

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). Algologia. 2018, 28(2): 136–151

<https://doi.org/10.15407/alg28.02.136>

УДК 577.114 582.251.72

МОКРОСНОП В.М.

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,

ул. Терещенковская, 2, Киев 01004, Украина

membrana@ukr.net

ПРОДУЦИРОВАНИЕ ЗАПАСНОГО ПОЛИСАХАРИДА ПАРАМИЛОНА МИКРОВОДОРОСЛЮ *EUGLENA GRACILIS* KLEBS (*EUGLENA*, *EUGLENOPHYCEAE*)

Одноклеточная жгутиковая микроводоросль *Euglena gracilis* в зависимости от условий культивирования накапливает большое количество запасного полисахарида парамилона (β -1,3-глюкана). В статье описаны структура и синтез парамилона, а также особенности его накопления клетками *E. gracilis*, что позволяет рассматривать микроводоросль в качестве перспективного продуцента данного полисахарида. Проведено сравнение различных условий культивирования *E. gracilis*, включая наличие освещения, типы органического субстрата, доступ кислорода, которые могут влиять на степень аккумуляции полисахарида в клетках. На основе литературных данных было сделано заключение, что благоприятными условиями для стимуляции синтеза парамилона в клетках *E. gracilis* являются периодическое освещение культуры или его отсутствие, наличие органического источника углерода в среде, наиболее эффективными для синтеза парамилона оказались глюкоза и фруктоза. При отсутствии кислорода в питательной среде метаболизм клеток *E. gracilis* перестраивается с синтеза парамилона на синтез восков, что не способствует накоплению полисахарида. При сравнении динамики накопления парамилона культурами *E. gracilis* в процессе авто- и миксотрофного культивирования отмечено, что концентрация полисахарида в клетке максимально увеличивается в первые несколько суток культивирования в присутствии экзогенных субстратов. Внесение органического источника азота дополнительно стимулирует накопление парамилона в лаг-фазе роста миксотрофной культуры. При автотрофном культивировании содержание парамилона практически не изменяется в процессе выращивания. Проанализировано использование побочных продуктов пищевого производства в качестве источника питательных веществ для выращивания микроводоросли и накопления парамилона в её клетках. Показано, что кукурузный и картофельный экстракты являются наиболее ценной питательной средой для культуры *E. gracilis*. Обсуждается перспектива применения парамилона в фармакологии и ветеринарии как стимулятора и модулятора иммунной системы.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Euglena gracilis*, *Euglenophyta*, глюкан, парамилон, миксотрофия

© Мокросноп В.М., 2018

Эффективность утилизации световой энергии микроводорослями намного превышает фотосинтетическую эффективность высших растений, в связи с чем промышленное культивирование микроводорослей рассматривается как перспективное направление биотехнологии, способное обеспечить производство многих полезных соединений, а также сырья для биотоплива (Золотарьова та ін., 2008; Золотарьова, Шнюкова, 2010). Метаболическая пластичность позволяет микроводорослям приспосабливаться к разным условиям существования и наряду с неорганическим углеродом использовать для роста различные органические субстраты (Mukhaylenko et al., 2004; Sivash et al., 2004; Cheirsilp, Torpee, 2012; Mokrosnop, Zolotareva, 2014).

К таким микроводорослям относится *Euglena gracilis*, которая способна одновременно накапливать аминокислоты, витамины и жирные кислоты (Takeyama et al., 1997; Ogbonna et al., 2012; Mokrosnop et al., 2016). Этот организм, имеющий гибридный фотоавтотрофно-гетеротрофный геном, в котором обнаружены латеральный перенос и слияние генов, часто используют в эволюционных исследованиях (Ahmadinejad et al., 2007).

Конечные продукты фотосинтетической фиксации углерода формируют в клетках микроводорослей депо полисахаридов, выполняющих различные экологические функции (Шнюкова, Золотарева, 2015, 2017). В клетках *E. gracilis* избыток углерода и энергии накапливается в виде полисахарида парамилона, образующегося при наличии в окружающей среде органических субстратов. Этот глюкан впервые был открыт именно в клетках *E. gracilis* (Garlaschi et al., 1974).

Парамилон относится к фибриллярным неразветвленным β -(1,3)-глюканам (Freimund et al., 2003; Barsanti et al., 2011) (рис. 1). В клетках *E. gracilis* полисахарид откладывается в виде высококристаллизованных гранул и комплекса фибриллярных структур, локализованных в цитозоле и окруженных мономембраной (Kiss et al., 1988; Baumer et al., 2001). Уровень кристаллизации гранул парамилона достигает 90%, что отличает этот полисахарид от других запасных продуктов растений и водорослей. Микрофибры гранул имеют толщину 4–10 нм и, комплектуясь по три, формируют неразветвленные спирали.

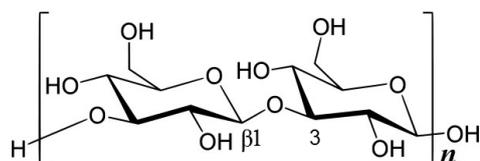


Рис. 1. Структурный элемент полисахарида парамилона

Молекулярная масса парамилона превышает 500 кДа (Baumer et al., 2001). Его гранулы могут хаотично распределяться в цитоплазме или накапливаться в области пиреноида клеток *E. gracilis*. Обычно, чем больше размер гранул, тем меньше их количество в клетке (Barsanti et al., 2001).

