

УДК [582.263:(547.96 + 577.114 + 577.115)] : 58.036

Н. И. Кирпенко, О. М. Усенко, Т. О. Мусий

**СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ, УГЛЕВОДОВ И ЛИПИДОВ В
КЛЕТКАХ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ПРИ
КРАТКОВРЕМЕННЫХ КОЛЕБАНИЯХ
ТЕМПЕРАТУРЫ**

Исследована динамика общего содержания белков, углеводов и липидов у некоторых зеленых водорослей в ответ на влияние кратковременных колебаний температуры $\pm 10^\circ$.

Ключевые слова: культуры зеленых водорослей, белки, углеводы, липиды, температура.

Биохимический состав водорослей вызывает значительный интерес не только с теоретической, но и с прикладной точки зрения. В частности, белки перспективны для создания кормов, липиды рассматривают как сырье для альтернативных видов топлива, полисахариды — как компонент новейших фармакологических препаратов и т. д. Поэтому большое значение приобретает поиск путей регуляции содержания биологически ценных соединений в биомассе.

Известно, что под влиянием различных факторов в клетках водорослей происходят значительные физиолого-биохимические изменения. Дефицит элементов питания, действие разнообразных химических соединений, загрязнение водной среды, даже наличие или отсутствие сопутствующих видов отражается на их химическом составе [2, 3, 5]. В связи с этим возникает вопрос, каким образом, используя изменения внешних условий, можно регулировать содержание того или иного биохимического компонента в клетках.

Одним из наиболее значимых физических факторов, который влияет на интенсивность ростовых и биохимических процессов водорослей, является температура. В естественных условиях водоросли способны существовать в чрезвычайно широком диапазоне температур — от 0 до 70°C. Наиболее холодоустойчивы диатомовые, а теплоустойчивы — синезеленые водоросли, выживать которым в условиях повышенных температур помогает особое

© Н. И. Кирпенко, О. М. Усенко, Т. О. Мусий, 2016

коллоидное состояние цитоплазмы [8]. Зеленые микроводоросли занимают промежуточное положение.

Температура существенным образом влияет и на биохимический состав биомассы водорослей. Так, минимальное количество липидов в морских макрофитах (0,4—1%) зафиксировано экстремально жарким летом 2010 г., когда температура воды в Черном море достигала 29°C, а максимальное регистрировалась в весенний, более прохладный период [7]. У термофильной *Synechococcus elongatus* при снижении температуры от 35 до 23°C не только замедлялся рост, но и уменьшалось количество фикоцианина в клетках [10]. В то же время у симбиотической водоросли *Choricystis minor* в диапазоне температур 16—30°C содержание основных фотосинтетических пигментов было наиболее низким именно при оптимальном для роста уровне — 26°C [14]. Анализ этих данных свидетельствует, что температура является важным регулятором соотношения биохимических соединений, поэтому, очевидно, изменения температурного режима можно использовать для целенаправленного влияния на биохимический состав клеток.

Ранее было установлено, что на физиологическом состоянии водорослей более благоприятно сказываются небольшие ($\pm 3^\circ$) колебания температуры, чем поддержание ее постоянного уровня [12]. Однако для существенных биохимических изменений в клетках амплитуда колебаний температуры, на наш взгляд, должна быть выше. Кроме того, воздействие повышенной или пониженной температуры не должно быть длительным, учитывая общеизвестные высокие адаптационные возможности водорослей, которые могут нивелировать изменения биохимического состава. В связи с этим в наших опытах проведено изучение динамики общего содержания белков, углеводов и липидов в клетках ряда зеленых микроводорослей при кратковременных (одни сутки) колебаниях температуры $\pm 10^\circ$.

