

УДК 582.263:581.152(581.143.28)

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

**БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЗЕЛЕННЫХ  
ВОДРОСЛЕЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РОСТА**

Проанализирована динамика содержания общих белков, углеводов и липидов на разных стадиях выращивания некоторых зеленых водорослей, выявлены периоды наибольшего накопления этих продуктов в клетках.

*Ключевые слова:* зеленые водоросли, фазы роста, белки, углеводы, липиды.

Водоросли являются одним из основных объектов экспериментальной гидробиологии. Изучение особенностей их функционирования обусловлено двумя аспектами. С одной стороны, представители альгофлоры играют чрезвычайно важную роль в водных экосистемах — создают кормовую базу для животного населения водоемов, участвуют в формировании качества воды и в процессах самоочищения. С другой стороны, они являются потенциальным источником получения большого спектра биологически ценных соединений — белков, содержащих незаменимые аминокислоты, пигментов, альгинатов, витаминов, биологически активных веществ и т. д. [2].

Интерес к практическому использованию водорослей заметно колеблется в зависимости от изменений тенденций мировой экономики. Однако, несмотря на определенные трудности промышленного получения биомассы водорослей, это направление остается актуальным. Истощение традиционных сырьевых ресурсов и увеличение потребностей народного хозяйства в белке и других ценных соединениях обуславливают поиски новых источников пищевого, кормового и технического сырья, а микроводоросли, как известно, являются перспективным объектом благодаря их ценному биохимическому составу и высокой продуктивности.

Несмотря на продолжительные исследования биохимического состава водорослей, закономерности его формирования до сих пор окончательно не выяснены. В настоящей работе проанализирована динамика общего содержания белков, углеводов и липидов в клетках некоторых зеленых водорослей на разных стадиях роста их культур.

© Н. И. Кирпенко, О. М. Усенко, Т. О. Мусий, 2015

**Материал и методика исследований.** Особенности формирования биохимического состава изучали на культурах следующих хлорококковых водорослей: *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P. Tsarenko HPDP-108, *A. obliquus* (Turpin) P. Tsarenko IBASU-473, *Desmodesmus armatus* (Chodat) E. Hegew. IBASU-270, *D. brasiliensis* (Bohlin) E. Hegew. IBASU-273, *D. communis* (E. Hegew.) E. Hegew. HPDP-109, *D. subspicatus* (Chodat) E. Hegew. et A. Schmidt IBASU-302, *Scenedesmus obtusus* Meyen HPDP-113, *Selenastrum gracile* Reinisch. IBASU-317, *Tetraedron caudatum* (Corda) Hansg. HPDP-116. Водоросли выращивали на среде Фитцджеральда в модификации Цендера и Горема в диапазоне температур 22—26°C, при интенсивности освещения 2,5 клк, с чередованием светового и темного периодов (16 ч : 8 ч).

По достижении определенной стадии роста культур клеточную массу водорослей отфильтровывали от культуральной среды при помощи фильтровальной бумаги. Отбирали навески биомассы для установления содержания сухого вещества (%) путем высушивания до постоянной массы при температуре 105° [4]. Параллельно готовили навески для определения биохимических компонентов. Клеточную массу немедленно замораживали и в дальнейшем хранили в морозильной камере. Для проведения биохимических анализов биомассу гомогенизировали в фарфоровой ступке с кварцевым песком. Количество общих белков устанавливали методом Лоури [9], содержание углеводов и липидов — гравиметрическим методом после экстракции соответственно водным раствором этанола (75%) или хлороформно-метаноловой (2:1) смесью [1]. Содержание биохимических компонентов рассчитывали на 1 г сухого вещества водорослевой массы.

### Результаты исследований и их обсуждение

Сравнительное изучение биомассы разных культур водорослей для выявления видов, наиболее продуктивных по накоплению белков, углеводов и липидов свидетельствует, что водоросли довольно существенно отличаются по содержанию этих соединений в клетках. Даже для одного и того же вида могут наблюдаться значительные колебания количества исследуемых компонентов (таблица).