Синтез парамилона в клетках *E. gracilis*

Синтез парамилона осуществляется при участии парамилонсинтазы (УДФ-глюкозо- β -1,3-глюкан- β -3-гликозилтрансферазы), состоящей из семи субъединиц мембранно-связанного белкового комплекса массой 670 кДа (Bäumer et al., 1991). Наибольшую каталитическую активность парамилонсинтаза проявляет при pH 7,5–8 и температуре 20–23 °C. Субстратом парамилонсинтазы является УДФ-глюкоза ($K_m = 12,5$ мкМ, $V_{\text{макс}} = 0,24$ нМ · мин⁻¹ · мг⁻¹ белка), которая образуется из глюкозо-1-фосфата при участии уридилтрансферазы (Marechal, Goldemberg, 1964; Kiss et al., 1988). Как и при биосинтезе гликогена, каталитический перенос глюкозы с УДФ-глюкозы сопровождается формированием белок-глюканового комплекса (O'Neill et al., 2015; Takeda et al., 2015). Есть данные о том, что ультраструктура мембраны, окружающей гранулы парамилона, изменяется в зависимости от активности синтеза запасного полисахарида (Kiss et al., 1988). Парамилонсинтазная активность обнаружена в мембранной фракции гранул парамилона. В клетках, культивированных в гетеротрофных условиях, она намного выше, чем в культуре, выращенной автотрофно (Baumer et al., 2001).

Исследования накопления парамилона в клетках *E. gracilis* при гетеротрофном культивировании показали, что в нефотосинтетической фиксации CO₂ клетками микроводоросли участвуют фосфоенолпируваткарбоксилаза и ГТФ-зависимая фосфоенолпируваткарбоксикиназа. Фосфоенолпируваткарбоксилаза катализирует превращение фосфоенолпирувата в оксалоацетат в митохондриальном матриксе. Фосфоенолпируваткиназа, локализованная во внутренней митохондриальной мембране, катализирует превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват, который вступает в цепь реакций глюконеогенеза уже вне матрикса митохондрий. Синтез парамилона и накопление его зерен происходит в везикулах митохондрий, отделенных внутренней митохондриальной мембраной от их матрикса (Cook, 1965; Calvayrac et al., 1981; Briand et al., 2001). При фотогетеротрофном культивировании гранулы парамилона накапливаются не только в везикулах митохондрий, но и в области пиреноида хлоропластов, где синтез полисахарида осуществляется благодаря энергии света и карбоксилазной активности Рубиско (Cook, 1965). При таком культивировании в клетках формируется система везикул с парамилоном, которая может выполнять роль структурного посредника между митохондрионом и хлоропластами, который разделяет эти два компартмента только одной мембраной (Calvayrac et al., 1981).

***E. gracilis* как продуцент парамилона**

Парамилон является довольно распространенным в природе полисахаридом и встречается в клетках многих бактерий, грибов, водорослей и высших растений (Freimund et al., 2003; Michel et al., 2010). В производственном масштабе для получения парамилона используют пекарские или пивные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. За счет комплексного процесса экстракции полисахарида достигается его сбор в количестве всего лишь 7–9% сухой биомассы микроорганизма (Ivusic et al., 2015). β -1,3-глюкан в клетках этих организмов локализуется в клеточной стенке и составляет 50–55% ее сухой биомассы (Shokri et al., 2008). Как правило, β -1,3-глюканы откладываются в негранулярной форме во всех организмах, кроме эвгленоидных (Baumer et al., 2001). Гранулы парамилона, содержание которых может достигать 95% массы клеток *E. gracilis*, состоят на 100% из глюкозы и имеют чрезвычайно высокий для природных макромолекул уровень кристаллизации (Barsanti et al., 2011). Окруженная одной мембраной гранула парамилона состоит из треугольных и прямоугольных сегментов, каждый из которых объединяет несколько слоев (Kiss et al., 1987). Подобно целлюлозе, парамилон объединен в микрофибриллы (диаметр 4 нм), состоящие из тройных спиралей β -1,3-глюкановых цепей, которые далее объединяются в более толстые волокна (Marchessault, Deslandes, 1979; Kiss et al., 1987). Высокоуровневое объединение микрофибрилл и взаимодействие их с молекулами воды способствуют высококристаллической структуре парамилона (Marchessault, Deslandes, 1979; Kiss et al., 1988). Такая форма организации парамилона в клетках микроводоросли значительно облегчает его выделение. Для этого достаточно разрушить клетки, покрытые белковой оболочкой, и промыть гранулы раствором детергента низкой концентрации (Barsanti et al., 2011).

Физиологические и биохимические свойства микроводорослей позволяют в широких пределах изменять условия их выращивания, подбирая наиболее эффективные и малозатратные. Выращивание *E. gracilis* при низких значениях pH (2,5–3,5) может снизить вероятность контаминации, а также стимулировать рост культуры (Barsanti et al., 2001). В качестве питательной среды для роста микроводоросли и накопления парамилона в ее клетках можно использовать гидратированные отходы сельскохозяйственной или сахарной промышленности. Для получения больших объемов биомассы *E. gracilis* успешно используют как биореакторы, так и открытые системы (Barsanti et al., 2001).

Динамика накопления β -1,3-глюкана при различных способах питания культуры *E. gracilis*

Синтез полисахарида активно проходит в экспоненциальной фазе роста культуры как на свету, так и в темноте (Briand et al., 1980). Уровень накопления парамилона в клетках периодической культуры