Материал и методика исследований. Для биохимических исследований использовали культуры водорослей из коллекций Института ботаники НАН Украины и Института гидробиологии НАН Украины, в частности *Acutodesmus obliquus* (Turpin) P. Tsarenko IBASU-473, *Desmodesmus armatus* (Chodat) E. Hegew. IBASU-270, *D. brasiliensis* (Bohlin) E. Hegew. IBASU-273, *D. subspicatus* (Chodat) E. Hegew. et A. Schmidt IBASU-302, *Scenedesmus obtusus* Meyen HPDP-113, *Monoraphidium contortum* (Thur.) Kom.-Legn. IBASU-A 364, *Selenastrum gracile* Reinsch. IBASU-317. Водоросли выращивали на среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горема при температуре $23 \pm 3^\circ\text{C}$, интенсивности освещения 2,5 клк, с чередованием светового и темного периодов 16 : 8. С целью изучения влияния колебаний температуры культуры водорослей в стандартных условиях подращивали до определенной стадии (14 сут — логарифмическая фаза, 21 сут — конец логарифмической, начало стационарной, 28 сут — стационарная фаза), после чего на одни сутки помещали в холодильную камеру (температура $+13^\circ\text{C}$) или в аквариум с подогретой водой (температура $+35^\circ\text{C}$). Через сутки анализировали изменение количества белков, углеводов и липидов по сравнению с контрольным вариантом, который оставался при изначальных условиях.

Биохимические показатели определяли в биомассе водорослей, отделенной от культуральной среды с помощью бумажных фильтров. Содержание сухого вещества в клеточной массе устанавливали методом высушивания до постоянной массы [6]. Навески для определения содержания белков, углеводов и липидов замораживали и хранили в замороженном состоянии до проведения анализа.

Биомассу гомогенизировали в фарфоровой ступке с кварцевым песком. Общее содержание белков определяли методом Лоури [13]. Относительное количество углеводов и липидов устанавливали гравиметрическим методом. Углеводы экстрагировали 30 мин водным раствором этанола (75%) и дважды центрифугировали по 15 мин при 8000 об/мин, липиды экстрагировали хлороформно-метаноловой смесью (2 : 1) дважды по 30 мин с последующим отделением экстракта в делительной воронке [1, 4, 9]. Показатели рассчитывали в процентах от сухой массы.

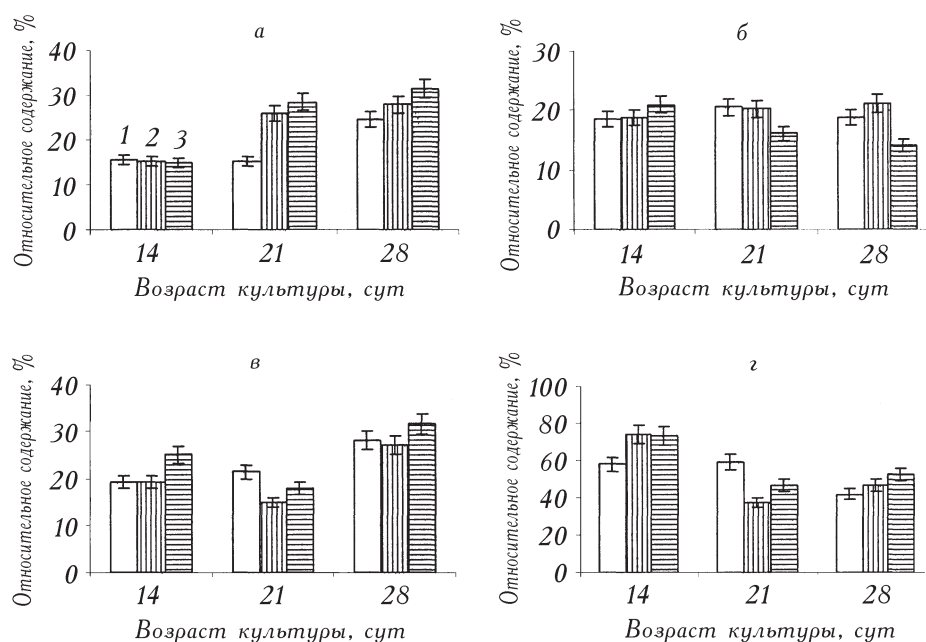
Полученные результаты обработаны статистически с помощью программного пакета Microsoft Excel. Достоверность для показателей содержания углеводов в большинстве экспериментов составляла $P = 0,95-0,99$ ($n = 3$), для белков и липидов она в основном не превышала $P = 0,95$.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты экспериментов оказались довольно неоднозначными — как в отношении реакции разных видов водорослей на изменение температурного режима, так и направленности и амплитуды биохимических перестроек.