Так, если в разных опытах, проведенных в сходных условиях внешней среды, в клетках *D. armatus* содержание белков находится практически на одном уровне (в пределах 18,0—20,6%), а количество липидов отличается незначительно (11,8—14,4%), то процентное содержание углеводов может различаться почти вдвое — от 11,2 до 20,5%. В то же время, в биомассе *D. subspicatus*, наоборот, для углеводов отмечены минимальные различия — 17,3—20,4%, для липидов они несколько выше — 16,5—21,6%, тогда как содержание белков отличается более существенно — от 24,6 до 34,4%. Следовательно, в одних случаях колебания биохимических показателей происходят в довольно узких пределах, тогда как в других результаты отличаются на 10—20%. Анализ литературных данных подтверждает, что даже для «классических», то есть общепризнанных, продуцентов [5—8, 10] наблюдаются значительные колебания содержания целевого продукта, что свидетельствует о его вероятной зависимости от воздействия разнообразных факторов.

В связи с высокой вариабельностью биохимического состава водорослей особый интерес представляет анализ содержания биохимических компо-

**Пределы колебаний содержания основных биохимических компонентов (%) в клетках зеленых водорослей ( $n = 6$ )**

Культуры	Белки	Углеводы	Липиды
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	46,9—47,1	20,0—28,2	10,6—19,6
<i>Acutodesmus obliquus</i>	41,9—59,3	9,1—25,4	13,0—16,5
<i>Desmodesmus armatus</i>	18,0—20,6	11,2—20,5	11,8—14,4
<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	15,2—24,6	8,5—14,8	11,2—18,7
<i>Desmodesmus communis</i>	20,1—36,9	13,7—28,1	12,7—22,4
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	24,6—34,4	17,3—20,4	16,5—21,6
<i>Scenedesmus obtusus</i>	18,6—22,5	15,1—21,9	10,2—12,0
<i>Selenastrum gracile</i>	18,5—28,1	22,0—33,7	14,7—23,8
<i>Tetraedron caudatum</i>	10,3—20,6	13,0—19,0	7,3—21,5

нентов в разных условиях выращивания и выяснение зависимости формирования их соотношения от факторов разной природы. Прежде всего, характер накопления биохимических компонентов, очевидно, зависит от биологических особенностей, predeterminedенных видовой принадлежностью водорослей. К таким особенностям можно отнести генетически обусловленный уровень биосинтеза отдельных биохимических соединений, связанный с интенсивностью ростовых и продукционных процессов и спецификой реагирования клеток на внешние условия. Как видно из приведенных результатов, у некоторых видов водорослей количество белков, углеводов и липидов достаточно близкое (например, у *D. communis*, *T. caudatum*), хотя может происходить и преимущественное накопление одних соединений за счет существенного уменьшения содержания других. Именно такие особенности позволяют выделять определенные виды — потенциальные продуценты тех или иных биологически ценных соединений. В частности, в условиях наших опытов самый высокий верхний предел содержания белков, приближающийся к показателям синезеленых водорослей [10], зафиксирован для *A. obliquus* и *A. dimorphus*, количество углеводов и липидов было наиболее высоким у *S. gracile* (см. таблицу).

К биологическим особенностям видов следует отнести также характер формирования соотношения биохимических компонентов в течение жизненного цикла, то есть на разных стадиях роста водорослей.

