

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). Algologia. 2017, 27(1): 15–21

doi.org/10.15407/alg27.01.015

УДК 582.261.1: 577.1

РЯБУШКО В.И., ЖЕЛЕЗНОВА С.Н., НЕХОРОШЕВ М.В.

Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского,  
пр. Нахимова, 2, Севастополь 299011, Крым  
rabushko2006@yandex.ru

### ВЛИЯНИЕ АЗОТА НА НАКОПЛЕНИЕ ФУКОКСАНТИНА ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛЮ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN

Исследовано влияние азота в питательной среде на накопление фукоксантина (Fc) диатомовой водорослью *Cylindrotheca closterium*. Содержание Fc в биомассе микроводоросли определяли при переходе на стационарную фазу роста. Увеличение концентрации азота в питательной среде F/2 способствует накоплению фукоксантина в культуре. Установлено, что при концентрации нитрата натрия 225–300 мг·л<sup>-1</sup> в питательной среде количество фукоксантина в сухой биомассе *C. closterium* достигает 15 мг·г<sup>-1</sup>. При этом максимальная концентрация клеток составляет более 2 млн кл·мл<sup>-1</sup>, а среднесуточная удельная скорость роста – 0,21 сут<sup>-1</sup>. Использование питательной среды с высокой концентрацией азота позволяет получать культуру *C. closterium*, обогащенную биологически активным веществом фукоксантин. Поэтому диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium* можно рассматривать как перспективный объект в биотехнологии.

Ключевые слова: *Bacillariophyta*, *Cylindrotheca closterium*, культивирование, азот, фукоксантин.

#### Введение

Микроводоросли синтезируют ряд веществ, обладающих высокой биологической активностью. Наиболее известные из них – витамины, каротиноиды, макро- и микроэлементы, производные хлорофилла, полиненасыщенные жирные кислоты. Важнейшими компонентами *Bacillariophyta* являются каротиноиды, при этом количество фукоксантина (Fc) достигает 70% общего содержания всех каротиноидов (Peng et al., 2011). Фукоксантин был обнаружен в биомассе диатомовых водорослей *Chaetoseris* sp., *Cylindrotheca closterium*, *Odontella aurita* (Lynb.) C. Agardh и *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (Rijstenbil, 2003; Moreau et al., 2006; Kim et al., 2012) и др. Наличие большого количества активных химических групп в молекуле Fc таких, как алленовая, карбонильная, сложноэфирная, эпокси- и оксигруппы, обуславливают его высокую биологическую активность.

© Рябушко В.И., Железнова С.Н., Нехорошев М.В., 2017

Наиболее ценным свойством Fc для использования в медицине является его способность связывать свободные радикалы в организме, препятствуя тем самым окислению и разрушению ряда макромолекул клеток. Прием фукоксантина способствует уменьшению массы тела, снижению уровня инсулина и глюкозы в крови, предотвращает рак печени и кожи в результате антиокислительного действия, а также рак груди и простаты (Kotake-Naga et al., 2001). Поэтому в последнее время активно ведется поиск быстро возобновляемых природных источников фукоксантина.

Перспективным объектом для этого может быть диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium*, широко распространенная в прибрежных водах Черного моря. Известно, что при культивировании этого вида содержание пигментов в ее клетках изменяется в зависимости от фазы роста культуры, освещенности и концентрации биогенных элементов (Affan et al., 2009). На стационарной фазе роста биомасса микроводорослей достигает своего максимального значения, что влечет за собой уменьшение светового потока, проходящего через культуру, и концентрации соединений фосфора в среде. Изменение этих параметров влияет на процесс каротиногенеза, вследствие чего на стационарной фазе роста культуры микроводоросли наблюдается максимальное содержание Fc. Уменьшение или увеличение содержания азота в питательной среде при культивировании *Phaeodactylum tricornerutum* влияет на интенсивность фотосинтеза и отражается на качественном и количественном составе пигментов (Li et al., 2012). Высокие концентрации азота в среде значительно способствуют накоплению фитосинтетических пигментов в клетках микроводорослей.

Цель работы – определение зависимости количества фукоксантина в культуре *C. closterium* от концентрации азота в питательной среде.

### Материалы и методы

Объектом исследования была *Cylindrotheca closterium* из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ им. А.О. Ковалевского. Водоросль выращивали в плоских культиваторах толщиной 5 см и объемом 3 л при круглосуточном освещении 6 клк и температуре 25 °С в накопительном режиме на питательной среде F/2 (Gullard et al., 1963). Питательная среда содержала различные концентрации нитрата натрия: 112, 150, 225 и 300 мг·л<sup>-1</sup>. В процессе выращивания культуру непрерывно барботировали воздухом.

Численность клеток определяли в микроскопе МБИ-6 с помощью камеры Горяева. Удельную скорость роста культуры ( $\mu$ , сут<sup>-1</sup>) рассчитывали по формуле:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\Delta T},$$

где  $N_0$  – начальная концентрация клеток, млн кл.·мл<sup>-1</sup>;  $N$  – конечная концентрация клеток, млн кл.·мл<sup>-1</sup>;  $\Delta T$  – время экспозиции, сут.