Как известно, содержание биохимических компонентов существенно зависит от стадии роста культур [11]. Наши исследования показали, что биохимические изменения в ответ на колебания температуры также заметно отличаются у культур разного возраста. Так, в клетках *Desmodesmus brasiliensis* на логарифмической стадии роста содержание белков оставалось постоянным при любом испытанном температурном режиме. Существенные изменения этого показателя в ответ и на снижение, и на повышение температуры отмечены в период окончания фазы интенсивного роста, причем дальнейшее увеличение продолжительности выращивания вновь сопровождалось уменьшением амплитуды колебаний (рис. 1, а). Таким образом, на уровне белкового обмена *D. brasiliensis* реагирует на резкие колебания температуры в течение ограниченного времени, порядка 7—10 сут, что, на наш взгляд, свидетельствует о значительных адаптационных возможностях и термотолерантности этого вида.

У *Scenedesmus obtusus* заметные колебания содержания белков вызывало лишь повышение температуры. При этом для данных, полученных на логарифмической стадии, можно говорить о тенденции увеличения, но на более поздних стадиях влияние повышенной температуры вызывало отрицательный эффект, который усиливался по мере увеличения возраста культуры (рис. 1, б). Это может свидетельствовать об угнетении белкового синтеза вследствие неблагоприятного влияния высоких температур на эту водоросль.



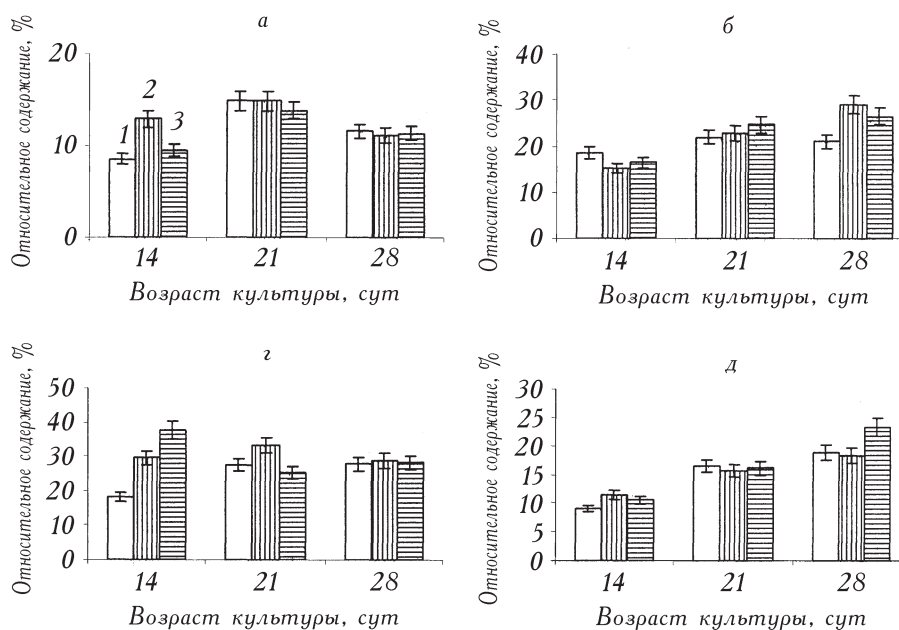
1. Относительное содержание белков в биомассе культур водорослей разного возраста при понижении (2) или повышении температуры (3) по сравнению с контролем (1): а — *Desmodesmus brasiliensis*; б — *Scenedesmus obtusus*; в — *Selenastrum gracile*; г — *Acutodesmus obliquus*.

Для *Selenastrum gracile* в основном наблюдались противоположные тенденции. Повышение температуры способствовало увеличению доли белков на стадии интенсивного роста и в стационарной фазе, тогда как в условиях снижения температуры содержание белков несколько уменьшалось, особенно на 21-е сутки выращивания (рис. 1, в). В клетках *Acutodesmus obliquus*, характеризующегося наибольшим среди исследованных зеленых водорослей содержанием белков, их биосинтез усиливался в ответ как на повышение, так и на снижение температуры, но только на ранних этапах выращивания (рис. 1, г). На наш взгляд, такие колебания содержания белков являются свидетельством сужения диапазона оптимальных для этих видов водорослей температур.