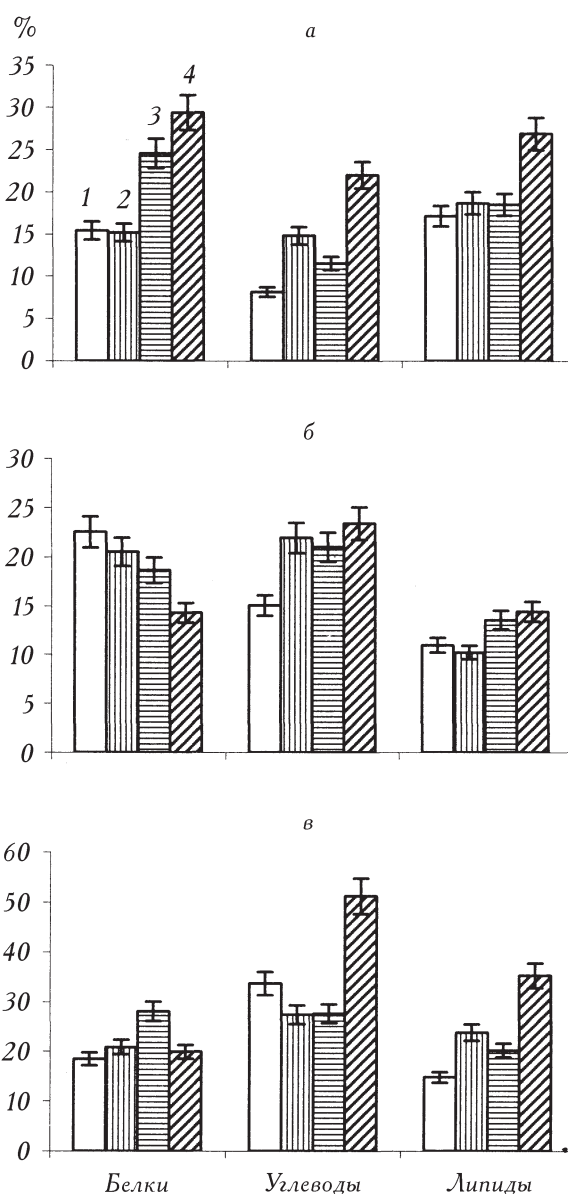
Сравнение показателей общего содержания белков, углеводов и липидов в биомассе культур водорослей при разных сроках выращивания показало, что уровень накопления этих веществ заметно перераспределяется в течение жизненного цикла (рис. 1).

При этом динамика изменений заметно отличается у разных видов. Как известно, для некоторых водорослей наблюдается общая закономерность — с затуханием ростовых процессов уменьшается количество белков и повышается содержание углеводных и липидных компонентов [3]. Однако наши опыты показывают, что эти тенденции не всегда проявляются столь явно.

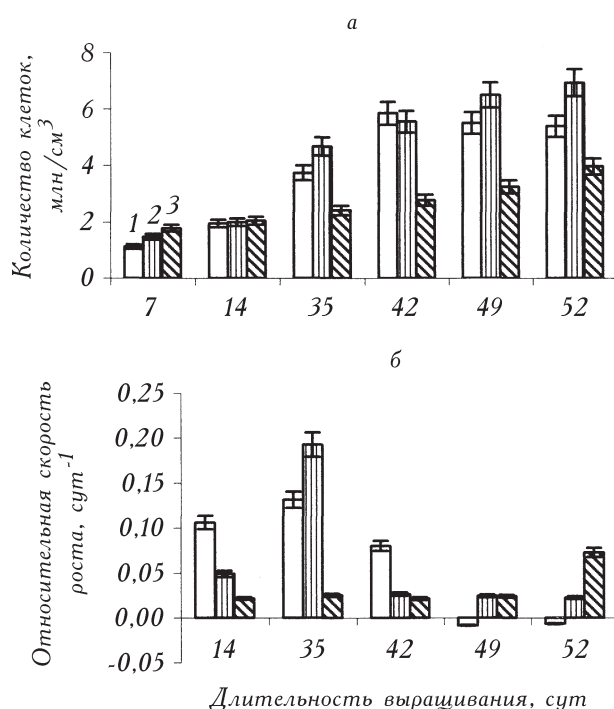
На примере *D. brasiliensis*, *Sc. obtusus* и *S. gracile* (см. рис. 1) видно, что, если для липидов и, в меньшей степени, углеводов эта закономерность прослеживается достаточно четко у всех трех видов, то стабильное снижение содержания белков с увеличением длительности выращивания отмечается лишь для *Sc. obtusus*, а у других видов отмечено возрастание содержания этих веществ в течение длительного периода.

Возможно, ответ следует искать в особенностях роста водорослей. Наблюдения показали, что количество клеток с течением времени во всех культурах увеличивалось (рис. 2, а), однако динамика этого процесса значительно отличалась у разных видов (рис. 2, б).