E. gracilis в присутствии лактата (сукцината, глутамата, ацетата) изменяется вместе с изменениями фаз ее роста. Культивирование в присутствии 33 мМ лактата показало, что максимальная активность фосфоенолпируваткарбоксилазы наблюдается на 18-й час и снижается на 36-й час культивирования (Cook, 1965). При выращивании клеток культуры *E. gracilis* на свету в ранней экспоненциальной фазе роста наблюдалось существенное повышение не только активности фосфоенолпируваткарбоксилазы, но и карбоксилазной активности Рубиско и активности фосфоенолпируваткарбоксикиназы (Calvayrac et al., 1981). При освещении, а также в темноте содержание полисахарида после инокуляции клеток в питательную среду достигает максимального значения на 36-й час культивирования, после чего стремительно снижается (Kiss et al., 1986; Briand et al., 2001). Использование лактата с мечеными атомами углерода доказало, что парамилон синтезируется в значительной степени из субстрата. Подобное исследование ассимиляции ацетата микроводорослью *E. gracilis* показало, что 75–80% меченого углерода субстрата встраивается в парамилон (Marzullo, Danforth, 1964). В этой же фазе роста в культуре на свету активно проходят процессы фотосинтеза и дыхания. Углекислый газ и кислород как конечные продукты дыхания и фотосинтеза снова вовлекаются в метаболизм клеток, поддерживая биосинтетические процессы (Cook, 1963). При этом на свету и в темноте наблюдали минимальное выделение CO₂, образующегося при окислении субстрата в процессе дыхания, что свидетельствует об активном его участии в процессах карбоксилирования (Marzullo, Danforth, 1964; Calvayrac et al., 1981; Briand et al., 2001).

Во второй половине экспоненциальной фазы роста количество парамилона уменьшается за счет его гликолитической трансформации. В этот период клетки *E. gracilis* начинают использовать накопленный полисахарид для роста и размножения, что наблюдается при незначительном содержании экзогенного субстрата (Rodriguez-Zavala et al., 2010). Когда исчерпывается лактат в питательной среде, большая часть карбоксилазной активности связана с активностью цитозольной фосфоенолпируват карбоксилазы. В данном случае фосфоглицериновая кислота, образованная в процессе гликолиза, попадает в цитозоль и превращается последовательно в малат, далее через промежуточные фосфоенолпируват и оксалоацетат входит в цикл трикарбоновых кислот (Briand et al., 1981). Максимальная концентрация клеток *E. gracilis* с низким содержанием парамилона достигается к моменту перехода от экспоненциальной в стационарную фазу роста культуры (Kiss et al., 1986).

По данным других авторов, динамика накопления парамилона в клетках как миксотрофных, так и фотоавтотрофных культур нарастающая, по сравнению с гетеротрофной культурой, где максимальное содержание парамилона приходится на конец экспоненциальной фазы роста и при дальнейшем культивировании снижается (Grimm et al., 2015). Фотоавтотрофное культивирование ведет к

формированию небольшого количества гранул парамилона в клетках *E. gracilis*, концентрирующихся вблизи пиреноида — в области локализации Рубиско в хлоропластах. Было отмечено, что пиреноиды исчезают при достаточном количестве субстрата в среде и высоком содержании парамилона в клетках, то есть в экспоненциальной фазе роста фотогетеротрофной культуры. По достижении стационарной фазы пиреноиды снова становятся заметными (Kiss et al., 1986).

При переводе культуры *E. gracilis* в анаэробные условия выращивания в качестве запасных соединений вместо полисахаридов активируется синтез восков. Этот процесс получил название ферментации восковых эфиров (Coleman, 1988b). Анаэробноз стимулирует синтез липидов за счет индукции кислород-чувствительной митохондриальной пируватдегидрогеназы, катализирующей превращение пирувата в ацетил-КоА. При этом используется углерод парамилона, вследствие чего наблюдается деградация полисахарида и синтез восковых эфиров. Содержание липидов может увеличиться с 5–10 до 55% сухой биомассы за 7 сут анаэробноза. Когда кислород становится снова доступным, в клетках *E. gracilis* происходит деградация липидов и синтезируется парамилон (Coleman, 1988b).

Оптимизация условий культивирования *E. gracilis* для увеличения выхода парамилона

Уровень накопления биомассы и биохимический состав клеток *E. gracilis* существенно зависят от способа выращивания микроводоросли (Kiss et al., 1986; Золотарева и др., 2008), также как и активность системы синтеза парамилона и аккумуляция его гранул в клетках (Mokrosnop, 2016). В оптимальных условиях содержание полисахарида может достигать 70% сухой биомассы клеток *E. gracilis* (O'Neill et al., 2015; Barsanti et al., 2011). Поэтому оптимизация состава питательной среды имеет важное значение при использовании *E. gracilis* в качестве продуцента парамилона, поскольку позволяет значительно повысить рентабельность биотехнологического процесса.

Исследования накопления гранул парамилона в зависимости от условий освещения показали, что при круглосуточном освещении культур *E. gracilis* в их клетках формируются только очень маленькие гранулы полисахарида, в отличие от культур, культивируемых при периодическом освещении. Формированию более крупных зерен парамилона в клетках способствовало выращивание культуры в темноте. При гетеротрофном культивировании *E. gracilis* можно получить в 6 раз больше запасного полисахарида, чем при фотоавтотрофном (Briand, Calvaugas, 1980). Было установлено, что pH питательной среды влияет на накопление биомассы. С его увеличением от 3 до 7 линейно уменьшается выход биомассы и парамилона (Sanrek et al., 2009).

Гетеротрофное культивирование *E. gracilis* с использованием глюкозы (фруктозы) в качестве экзогенного источника углерода является самым эффективным способом достижения высокого выхода

парамилаона в культуре (Cook, 1965; Garlaschi et al., 1974; Grimm et al., 2015). Значительно менее выраженный положительный эффект отмечался при замене глюкозы на галактозу, лактозу, мальтозу или сахарозу в ходе культивирования *E. gracilis* с целью получения парамилаона. Сахароза и мальтоза очень медленно метаболизируются клетками *E. gracilis*, а лактоза и галактоза, хотя и стимулируют деление клеток микроводоросли, однако не способствуют накоплению биомассы. Для выращивания *E. gracilis* в промышленных масштабах можно эффективно использовать сахарозу, но только после предварительного гидролиза (химического или ферментативного) до глюкозы и фруктозы (Ivusic et al., 2015).