Интересно отметить, что в целом наиболее существенные изменения содержания белков фиксируются в конце фазы интенсивного роста (21-е сутки), по сравнению с наблюдениями в другие сроки.

Некоторое увеличение количества углеводов в биомассе *Desmodesmus brasiliensis* отмечено на более ранней стадии, чем белков, и лишь в ответ на снижение температуры. В других вариантах в клетках этой водоросли содержание углеводов колебалось незначительно (рис. 2, а).

У *Scenedesmus obtusus* тенденции изменения содержания углеводов в ответ на колебания температуры как в сторону снижения, так и повышения

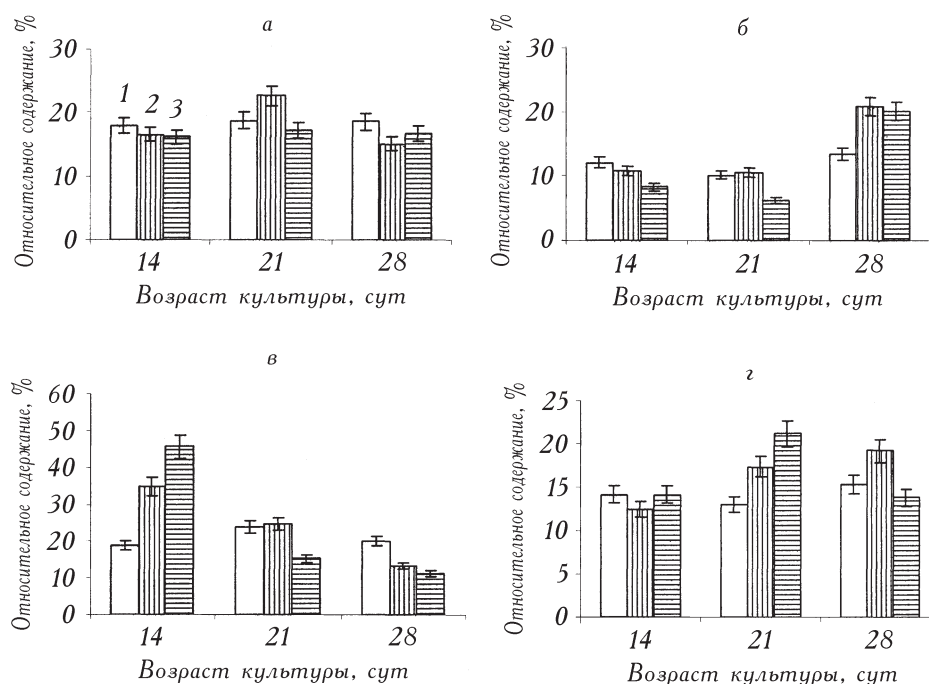


2. Относительное содержание углеводов в биомассе культур водорослей разного возраста при понижении (2) или повышении (3) температуры по сравнению с контролем (1): а — *Desmodesmus brasiliensis*; б — *Scenedesmus obtusus*; в — *Selenastrum gracile*; г — *Acutodesmus obliquus*.

были одинаковыми — незначительное уменьшение на стадии интенсивного роста и постепенное увеличение при переходе на стационарную стадию (рис. 2, б). В клетках *Selenastrum gracile*, менее устойчивого к неблагоприятным внешним воздействиям, содержание углеводов под влиянием колебаний температуры сильнее всего изменялось на логарифмической стадии, когда количество этих соединений существенно увеличивалось как при снижении, так и, особенно, при повышении температуры (рис. 2, в). При этом доля углеводов увеличивалась соответственно до 29,5 и 37,7% (в контроле 18,3%), то есть в 1,5—2 раза по сравнению с фоновыми условиями. С увеличением возраста культуры ее реакция на изменения температуры ослабевала, и содержание углеводов оставалось практически одинаковым, независимо от температурного режима.

В клетках *Acutodesmus obliquus* количество углеводов заметно возрастало лишь на стационарной стадии роста под влиянием повышенной температуры, в других случаях изменения были незначительными, особенно если принять во внимание более низкое содержание этих соединений по сравнению с другими видами (рис. 2, г).