Максимальная относительная скорость роста зафиксирована для *Sc. obtusus*, однако период активного роста этой культуры был короче, чем у *D. brasiliensis*, тогда как рост *S. gracile* в целом в данных условиях характеризовался низкой интенсивностью. В то же время, если у *D. brasiliensis* повышенное содержание белков большей частью совпадало с периодом интенсивного роста, то у *Sc. obtusus* количество этих компонентов постоянно снижалось, даже в период максимальной скорости роста. Следовательно, в общем содержание белков положительно коррелирует с интенсивностью ростовых процессов, однако их накопление характеризуется видоспецифическими особенностями.



1. Относительное содержание белков, углеводов и липидов в клетках культур *Desmodesmus brasiliensis* (а), *Scenedesmus obtusus* (б), *Selenastrum gracile* (в) при разной длительности выращивания: 1 — 14 сут; 2 — 21 сут; 3 — 28 сут; 4 — 50 сут.



2. Количество клеток (а) и относительная скорость роста (б) культур *Desmodesmus brasiliensis* (1), *Scenedesmus obtusus* (2) и *Selenastrum gracile* (3).

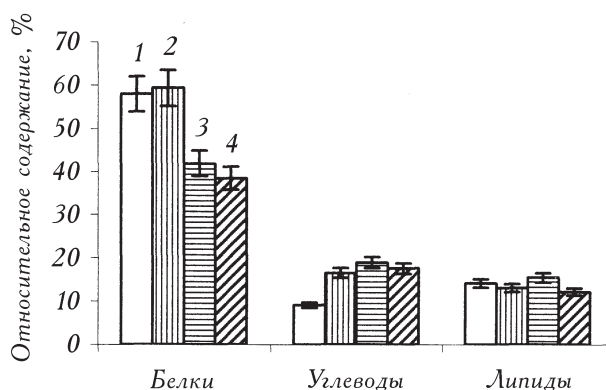
Что касается углеводов и липидов, то наиболее заметными были отличия в их содержании при переходе на стационарную стадию роста водорослей (см. рис. 1). Однако амплитуда колебаний интенсивности этих процессов существенно отличается у разных видов. В частности, если количество углеводов у *D. brasiliensis* возрастает постепенно в течение всего срока выращивания, то у *Sc. obtusus* этот показатель, увеличившись в конце фазы интенсивного роста, в дальнейшем изменяется незначительно, а у *S. gracile* — резко увеличивается в конце срока наблюдений.

Колебания содержания липидных компонентов чаще характеризуются значительно меньшей амплитудой. Особенно это заметно для *D. brasiliensis*,

довольно устойчивого к изменениям внешних условий. В его клетках длительное время поддерживается практически одинаковое, сравнительно невысокое, количество липидов, существенно возрастающее лишь на поздней стационарной стадии. В то же время *S. gracile* менее устойчив к колебаниям внешних факторов. В частности, как показывают наши исследования, этот вид предпочитает более умеренную температуру и при ее возрастании выше 25°C состояние культуры ухудшается. В клетках этой водоросли содержание углеводных и липидных компонентов подвержено более сильным колебаниям, а максимальное их количество выше, чем у других исследованных видов (см. таблицу). Очевидно, углеводы и липиды принимают участие в обеспечении потенциальной устойчивости видов к изменению внешних условий, что и оказывает влияние на уровень их накопления в клетках. Анализ этих данных позволяет высказать предположение, что в биотехнологии, для целенаправленной регуляции содержания таких биологически ценных соединений, как углеводы и липиды, целесообразно использовать водоросли с узкими диапазонами оптимумов внешних условий, поскольку в таком случае, изменяя определенные физико-химические параметры внешней среды, можно достичь существенных результатов.

Следует отметить, что в основном наблюдается обратная зависимость между содержанием белков и количеством углеводов и липидов, однако с

увеличением длительности выращивания культур происходит перераспределение соотношения биохимических компонентов. Полученные нами данные, в целом, подтверждают общеизвестные тенденции формирования этого соотношения в клетках водорослей: старение культур сопровождается уменьшением относительного содержания белков и увеличением доли углеводов и липидов, однако у разных водорослей эти процессы несколько отличаются и происходят с разной интенсивностью. Так, в клетках *A. obliquus* накопление биохимических компонентов отличается несколько иной динамикой по сравнению с остальными видами (рис. 3).