При фотогетеротрофном культивировании *E. gracilis* в присутствии глюкозы наблюдается почти двухкратное снижение выхода биомассы и парамилаона (табл. 1). Такой результат связывают со взаимовлиянием процессов фотосинтетической ассимиляции CO₂ и ассимиляции органического углерода клетками. Глюкоза ингибирует фотосинтез даже при низком освещении (Mukhaulenko et al., 2004; Nicolas et al., 1980), а освещение меняет проницаемость мембран, что, в свою очередь, снижает поглощение глюкозы клетками (Garlaschi et al., 1974; Grimm et al., 2015). К тому же, в условиях освещения парамилон частично используется для построения фотосинтетического аппарата (Garlaschi et al., 1974; Grimm et al., 2015). Результаты других исследований показали, что при миксотрофном выращивании в присутствии глюкозы и (NH₄)₂SO₄ можно получить приблизительно на 20% больше биомассы, чем при гетеротрофном культивировании (Yamane et al., 2001). Повышенную интенсивность роста миксотрофных культур, по сравнению с гетеротрофными, авторы связывают с эффективным использованием энергии света, затраченной на анаболические процессы, для обеспечения которых из питательной среды извлекаются органические источники углерода (Yamane et al., 2001). Внесение источника азота органического или неорганического происхождения может в несколько раз увеличить накопление биомассы культурой (Ivusic et al., 2015; Rodriguez-Zavala et al., 2010).

Таблица 1

Накопление парамилаона в клетках *E. gracilis* в зависимости от типа питания культуры (Grimm et al., 2015)

Тип питания	Парамилон	Биомасса	Массовая доля парамилаона в биомассе, %
	г/л		
Автотрофный	0,6	3	20
Фотогетеротрофный	3	7	42,9
Гетеротрофный	9	12,2	73,8

Примечание. В качестве органического субстрата использована глюкоза (22 г/л).

В последнее время активно исследуется использование побочных продуктов пищевых производств в качестве источников питательных веществ для выращивания *E. gracilis* и накопления парамилаона в её клетках. Среди исследованных дрожжевого экстракта, мясного и кукурузного экстрактов последний имел наивысшую питательную ценность для культуры *E. gracilis* (табл. 2). Добавление кукурузного экстракта (20–30 г/л) в питательную среду с глюкозой (20 г/л) стимулирует накопление парамилаона (на 15%) и липидов (на 40%), при гетеротрофных и миксотрофных условиях культивирования соответственно (Ivusic et al., 2015; Rezić et al., 2013). Внесение в питательную среду одновременно кукурузного и мясного экстрактов повышало выход биомассы, но незначительно сказывалось на содержании в ней парамилаона (Ivusic et al., 2015).

Выращивание *E. gracilis* с использованием картофельного раствора, основного побочного продукта крахмальной промышленности, оказалось более эффективным, чем культивирование на синтетической среде. Картофельный раствор содержит большое количество минералов, белков, аминокислот, сахаров и представляет собой отделенное от крахмальных зерен крахмальное молоко.

Таблица 2

Зависимость максимального уровня накопления клетками парамилаона от внесения питательных экстрактов в культуральную среду при гетеротрофном выращивании *E. gracilis* (Hutner et al., 1966; Sanrek et al., 2009; Ivusic, Santek, 2015)

Среда культивирования	Продолжительность культивирования, ч	Максимальное содержание парамилаона, г/л	Биомасса, г/л
Среда Хатнера (СХ) (20 г/л глюкозы)	96	7	13,5
СХ + дрожжевой экстракт (40 г/л)	68	5,13	11,08
СХ + кукурузный экстракт (30 г/л)	68	8,28	15,65
СХ + кукурузный экстракт (30 г/л) + мясной экстракт (5 г/л)	120	8,35	17,05
СХ + картофельный раствор (37,5%)	96	12	15,1

Для быстрого получения высокого выхода биомассы и парамилаона в питательной среде использовали 37,5% картофельного раствора и 25 г/л глюкозы. При этом уже на 4-е сутки содержание парамилаона превышало 70% биомассы культуры. Культура, которая росла на синтетической среде Хатнера без добавления картофельного раствора,

содержала не более 50% парамилона (Hutner et al., 1966, Sanrek et al., 2010).

Автотрофное культивирование *E. gracilis* не рассматривается при создании оптимальных условий для накопления парамилона, поскольку не обеспечивает накопления ни больших количеств биомассы, ни полисахарида в клетках (Briand et al., 1981). При фотоавтотрофном культивировании только небольшое количество избыточной энергии запасается в виде полисахарида, и уровень синтеза парамилона растет с увеличением интенсивности света в оптимальных пределах (Cook, 1963).

Накопление парамилона при утилизации экзогенного этанола в процессе миксотрофного культивирования *E. gracilis*

Миксотрофный рост многих микроводорослей стимулируется при использовании метанола в качестве источника углерода и энергии (Stepanov, Zolotareva, 2015), однако большинство видов микроводорослей не способны утилизировать этиловый спирт (Stepanov, Zolotareva, 2011). Ассимиляция этанола отличает *E. gracilis* от большинства микроорганизмов, для которых этот спирт токсичен (Мокросноп и др., 2015а, б). Метаболизм этанола в клетках *E. gracilis* осуществляется за счет митохондриальных НАД⁺-дегидрогеназ и высокоактивных альдегиддегидрогеназ, а также ферментов глиоксилатного цикла, изоцитрат лиаза и малат синтазы. При окислении этанола алкоголь- и альдегиддегидрогеназами в митохондриях генерируется энергия в виде АТФ и происходит синтез ацетил-КоА. В процессе глиоксилатного цикла синтезируются C4-соединения, которые вовлекаются в глюконеогенез (Ono, 1995, Yoval-Sanchez, 2011). Большинство исследований влияния этанола на метаболизм микроводоросли *E. gracilis* проводилось в условиях гетеротрофии на клетках, не способных к фотосинтезу. Культивирование *E. gracilis* на свету в присутствии этанола исследовано недостаточно. Поэтому, допустимо, что в результате этого процесса могут быть получены другие характеристики дыхания и аккумуляции ценных метаболитов клетками. В миксотрофных (Мокросноп и др., 2015а, б) и гетеротрофных условиях этанол активизирует дыхание, глюконеогенез и фотосинтетическое выделение кислорода.