Содержание липидных соединений в клетках *Desmodesmus brasiliensis*, как и углеводов, несколько увеличивалось лишь в ответ на влияние пониженной температуры, но эта реакция также была кратковременной и фиксировалась на неделю позже по сравнению с углеводами — на 21-е сутки

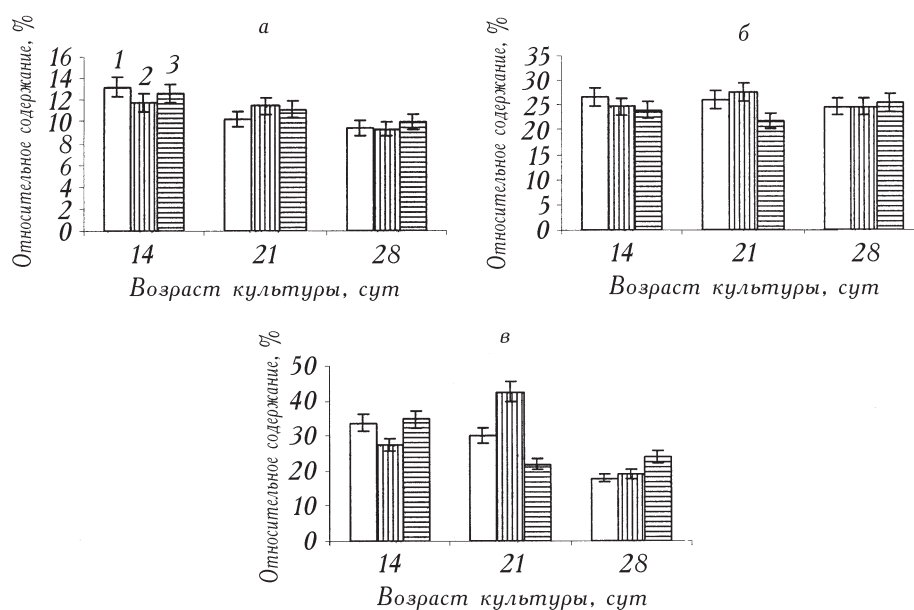


3. Относительное содержание липидов в биомассе культур водорослей разного возраста при понижении (2) или повышении (3) температуры по сравнению с контролем (1): а — *Desmodium brasiliensis*; б — *Scenedesmus obtusus*; в — *Selenastrum gracile*; г — *Acutodesmus obliquus*.

(рис. 3, а). В целом, понижение температуры вызывало более заметные флуктуации количества липидов, чем повышение.

У *Scenedesmus obtusus* влияние повышенной температуры также вызвало уменьшение количества липидов, но только на ранних стадиях развития культуры, тогда как на стационарной стадии колебания температуры в сторону как снижения, так и повышения способствовали существенному усилению накопления липидных соединений — до 20,2—20,9%, по сравнению с 13,5% в контроле (рис. 3, б).

У *Selenastrum gracile* наибольшие изменения содержания липидов, как и углеводов, наблюдались на логарифмической стадии роста, когда количество этих соединений значительно увеличилось под влиянием и пониженной, и, особенно, повышенной температуры (рис. 3, в). Доля липидов возросла более чем вдвое по сравнению с фоновыми условиями — соответственно до 34,9 и 45,7% (контроль 18,9%). Тем не менее, с увеличением продолжительности выращивания усилился отрицательный эффект, вызванный колебаниями температуры, и на стационарной стадии содержание липидов заметно снизилось, что может свидетельствовать об угнетении их синтеза либо увеличении расходования для восполнения энергетических затрат в неблагоприятных условиях.