3. Относительное содержание белков, углеводов и липидов в клетках культуры *Acutodesmus obliquus* при разной длительности выращивания: 1 — 14 сут; 2 — 21 сут; 3 — 28 сут; 4 — 50 сут.

Как видим, у этой культуры количество белков остается примерно постоянным во время интенсивного роста и в период его замедления, но между этими фазами наблюдаются довольно существенные отличия. В то же время количество углеводов в течение всего жизненного цикла остается сравнительно низким по сравнению с другими исследованными видами зеленых водорослей, хотя и несколько возрастает с увеличением длительности выращивания. Довольно невысоким было и содержание липидов в клетках этой водоросли, причем этот показатель меньше всего подвержен колебаниям в зависимости от возраста культуры.

Таким образом, поиск среди водорослей продуцентов биологически ценных соединений требует детального изучения динамики накопления того или иного компонента в зависимости от возраста культур с целью установления оптимальной длительности выращивания, обеспечивающей наибольший выход целевого продукта.

### Заключение

Соотношение белков, углеводов и липидов в клетках зеленых водорослей изменяется в зависимости от видовой принадлежности и стадии развития культур. Более высокий выход углеводов и липидов можно получить на стационарной стадии их роста. В исследованных условиях больше углеводов содержала биомасса *Selenastrum gracile* и *Desmodesmus brasiliensis*, а липидов — *Selenastrum gracile*. Что же касается белков, то наибольшее их количество определено в клетках *Acutodesmus dimorphus* и *A. obliquus* в период окончания стадии интенсивного роста.

\*\*

Проаналізовано динаміку вмісту загальних білків, вуглеводів та ліпідів за різної тривалості вирощування низки зелених водоростей. Показано, що коливання кількості цих біохімічних компонентів пов'язані з віком культур. Одержані результати підтверджують загальновідомі тенденції: старіння культур супроводжується зменшенням вмісту білків та зростанням частки вуглеводів і ліпідів, проте ці процеси характеризуються значною видовою специфічністю.

\*\*

*Dynamics of total proteins, carbohydrates and lipids with different duration growing number of green algae Protococcales considered. It is shown that fluctuations in their quantitative indicators related to age cultures. These results confirm the well-known trend: aging cultures accompanied by a decrease in protein content and the relative increase in the proportion of carbohydrates and lipids. However, these processes differ in significant species specificity.*

\*\*

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. Золотарьова О.К., Шнюкова Є.І., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. Перспективи використання мікрводоростей у біотехнології / Під ред. О. К. Золотарьової. — К.: Альтерпрес, 2008. — 234 с.
3. Ладыгина Л.В. Интенсивность роста и биохимический состав микроводоросли *Dunaliella viridis* Теод. в зависимости от условий культивирования // Экология моря. — 2005. — Вып. 6. — С. 56—59.
4. Сакевич О.Й., Усенко О.М., Баланга О.В. Біохімічний аналіз водяних рослин. — К.: Логос. 2009. — 372 с.
5. Barbarino E., Lourenco S.O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae // J. Appl. Phycology. — 2005. — Vol. 17. — P. 447—460.
6. Becker E.W. Microalgae in human and animal nutrition // Ed. by A. Richmond. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. — Oxford: Blackwell Science, 2004. — P. 312—351.
7. Borgen K. Evaluation of physicochemical properties of modified algae protein adhesives // A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree. — Kansas state university. — Manhattan, Kansas, 2012. — 46 p.
8. Costa D.F.A., Isherwood P.I., Quigley S.P. et al. Chemical Composition and *In Vitro* Degradability of Various Algae Species and Protein Supplements Commonly Fed to Ruminants // Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. — 2010. — Vol. 28. — P. 61.
9. Lowry O.H., Rosbrough N.J., Farr G.A., Randall R.I. Protein measurement with the folinphenol reagents // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, N 1—2. — P. 265—268.
10. Nutritional value of micro-algae // Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture: FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER / Ed. by P. Lavens, P. Sorgeloos. — Rome, 1996. — 46 p.