Добавление 1%-ного этанола в качестве источника углерода в питательную среду микроводоросли *E. gracilis* с малатом и глутаматом способствует увеличению выхода биомассы и парамилона в периодической гетеротрофной культуре почти в 5 раз на 5-е сутки культивирования. Примерно такой же результат получен при замене этанола на глюкозу, но за счет большего содержания парамилона в клетках (Marzullo, Danforth, 1964).

В наших опытах содержание парамилона в культурах с этанолом варьировало в процессе их роста (рис. 2). В первые сутки культивирования было зафиксировано резкое увеличение содержания запасного полисахарида в клетках культуры с этанолом и в варианте с

добавлением этанола и глутамата натрия. До пяти суток наблюдалось постепенное снижение концентрации парамилона в клетках миксотрофных культур, которое все же не достигало контрольного уровня. В клетках контрольного варианта уровень парамилона не изменялся, а его концентрация (~ 20 пг/кл) в течение всего периода исследований оставалась постоянной (Mokrosnop, 2016).

Сравнивая эффект этанола с другими экзогенными источниками органического углерода, авторы пришли к выводу, что этот спирт легче глюкозы ассимилируется клетками и интенсифицирует рост культуры (Rodriguez-Zavala et al., 2010). При выращивании ее с этанолом в отсутствие дополнительных источников азота деление клеток культуры ингибируется, однако количество накопленного полисахарида в клетках и размер самих клеток увеличиваются почти вдвое (Rodriguez-Zavala et al., 2010; Coleman, 1988a).

Изучение влияния этанола на метаболизм клеток *E. gracilis*, культивируемых гетеротрофно, показало, что этот спирт быстро окисляется в клетках до ацетата, 50% углерода которого встраивается в парамилон. Также есть данные о том, что этанол в качестве субстрата ингибирует гликолиз в клетках и меняет направление метаболических превращений пирувата в пользу преимущества глюконеогенеза над синтезом белков, липидов и нуклеиновых кислот. При этом количество CO₂, выделяемого в процессе дыхания, уменьшается до 10%, а 70% глюкозы клеток встраивается в парамилон. Для сравнения, при использовании глюкозы в качестве субстрата лишь 25–30% ее переходит в состав запасного полисахарида (Garlaschi et al., 1974).

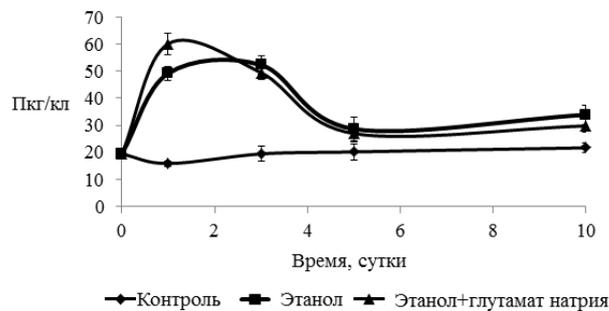


Рис. 2. Накопление парамилона клетками *Euglena gracilis* при миксотрофном культивировании в присутствии 100 мМ этанола

Снижение синтеза полисахарида при фотогетеротрофном культивировании объясняют стимуляцией светозависимого синтеза липидов, пигментов, белков в присутствии дополнительных источников азота (Coleman et al., 1988a).

Перспективы использования парамилона *E. gracilis* в фармакологии и ветеринарии

Результаты исследований влияния β -глюканов на здоровье человека (Bashir, Choi, 2017) показали, что эти полисахариды снижают уровень насыщенных жиров в крови и могут снизить риск сердечных заболеваний. β -глюканы обладают сильной иммуномодулирующей и антиостеопоротической активностью, что было доказано клиническими испытаниями *in vitro* на животных и человеке. Изучена эффективность использования β -глюканов в качестве противомикробных, противоопухолевых, антидиабетических средств, а также показана их способность предотвращать остеопороз (Bashir, Choi, 2017). Эти полисахариды могут подавлять рост опухолей, активируя макрофаги и клетки-киллеры, которые действуют цитотоксически на клетки опухолей, экспрессирующих цитокины. Онкостатическое действие β -глюканов также может быть связано с замедлением ангиогенеза в очагах роста опухоли. Механизм действия β -глюканов включает их связывание с клеточными рецепторами, которое ведет к стимуляции иммунного ответа (Rodriguez-Zavala et al., 2010). Однако систематического изучения клинического и физиологического значения β -глюканов не проводили.

Применение β -глюканпарамилона в медицине и ветеринарии весьма перспективно. К биологически активным и лечебным свойствам парамилона относится его способность к стимуляции иммунной системы организма, к защите от вирусных и бактериальных инфекций, а также к противоопухолевому и радиопротекторному действию. Данный полисахарид также используется для подкормки животных, поскольку активирует рост иммунитета и стимулирует их рост, также способствует снижению уровня холестерина в крови, регулируя гликометаболизм (Barsanti et al., 2011; Freimund et al., 2003).

Таким образом, благодаря своим свойствам парамилон может использоваться для профилактики и лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы и рака – наиболее распространенных заболеваний в промышленно развитых странах (Barsanti et al., 2011).