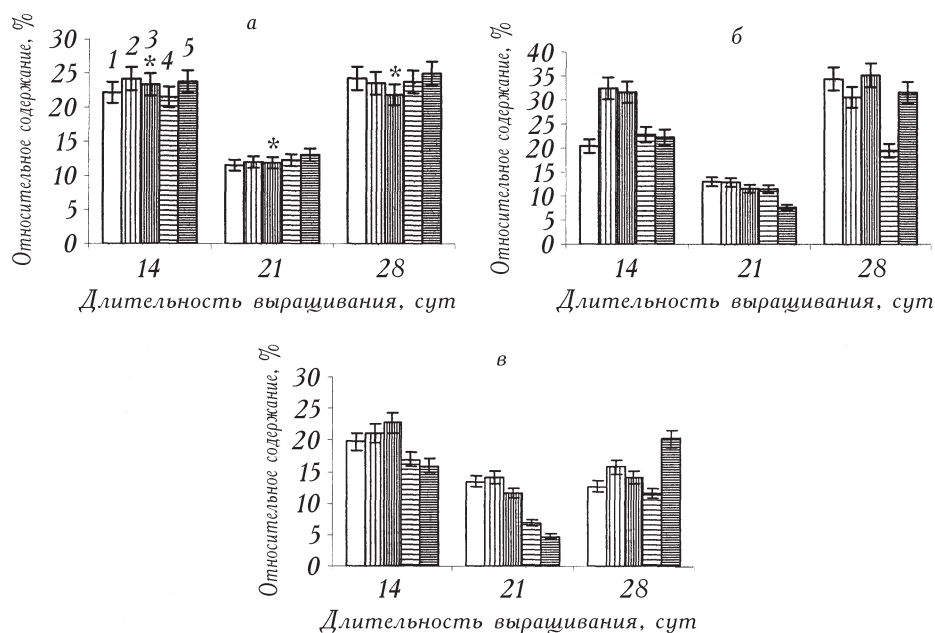
4. Относительное содержание белков (а), углеводов (б) и липидов (в) в биомассе культуры *Monoraphidium contortum* разного возраста при понижении (2) или повышении (3) температуры по сравнению с контролем (1).

В клетках *Acutodesmus obliquus* увеличение количества липидов под влиянием колебаний температуры наблюдалось в конце фазы интенсивного роста — на 21-е сутки культивирования как при снижении, так и, особенно, при повышении температуры (рис. 3, г). В дальнейшем, на стационарной стадии роста, доля липидов превышала контрольные показатели лишь при ее снижении, то есть у этой водоросли снижение температуры вызывало стойкое продолжительное усиление накопления липидных соединений.

Своеобразная динамика исследуемых показателей характерна для *Monoraphidium contortum*. Эта культура, в отличие от других видов, отличалась более высокой стабильностью биохимического состава и, как следствие, более низкой амплитудой колебаний содержания белков и углеводов в ответ на изменение температурного режима на всех стадиях жизненного цикла (рис. 4).

В то же время содержание липидов претерпевало заметные колебания. В частности, под влиянием пониженной температуры на 21-е сутки зафиксировано значительное увеличение их доли, хотя, как видно из рисунка, эта реакция была кратковременной (рис. 4, в).

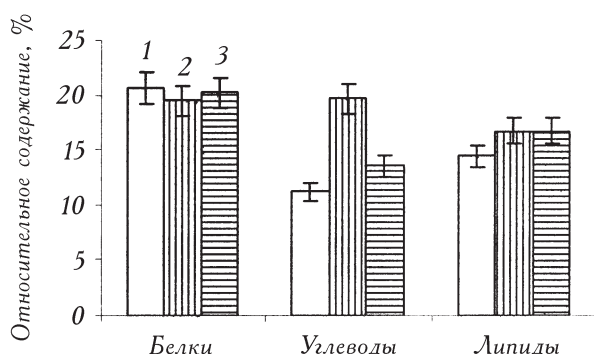
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о заметном перераспределении соотношения биохимических компонентов под влиянием резких изменений температурного режима, а также о значительной видоспецифичности реакции водорослей на этот фактор.



5. Относительное содержание белков (а), углеводов (б) и липидов (в) в биомассе культуры *Desmodesmus subspicatus* разного возраста при кратковременных колебаниях температуры: 1 — контроль; 2 — 1 сут 13°C; 3 — 2 сут 13°C; 4 — 1 сут 35°C; 5 — 2 сут 35°C; * уровень достоверности $P < 0,95$.