Содержание сухой биомассы в культуре определяли после высушивания микроводоросли до постоянной массы. Количество фукоксантина в *C. closterium* определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинах (20 × 20 см), покрытых слоем силикагеля толщиной 0,5 мм. Пластины изготавливали на приспособлении для нанесения тонких слоев силикагеля с регулировкой толщины слоя фирмы Sandor Southern Unoplan.

Для экстракции Fc 0,5 г сырой биомассы микроводоросли трижды инкубировали в небольшом количестве спирта (0,5 мл). Полученный суммарный спиртовой экстракт 0,1–0,2 мл наносили на пластины и разделяли в хроматографической камере в системе гексан : ацетон (7 : 3). Фукоксантин в *C. closterium* определяли по хроматографическим и спектральным характеристикам. Затем эти показатели сравнивали с характеристиками кристаллического Fc, выделенного ранее из черноморской бурой водоросли цистозеры, идентифицированного методами ядерно-магнитного резонанса и масс-спектрометрии (Ryabushko et al., 2014).

Фракцию силикагеля, содержащую Fc, трижды экстрагировали спиртом с последующим центрифугированием. Концентрацию фукоксантина (мг·л<sup>-1</sup>) определяли на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 450 нм с последующим пересчетом на сухую биомассу микроводоросли по формуле:

$$F_c = \frac{10 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot D_{450}}{E \cdot V_3 \cdot B},$$

где  $V_1$  – объем объединенного элюата с пластины, мл;  $V_2$  – объем экстракта из навески, мл;  $V_3$  – объем аликвоты, нанесенной на пластину, мл;  $D_{450}$  – оптическая плотность при длине волны 450 нм;

$B$  – сухая биомасса, г;  $E_{1\%}^{1\text{см}} = 1280$  – коэффициент удельной экстинкции фукоксантина в этаноле (Hashimoto et al., 2009). Содержание остальных пигментов в культуре *C. closterium* составляет менее 11% общего количества каротиноидов.

### Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что содержание фукоксантина в культуре водоросли *C. closterium* достигает максимального значения на стационарной фазе роста микроводорослей (Rijstenbil, 2003; Kim et al., 2012). Поэтому содержание Fc в биомассе микроводоросли определяли при переходе на стационарную фазу роста, которая наступала на 7-й день культивирования при концентрациях нитрата натрия в питательной среде 112, 150, 225 мг·л<sup>-1</sup> и на 8-й день при концентрации 300 мг·л<sup>-1</sup>. Высокое содержание фукоксантина в биомассе микроводоросли можно получить, культивируя *C. closterium* при низкой освещенности (6 клк) и варьируя концентрацию нитратов в питательной

среде F/2. При содержании 300 мг·л<sup>-1</sup> нитрата натрия в питательной среде в биомассе микроводорослей было зафиксировано максимальное количество Fc, что в 3 раза превышает значения этого показателя, полученные при более низких концентрациях азота (см. таблицу). При этом низкие значения конечной биомассы во всех четырех экспериментах можно объяснить процессами ингибирования роста развития *C. closterium* за счет лимитирования среды по фосфору и кремнию. В стационарной фазе роста количество клеток и, соответственно, сухая биомасса микроводорослей в культуре изменяются незначительно, в то время как общее количество Fc в культуре возрастает в результате накопления фукоксантина в клетках микроводорослей.

Содержание фукоксантина (Fc) в культуре *Cylindrotheca closterium* при разной концентрации азота в среде

Концентрация нитрата натрия, мг·л <sup>-1</sup>	Кол-во клеток в стационарной фазе роста, млн кл.·мл <sup>-1</sup>	Удельная скорость роста на 3-и сутки, сут <sup>-1</sup>	Сухая биомасса, мг·л <sup>-1</sup>	Концентрация фукоксантина, мг·г <sup>-1</sup>	Средняя концентрация фукоксантина, мг·кл <sup>-1</sup>
112	1,86±0,10	0,12	0,35±0,01	4,89±0,30 *	0,91·10 <sup>-9</sup>
150	2,08±0,24	0,14	0,40±0,02	9,48±0,32 *	1,82·10 <sup>-9</sup>
225	2,33±0,15	0,21	0,48±0,01	13,10±0,24 *	2,60·10 <sup>-9</sup>
300	1,92±0,20	0,11	0,37±0,02	15,20±0,17 *	3,06·10 <sup>-9</sup>

Примечание: ± – доверительный интервал; \* – различия достоверны ( $p \leq 0,05$ ).

Концентрация нитрата натрия 225–300 мг·л<sup>-1</sup> в питательной среде F/2 является оптимальной для накопления фукоксантина в биомассе микроводоросли, выращенной на этой среде. В таких условиях получена достаточно высокая численность клеток *C. closterium* и значительные концентрации Fc в сухой биомассе микроводоросли (15,2±0,3 мг·г<sup>-1</sup>).