Выводы

Исследования показали, что микроводоросль *Euglena gracilis* может быть перспективным продуцентом парамилона, ценного для человека полисахарида, обладающего рядом свойств, способствующих поддержанию здоровья. Наибольшее накопление его, главным образом, зависит от таких условий культивирования клеток *E. gracilis*, как:

- выращивание культуры в темноте;
- использование глюкозы (фруктозы) в качестве органического субстрата;
- внесение дополнительно источников азота (глутамата натрия, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Возможно также использование побочных продуктов производства для подкормки *E. gracilis* с целью получения биомассы, обогащенной полисахаридом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Золотарьова О., Шнюкова Є. Куди прямує біопаливна індустрія? *Вісн. НАН України*. 2010. (4): 10–20.
- Золотарьова О.К., Шнюкова Є.І., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. *Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології*. Київ: Альтерпрес, 2008 с.
- Мокросноп В.М., Поліщук О.В., Золотарьова О.К. Функціональний стан фотосинтетичного апарату клітин *Euglena gracilis* при міксотрофному культивуванні. *Доп. НАН України*. 2015а. (10): 77–84.
- Мокросноп В.М., Поліщук О.В., Золотарьова О.К. Вплив етанолу на дихання і фотосинтез *Euglena gracilis*. *Мікробіол. біотехнол.* 2015б. 27(3): 49–56.
- Шнюкова Е.И., Золотарева Е.К. Экзополисахариды диатомовых водорослей (*Bacillariophyta*). *Альгология*. 2015. 25(1): 1–20.
- Шнюкова Е.И., Золотарева Е.К. Экологическая роль экзополисахаридов (*Bacillariophyta*). *Альгология*. 2017. 27(1): 22–44.
- Ahmadinejad N., Dagan T., Martin W. Genome history in the symbiotic hybrid *Euglena gracilis*. *Gene*. 2007. 402(1): 35–39.
- Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V., Frassanito A.M., Gualtieri P. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. *Nat. Prod. Rep.* 2011. 28: 457–466.
- Barsanti L., Vismara R., Passarelli V., Gualtieri P. Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSI mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *J. Appl. Phycol.* 2001. 13: 59–65.
- Bashir K.M.I., Choi J.S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: the past, present, and future. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18(9): 1906. doi: 10.3390/ijms18091906
- Baumer D., Preisfeld A., Ruppel H.G. Isolation and characterization of paramylon synthase from *Euglena gracilis* (*Euglenophyceae*). *J. Phycol.* 2001. 37: 38–46.
- Briand J., Calvayrac R. Paramylon synthesis in heterotrophic and photoheterotrophic *Euglena* (*Euglenophyceae*). *J. Phycol.* 1980. 16(2): 234–239.
- Briand J., Calvayrac R., Laval-Martin D., Farineau J. Evolution of carboxylating enzymes involved in paramylon synthesis in heterotrophically grown *Euglena gracilis*. *Planta*. 1981. 151: 168–175.
- Calvayrac R., Laval-Martin D., Briand J., Farineau J. Paramylon synthesis by *Euglena gracilis* photoheterotrophically grown under low O₂ pressure. *Planta*. 1981. 153: 6–13.
- Cheirsilp B., Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Biores. Technol.* 2012. 110: 510–516.
- Coleman L.W., Rosen B.H., Schwartzbach S.D. Environmental control of carbohydrate and lipid in *Euglena*. *Plant Cell Physiol.* 1988a. 29(3): 423–432.
- Coleman L.W., Rosen B.H., Schwartzbach S.D. Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *Plant Cell Physiol.* 1988b. 29(3): 423–432.
- Cook J.R. Adaptations in growth and division in *Euglena* effected by energy supply. *J. Protozool.* 1963. 10: 436–444.

- Cook J.R. Influence of light on acetate utilization in green *Euglena*. *Plant Cell Physiol.* 1965. 6: 301–307.
- Freimund S., Sauter M., Kappeli O., Dutler H. A new non-degrading isolation process for 1,3-beta-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polym.* 2003. 54: 159–171.
- Garlaschi F.M., Garlaschi A.M., Lombardi A., Forti G. Effect of ethanol on the metabolism of *Euglena gracilis*. *Plant Sci. Lett.* 1974. 2: 29–39.
- Grimm P., Risse J.M., Cholewa D., Müller J.M., Beshay U., Friehs K., Flaschel E. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *J. Biotechnol.* 2015. 215: 72–79.
- Hutner S. H., Zahalsky A. C., Aaronson S., Baker H., Frank O. Culture media for *Euglena gracilis*. *Methods Cell Physiol.* 1966. 2: 217–228.
- Ivusic F., Santek B. Optimization of complex medium composition for heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* and paramylon production. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2015. 38(6): 1103–1112.
- Kiss J.Z., Vasconcelos A.C., Triemer R.E. Paramylon synthesis and chloroplast structure associated with nutrient levels in *Euglena* (*Euglenophyceae*). *J. Phycol.* 1986. 22: 327–333.
- Kiss J.Z., Vasconcelos C.A., Triemer R.E. The intramembrane particle profile of the paramylon membrane during paramylon synthesis in *Euglena* (*Euglenophyceae*). *J. Phycol.* 1988. 24: 152–157.
- Marchessault R.H., Deslandes Y. Fine structure of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans: curdlan and paramylon. *Carbohydrate Res.* 1979. 75: 231–242.
- Marechal L.R., Goldemberg S.H. Uridine diphosphate glucose-beta-1,3-glucan beta-3-glucosyltransferase from *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 1964. 239(10): 3163–3167.
- Marzullo G., Danforth W.F. Composition of ethanol-insoluble assimilatory products of oxidative assimilation of acetate by *Euglena gracilis*. *J. Gen. Microbiol.* 1964. 34: 21–29.
- Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J.M., Kloareg B. Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytol.* 2010. 188(1): 67–81.
- Mokrosnop V.M. Dynamics of chlorophyll and paramylon accumulation in *Euglena gracilis* cells at mixotrophic cultivation. *Stud. Biol.* 2016. 10(3): 141–148.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk A.V., Zolotareva E.K. Accumulation of β -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and Mixotrophic Culture Conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. 52(2): 216–221.
- Mokrosnop V.M., Zolotareva E.K. Microalgae as tocopherol producers. *Biotechnol. Acta.* 2014. 7(2): 26–33.
- Mykhaylenko N.F., Syvash O.O., Tupik N.D., Zolotareva O.K. Exogenous hexoses cause quantitative changes of pigment and glycerolipid composition in filamentous cyanobacteria. *Photosynthetica.* 2004. 42(1): 105–110.
- Nicolas P., Freyssinet G., Nigon V. Effect of light on glucose utilization by *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.* 1980. 65: 631–634.
- Ogbonna J.C., Ichige E., Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. 58: 532–538.