Метаболические изменения в ответ на изменение температурного режима наглядно демонстрирует динамика биохимических показателей культуры *Desmodesmus subspicatus* при увеличении длительности стрессовых колебаний температуры до двух суток (рис. 5). Как видно из приведенных диаграмм, количество белков в клетках *D. subspicatus*, как и у других водорослей, различалось на разных стадиях роста культуры, но под влиянием колебаний температуры практически не изменялось. Вместе с тем, в динамике содержания углеводов и липидов зафиксированы значительные различия, причем на разных стадиях роста культура реагировала на колебания температуры по-разному. Наиболее заметные изменения количества углеводов происходили на логарифмической стадии роста. Если при повышении температуры их содержание оставалось на том же уровне, то при снижении оно увеличилось более чем наполовину по сравнению с контролем — с 20,4 до 32,5%. При этом возрастание стабильно сохранялось и на вторые сутки влияния пониженной температуры.

На стадии замедления роста изменения количества углеводов были мало заметны на фоне общего снижения их содержания, только на второй день влияния повышенной температуры отмечено их некоторое уменьшение. При переходе на стационарную стадию роста водоросль уже меньше реагировала на снижение температуры, тогда как ее повышение вызывало существенное уменьшение содержания углеводов. Тем не менее, на вторые сутки пребывания в условиях повышенной температуры количество углеводов



6. Динамика содержания белков, углеводов и липидов в биомассе *Desmodesmus armatus* на стационарной стадии роста (45 сут) при кратковременных колебаниях температуры: 1 — 23°C; 2 — 2 сут 13°C; 3 — 1 сут 13°C и 1 сут 23°C.

ных компонентов восстановилось до контрольного уровня. Это свидетельствует, по нашему мнению, о том, что более глубокие перестройки в метаболизме углеводов происходят, во-первых, в более молодых клетках, во-вторых, в условиях снижения температуры.

Содержание липидных компонентов, наоборот, более заметно изменялось в ответ на повышение температуры — оно существенно умень-

шалось, причем как в начале стадии логарифмического роста, так и в период ее окончания. Таким образом, в целом влияние пониженной температуры способствует увеличению содержания углеводов, а повышенной — уменьшению количества липидов. Однако возможны и исключения из общей закономерности: например, у *D. subspicatus* на стационарной стадии роста содержание липидов при продолжительном действии повышенной температуры возрастало.

Приведенные данные свидетельствуют о значительной лабильности метаболизма водорослей в условиях колебаний температуры. При этом одним из наиболее подвижных звеньев является углеводный обмен. Подтверждением этому служат результаты анализа трех вариантов культуры *Desmodesmus armatus*, динамика биохимических показателей которых показана на рисунке 6. Контрольный вариант культуры, выращенной до стационарной стадии, находился постоянно при температуре 23°C, опытные варианты подвергли влиянию пониженной температуры (+ 13°C), после чего один из них на одни сутки возвратили в исходные (контрольные) условия. Колебания содержания белков и липидов в этих условиях были несущественными, тогда как количество углеводов в ответ на снижение температуры увеличилось почти вдвое по сравнению с фоновыми значениями (соответственно 19,7 и 11,2%). Однако при возвращении культуры в исходные условия содержание углеводных компонентов снизилось практически до контрольного уровня (13,5%), что характеризует быструю реакцию клеток на изменение температурного режима.

Таким образом, при краткосрочных колебаниях температуры изменения биохимического состава клеток водорослей носят временный характер. При этом один из наиболее лабильных показателей — это содержание углеводов, очевидно, выполняющих стабилизирующую роль в условиях изменения температурного режима.

Температура является весомым фактором, который существенным образом влияет не только на рост, но и на биохимический состав клеток. Результаты экспериментов по изучению влияния колебаний температуры довольно неоднозначны, но их анализ свидетельствует, что манипуляции с температурным режимом можно использовать для регуляции содержания биохимических компонентов в клетках водорослей, в частности для существенного повышения содержания отдельных соединений. Так, вполне реальна перспектива повышения количества углеводов или липидов в два раза.

Вопрос целенаправленной регуляции биохимического состава давно привлекает внимание сторонников промышленного выращивания и широкого использования водорослей. С этой целью используют разнообразные подходы, включая применение тяжелых металлов и дизельного топлива, которые могут создавать дополнительные проблемы безопасности окружающей среды. Между тем, весомых результатов в этой области можно достичь, используя заложенные природой возможности самих водорослей.

Заключение

Кратковременные колебания температуры сопровождаются изменением содержания белков, углеводов и липидов в клетках водорослей. Количество белков отличается большей стабильностью по сравнению с другими биохимическими компонентами.

