004, 27(1):3-39.
- Mucoz-Blanco J., Hidalgo-Martínez J., and Cárdenas J., *Planta*, 1990, 182(2):194-198.

- Mushak P.A., *Ukr. Bot. J.*, 2007, 64(1):132-139.
- Okanenko A., Taran N., and Kosyk O., *Sulfosoderzhaschiye lipidy (Sulfurcontaining plant lipids)*, Avega, Kiev, 2011, 92 p. (In Rus.)
- Ovchynnikova Yu.A., *Novye metody analiza aminovikh kislot, peptidov i proteinov (New methods of analysis of amino acids, peptides and proteins)*, Mir Publ., Moscow, 1974, 154 p. (In Rus.)
- Palsdottir H. and Hunte C., *Biochim. et Biophys. Acta*, 2004, 1666:2-18.
- Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., de-Bashan L.E., and Bashan Y., *Water Res.*, 2011, 45: 11-36.
- Pinto T.S., Malcata F.X., Arrabaça J.D., Silva J.M., Spreitzer R.J., and Esquível M.G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97(12):35-43.
- Pröschold T., Harris E., and Coleman A., *Genetics*, 2005, 170(4):1601-1610.
- Ramanan R., Kim B.-H., Cho D.-H., Ko S.-R., Oh H.-M., and Kim H.-S., *FEBS Lett.*, 2013, 587(4):37-377.
- Renberg L., Johansson A.I., Shutova T., Stenlund H., Aksmann A., Raven J.A., Gardeström P., Moritzand T., and Samuelsson G., *Plant Physiol.*, 2010, 154:187-196.
- Roach T., Sedoud A., and Krieger-Liszka A., *Biochim. et Biophys. Acta*, 2013, 1827(10): 1183-1190.
- Sato N., *J. Plant Res.*, 2004, 117:495-505.
- Selstam E. and Campbell D., *Arch. Microbiol.*, 1996, 166:132-135.
- Siaut M., Cuiñé S., Cagnon C., Fessler B., Nguyen M., Carrier P., Beyly A., Beisson F., Triantaphyllidès C., Li-Beisson Y., and Peltier G., *BMC Biotechnol.*, 2011, 11:7-21. doi:10.1186/1472-6750-11-7.
- Singh H., Shukla M.R., Chary K.V.R., and Rao B.J., Acetate and Bicarbonate Assimilation and Metabolite Formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: A <sup>13</sup>C-NMR Study, *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e106457. doi:10.1371/journal.pone.0106457.
- Smyth R.D. and Ebersold W.T., *Genet. Res.*, 1985, 46:133-148.
- Stepanov S. and Zolotareva E., *Appl. Phycol.*, 2014, 12:18.
- Sueoka N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1960, 46:83-91.
- Sugimoto K., Tsuzuki M., and Sato N., *New Phytol.*, 2010, 185:676-686.
- Sweetlove L.J., Beard K.F.M., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., and Ratcliffe R.G., *Trends Plant Sci.*, 2010, 15:462-470.
- Waffenschmidt S., Woessner J.P., Beer K., and Goodenough U.W., *Plant Cell*, 1993, 5: 809-820.
- Wan M., Liu P., Xia J., Rosenberg J., Oyler G., Betenbaugh M., Nie Z., and Qiu G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91:835-844.
- Zolotareva E.K., Shnyukova E.I., and Podorvanov V.V., *Int. J. Algae*, 2010, 12(3):199-220.

Поступила 7 апреля 2015 г.

Подписал в печать А.И. Божков

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2016, 26(1):33-45

<http://dx.doi.org/10.15407/alg26.01.033>

O.V. Sytar<sup>1</sup>, O.P. Olkhovych<sup>1</sup>, O.V. Karaushu<sup>1</sup>, R. Storaandt<sup>2</sup>, P. Waldeck<sup>2</sup>, N.Yu. Taran<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Physiology and Ecology, Institute of Biology,  
Taras Shevchenko National University of Kiev,

64, Vladimirska St., Kiev 01601, Ukraine

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH,  
Arthur-Scheunert-Allee 40/41, D-14558 Nuthetal OT Bergholz-Rehbrücke, Germany

FEATURES OF CELL METABOLISM OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* CC-124  
WILD STRAIN [137c] UNDER MIXOTROPHIC AND PHOTOTROPHIC CULTIVATION

The features of cell metabolism were studied in *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 wild strain [137c]. It is a mutant for genes *nit1* and *nit2*, characterized by insensitivity to the nitrate medium under phototrophic and mixotrophic cultivation. It was found that, in terms of chlorophyll and sulpholipid content in the cells of *Ch. reinhardtii*, phototrophic conditions of cultivation were the best. Total content of amino acids in *Ch. reinhardtii* had increased 1.5 times during the transition from photo- to mixotrophic nutrition. Among the studied amino acids, five are essential: valine, tryptophan, phenylalanine, methionine, and leucine. Under phototrophic conditions, quantitative content of essential amino acids increased nearly twice. The ratio of the amount of non-essential to essential amino acids during phototrophic nutrition equaled 3.27, while mixotrophic – 2.56. This indicates an increase of essential amino acids content and a better-balanced composition of amino acids under mixotrophic conditions of cultivation. The possibility of regulation of specific metabolites of *Ch. reinhardtii* CC-124 wild strain [137c] production by means of certain cultivation conditions is discussed.

**Key words:** *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 wild strain [137c], biotechnology of algae, amino acids, sulpholipids, protein, photo- and mixotrophic cultivation.

---

## НОВЫЕ КНИГИ

---

**Колекція культур мікродоростей IBASU-A /** О.В. Борисова, П.М. Царенко, М.О. Конішчук. – Київ, 2014. – 110 с.

**Microalgae culture collection IBASU-A /** O.V. Borysova, P.M. Tsarenko, M.O. Konishchuk. – Kyiv, 2014. – 110 p.

Проаналізовано відомості про історію формування та функціонування колекції водоростей IBASU-A (Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України), а також наведено список живильних середовищ, перелік відомих колекцій культур водоростей, короткий глосарій та вказівки до користування цим зведенням. Фонди колекції охоплюють 486 штамів, що належать до 127 видів, 62 родів *Chlorophyta*, *Charophyta*, *Xanthophyta*, *Eustigmatophyta*, *Bacillariophyta*, *Euglenophyta* та *Суанопрокариота*. Представлені описи кожного штаму, зокрема його номер, таксономічний статус та номенклатурні відомості, історію ізоляції, характеристику локалітету та ідентифікатора. Культури ізольовані співробітниками Інституту, або одержані з інших колекцій та організацій. Основою фондів колекції є культури зелених водоростей, що використовуються у фундаментальних та прикладних дослідженнях.

Для широкого загалу фікологів, гідробіологів, екологів, генетиків, біотехнологів, викладачів та студентів біологічних факультетів університетів.