- O'Neill E.C., Trick M., Hill L., Rejzek M., Dusi R.G., Hamilton C.J., Zimba P.V., Henrissat B., Field R.A. The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Mol. BioSyst.* 2015. 11: 2808–2820.
- Rezic T., Filipovic J., Santek B. Photo-mixotrophic cultivation of algae *Euglena gracilis* for lipid production. *Agriculturae Conspectus Scientificus.* 2013. 78: 65–69.
- Rodriguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernandez G., Moreno-Sanchez R. Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *J. Appl. Microbiol.* 2010. 109: 2160–2172.
- Sanrek B., Felski M., Friehs K., Lotz M., Flaschel E. Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on potato liquor. *Eng. Life Sci.* 2010. 10(2): 165–170.
- Sanrek B., Felski M., Friehs K., Lotz M., Flaschel E. Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic medium. *Eng. Life Sci.* 2009. 9(1): 23–28.
- Shokri H., Asadi F., Khosravi A.R. Isolation of beta-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Natur. Product Res.* 2008. 22(5): 414–421.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* 2015. 27(4): 1509–1516.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. Methanol metabolism in plants. *Ukr. Biochem.* 2011. 83(4): 5–15.
- Sivash A.A., Los S.I., Fomishina R.N., Zolotareva E.K. Regulatory role of glucose in metabolism of certain *Cyanophyta* representatives. *Int. J. Algae.* 2004. 6(1): 50–60.
- Takeda T., Nakano Y., Takahashi M., Konno N., Sakamoto R.A., Marukawa Y., Yoshida E., Ishikawa T., Suzuki K. Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Euglena gracilis*. *Phytochemistry.* 2015. 116: 21–27.
- Yamane Y., Utsunomiya T., Watanabe M., Sasaki K. Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics. *Biotechnol. Lett.* 2001. 23: 1223–1228.
- Yoval-Sanchez B., Jasso-Chavez R., Lira-Silva E., Moreno-Sánchez R., Rodriguez-Zavala J.S. Novel mitochondria alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2011. 43: 519–530.

Поступила 27 декабря 2017 г.
Подписал в печать П.М. Царенко

REFERENCES

- Ahmadinejad N., Dagan T., Martin W. *Gene.* 2007. 402(1): 35–39.
- Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V., Frassanito A.M., Gualtieri P. *Nat. Prod. Rep.* 2011. 28: 457–466.
- Barsanti L., Vismara R., Passarelli V., Gualtieri P. *J. Appl. Phycol.* 2001. 13: 59–65.
- Bashir K.M.I., Choi J.S. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18(9): 1906. doi: 10.3390/ijms18091906
- Baumer D., Preisfeld A., Ruppel H.G. *J. Phycol.* 2001. 37: 38–46.
- Briand J., Calvayrac R. *J. Phycol.* 1980. 16(2): 234–239.