Реакция водорослей на изменения температурного режима характеризуется значительной видоспецифичностью. В частности, под влиянием колебаний температуры сравнительно меньше изменяется биохимический состав *Desmodesmus brasiliensis*, тогда как в клетках *Selenastrum gracile* можно наблюдать заметное увеличение содержания углеводов, а *Monoraphidium contortum* — липидов.

Для получения максимального содержания отдельных биохимических компонентов необходимо учитывать стадию выращивания водорослей. В клетках *S. gracile* наиболее значительное повышение содержания углеводов и липидов происходит на логарифмической стадии, а у *Scenedesmus obtusus* и *Acutodesmus obliquus* — в конце логарифмической — на стационарной.

Используя изменения температурного режима, можно в 1,5—2 раза повысить содержание углеводов и липидов в клетках зеленых водорослей, причем как в биомассе культур с низкими фоновыми показателями (*D. brasiliensis*), так и с высокими (*S. gracile* и *M. contortum*), представляющими перспективу для промышленного получения полисахаридов или альтернативных видов топлива.

**

Встановлено, що під впливом різких змін температури в клітинах зелених водоростей відбувається суттєвий перерозподіл кількості білків, вуглеводів та ліпідів. Коливання вмісту біохімічних компонентів залежать від віку культур і відрізняються значною видоспецифічністю. При зниженні температури спостерігаються тенденції до посилення синтезу вуглеводів, а при підвищенні — до зменшення вмісту ліпідів.

**

It has been found that sharp changes in the temperature result in reversible redistribution of the content of biochemical components in the cells of green algae, which is species-specific and depends on culture age. A decrease in the temperature results in the increase in the content of carbohydrates whereas its increase in the decrease in the content of lipids.

**

1. Горга А.І., Грубінко В.В. Вплив дизельного палива на біосинтез протеїнів, вуглеводів і ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 6. — С. 74—81.
2. Кирпенко Н.И. Аллелопатическое взаимодействие пресноводных водорослей. — Киев: Наук. думка, 2013. — 254 с.
3. Кирпенко Н.И., Усенко О.М., Мусий Т.О. Биохимическая изменчивость водорослей (обзор) // Гидробиол. журн. — 2014, № 5. — С. 53—70.
4. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. — Л.: Наука, 1981. — 339 с.
5. Луців А.І. Регуляція біосинтезу ліпідів у *Chlorella vulgaris* Beijer. іонами металів та нафтопродуктами: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Тернопіль, 2015. — 20 с.
6. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
7. Муравьева И.П., Миронова Т.О. Сезонная динамика липидно-углеводородного состава макрофитообрастаний гидротехнических сооружений Артиллерийской бухты (Севастополь, Чёрное море) // Уч. зап. Таврич. нац. ун-та. Серия: Биология, химия. — 2011. — Т. 24 (63), № 4. — С. 166—170.
8. Никитина В.Н. Синезеленые водоросли термальных источников Кавказа и Камчатки: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Л., 1977. — 22 с.
9. Практикум по общей биохимии. — М.: Просвещение, 1975. — 318 с.
10. Burns R.A., Mac Donald C.D., Mc Ginn P. J., Campbell D.A. Inorganic carbon repletion disrupts photosynthetic acclimation to low temperature in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* // J. Phycol. — 2005. — 41, N 2. — P. 322—334.
11. Gatenby C.M., Orcutt D.M., Kreeger D.A. et al. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels // J. Applied Phycology. — 2003. — Vol. 15. — P. 1—11.
12. Guo Gan-Lin, Dong Shuang-lin, Dong Yun-Wei. Effects of Constant and Diel Fluctuating Temperatures on the Growth and Photosynthesis of the Macroalgae *Ulva pertusa* Kjellm // Period. Ocean Univ. China. — 2006. — Vol. 36, N 6. — P. 941—945.
13. Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr G.A., Randall R.I. Protein measurement with the folin phenol reagents // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1—2. — P. 265—268.
14. Pouneva I., Zidarova R. Effect of temperature on the growth and pigment content of an Antarctic isolate *Choricystis minor* (Skuja) Fott (Chlorophyta) // Докл. Бълг. АН. — 2006. — Т. 59, N 10. — С. 1059—1062.