- Briand J., Calvayrac R., Laval-Martin D., Farineau J. *Planta*. 1981. 151: 168–175.
- Calvayrac R., Laval-Martin D., Briand J., Farineau J. *Planta*. 1981. 153: 6–13.
- Cheirsilp B., Torpee S. *Biores. Technol.* 2012. 110: 510–516.
- Coleman L.W., Rosen B.H., Schwartzbach S.D. *Plant Cell Physiol.* 1988a. 29(3): 423–432.
- Coleman L.W., Rosen B.H., Schwartzbach S.D. *Plant Cell Physiol.* 1988b. 29(3): 423–432.
- Cook J.R. *J. Protozool.* 1963. 10: 436–444.
- Cook J.R. *Plant Cell Physiol.* 1965. 6: 301–307.
- Freimund S., Sauter M., Kappeli O., Dutler H. *Carbohydrate Polym.* 2003. 54: 159–171.
- Garlaschi F.M., Garlaschi A.M., Lombardi A., Forti G. *Plant Sci. Lett.* 1974. 2: 29–39.
- Grimm P., Risse J.M., Cholewa D., Muller J.M., Beshay U., Friehs K., Flaschel E. *J. Biotechnol.* 2015. 215: 72–79.
- Hutner S.H., Zahalsky A.C., Aaronson S., Baker H., Frank O. *Methods Cell Physiol.* 1966. 2: 217–228.
- Ivusic F., Santek B. *BioprocessBiosyst Eng.* 2015. 38(6): 1103–1112.
- Kiss J.Z., Vasconcelos A.C., Triemer R.E. *J. Phycol.* 1986. 22: 327–333.
- Kiss J.Z., Vasconcelos C.A., Triemer R.E. *J. Phycol.* 1988. 24: 152–157.
- Marchessault R.H., Deslandes Y. *Carbohydrate Res.* 1979. 75: 231–242.
- Marechal L.R., Goldemberg S.H. *J. Biol. Chem.* 1964. 239(10): 3163–3167.
- Marzullo G., Danforth W.F. *J. Gen. Microbiol.* 1964. 34: 21–29.
- Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J.M., Kloareg B. *New Phytol.* 2010. 188(1): 67–81.
- Mokrosnop V.M. *Stud. Biol.* 2016. 10(3): 141–148.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk A.V., Zolotareva E.K. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016. 52(2): 216–221.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk O.V., Zolotarova O.K. *Dop. NAN Ukrainy.* 2015a. (10): 77–84.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk O.V., Zolotarova O.K. *Mikrobiol. biotekhnol.* 2015b. 27(3): 49–56.
- Mokrosnop V.M., Zolotareva E.K. *Biotechnol. Acta.* 2014. 7(2): 26–33.
- Mykhaylenko N.F., Syvash O.O., Tupik N.D., Zolotareva O.K. *Photosynthetica.* 2004. 42(1): 105–110.
- Nicolas P., Freyssinet G., Nigon V. *Plant Physiol.* 1980. 65: 631–634.
- O'Neill E.C., Trick M., Hill L., Rejzek M., Dusi R.G., Hamilton C.J., Zimba P.V., Henrissat B., Field R.A. *Mol. BioSyst.* 2015. 11: 2808–2820.
- Ogbonna J.C., Ichige E., Tanaka H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. 58: 532–538.
- Rezic T., Filipovic J., Santek B. Photo-mixotrophic cultivation of algae *Euglena gracilis* for lipid production. *Agriculturae Conspectus Scientificus.* 2013. 78: 65–69.
- Rodriguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernandez G. *J. Appl. Microbiol.* 2010. 109: 2160–2172.
- Sanrek B., Felski M., Friehs K., Lotz M., Flaschel E. *Eng. Life Sci.* 2010. 10(2): 165–170.
- Sanrek B., Felski M., Friehs K., Lotz M., Flaschel E. *Eng. Life Sci.* 2009. 9(1): 23–28.
- Shnyukova E.I., Zolotareva E.K. *Algologia.* 2015. 25(1): 1–20.
- Shnyukova E.I., Zolotareva E.K. *Algologia.* 2017. 27(1): 22–44.
- Shokri H., Asadi F., Khosravi A.R. *Natur. Product Res.* 2008. 22(5): 414–421.
- Sivash A.A., Los S.I., Fomishina R.N., Zolotareva E.K. *Int. J. Algae.* 2004. 6(1): 50–60.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. *J. Appl. Phycol.* 2015. 27(4): 1509–1516.

- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. *Ukr. Biochem.* 2011. 83(4): 5–15.
- Takeda T., Nakano Y., Takahashi M., Konno N., Sakamoto R.A., Marukawa Y., Yoshida E., Ishikawa T., Suzuki K. *Phytochemistry*. 2015. 116: 21–27.
- Yamane Y., Utsunomiya T., Watanabe M., Sasaki K. *Biotechnol. Lett.* 2001. 23: 1223–1228.
- Yoval-Sanchez B., Jasso-Chavez R., Lira-Silva E., Moreno-Sánchez R., Rodriguez-Zavala J.S. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2011. 43: 519–530.
- Zolotarova O., Shnyukova Ye. *Visn. NAN Ukrainy.* 2010. (4): 1020.
- Zolotarova O.K. Shnyukova Ye.I., Sivash O.O., Mikhaylenko N.F. *Perspektivi vikoristannya mikrovodorostey u biotekhnologiyi [Prospects for the use of microalgae in biotechnology]*. Kyiv: Alterpres, 2008 p.

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2018, 28(2): 136–151

<https://doi.org/10.15407/alg28.02.136>

Mokrosnop V.M.

N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine
2 Tereshchenkovskaya St., Kiev 01004, Ukraine

PRODUCTION OF STORAGE POLYSACCHARIDE PARAMYLON IN MICROALGA
EUGLENA GRACILIS KLEBS (*EUGLENA*, *EUGLENOPHYCEAE*)

Unicellular flagellate microalga *Euglena gracilis*, depending on the conditions of cultivation, accumulates a large amount of reserve polysaccharide paramylon (β -1.3-glucan). This evidence provides need to consider it as a promising producer of this carbohydrate. The review presents data on the structure and synthesis of paramylon, as well as the features of its accumulation by *E. gracilis* cells. The degree of polysaccharide accumulation in cells depends on the conditions of cultivation including the presence of light, types of organic substrate, access to oxygen, etc. According to the literature data, the favorable conditions for stimulating the synthesis of paramylon in *E. gracilis* cells include periodic illumination of the culture, or lack of light, and the presence of an organic carbon source in the medium; in this capacity, glucose and fructose were the most effective. The lack of oxygen in the nutrient medium rebuilds the metabolism of *E. gracilis* cells from the synthesis of paramylon to the synthesis of waxes and is therefore not favorable for the accumulation of a polysaccharide. A comparison of the dynamics of paramylon accumulation in *E. gracilis* cells cultivated auto- and mixotrophically showed that the concentration of polysaccharide per cell was maximum in the first few days of cultivation in the presence of exogenous substrates. The addition of an organic nitrogen source additionally stimulates the accumulation of paramylon in the lag growth phase of the mixotrophic culture. During autotrophic cultivation, the content of paramylon does not noticeably change with the cultivation time. Analysis of the data on the use of by-products in the food industry as a source of nutrients for the growth of microalgae and accumulation of paramylon reveals that corn and potato extracts have the highest nutritional value for *E. gracilis* culture. The review also discusses the prospect of using paramylon in pharmacology and veterinary medicine as a stimulant and modulator of the immune system.

Key words: *Euglena gracilis*, *Euglenophyta*, glucan, paramylon, mixotrophy