При изучении влияния разных уровней освещенности в трубчатых фотобиореакторах на синтез пигментов у *C. closterium* установлено, что максимальная концентрация фукоксантина равна  $1,06 \pm 0,06$  мг·см<sup>-3</sup> клеточного объема микроводоросли (Rijstenbil, 2003), что в пересчете на сухую биомассу соответствует 2,8 мг·г<sup>-1</sup>. Вероятно, низкое содержание Fc может быть связано с незначительной концентрацией азота в питательной среде. По данным других исследователей, при выращивании *C. closterium* на среде Конвея (100 мг нитрата натрия на 1 л среды) в трубчатых фотобиореакторах при освещении 6–12 клк максимальное содержание сухой биомассы фукоксантина составляло 5 мг·г<sup>-1</sup>, что также можно объяснить небольшой концентрацией нитратов в питательной среде (Pasquet et al., 2011).

Имеются данные о том, что низкие концентрации азота в среде могут приводить к резкому подавлению синтеза ферментов, участвующих в биосинтезе фукоксантина на уровне трансляции, а также к подавлению синтеза белков, входящих в состав светособирающих комплексов (ССК), фукоксантин-хлорофилл *a/c* белковых комплексов, что, соответственно, приводит к уменьшению концентрации Fc в клетках микроводорослей (Rijstenbil, 2003; Kim et al., 2012). При этом содержание Fc в клетках *C. closterium* может уменьшаться не только из-за подавления ферментативного синтеза, но и в результате перераспределения азота между клеточными компонентами, т. е. весь азот, находящийся в питательной среде, расходуется на процессы деления клеток, а не на процессы ферментативного синтеза. В частности, азот, освобождающийся при деградации пигмент-белковых комплексов, используется для биосинтеза и клеточного деления (Affan et al., 2009; Peng et al., 2011). Таким образом, получение высоких концентраций фукоксантина в культурах микроводорослей может достигаться при использовании питательной среды с повышенным содержанием азота.

### Выводы

Увеличение концентрации азота в питательной среде F/2 приводит к заметному повышению продуктивности диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* и накоплению фукоксантина в культуре. При концентрации в питательной среде 225–300 мг·л<sup>-1</sup> нитрата натрия количество фукоксантина в сухой биомассе *C. closterium* возрастает в 3 раза и достигает 15 мг·г<sup>-1</sup>. При этом максимальная концентрация клеток составляет более 2 млн кл·мл<sup>-1</sup>, а среднесуточная удельная скорость роста – 0,21 сут<sup>-1</sup>. Использование питательной среды с высокой концентрацией азота позволяет получать плотность культуры *C. closterium*, необходимую для продуцирования биологически активного вещества фукоксантина. Поэтому диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium* можно рассматривать как перспективный объект в биотехнологии.

Авторы выражают благодарность Dr. Takashi Maoka (Research Institute for Production Development, г. Киото, Япония) за помощь в идентификации фукоксантина, а также к.б.н. Р.Г. Геворгизу и к.б.н. Л.В. Ладыгиной (ИМБИ им. А.О. Ковалевского) за консультации по культивированию микроводорослей.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Affan A., Heo S.-J., Jeon Y.-J., Lee J.-B. Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium* // J. Phycol. – 2009. – 45. – P. 1405–1415.

- Gullard R.R., Ryther J.H. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Cran // *Can. J. Microbiol.* – 1963. – **8**. – P. 229–239.
- Hashimoto T., Ozaki Y., Taminato M., Dass S.K., Mizuno M., Yoshimura K., Maoka T., Kanazawa K. The distribution and accumulation of fucoxanthin and its metabolites after oral administration in mice // *Brit. J. Nutr.* – 2009. – **102**. – P. 242–248.
- Kim S.M., Jung Y.J., Kwon O.N., Cha K.H., Um B.H., Chung D., Pan C.H. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – **166**. – P. 1843–1855.
- Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K., Nagao A. Carotenoids effect proliferation of human prostate cancer cells // *J. Nutr.* – 2001. – **131**. – P. 3303–3306.
- Li W., Gao K., Beardall J. Interactive Effects of Ocean Acidification and Nitrogen-Limitation on the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* // *J. Pone.* – PloS ONE. – 2012. – **7**(12). – P. 1–8.
- Moreau D., Tomasoni C., Jacquot C., Kaas R., Le Guedes R., Cadoret J.P., Muller-Feuga A., Kontiza I., Vagias C., Roussis V., Roussakis C. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2006. – **22**. – P. 97–103.
- Pasquet V., Chérourvrièr J.-R., Farhat F., Thiérya V., Piot J.-M., Bérardb J.-B., Kaas R., Serive B., Patrice T., Cadoret J.-P., Picot L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction // *Mar. Biotechnol.* – 2011. – **46**. – P. 59–67.
- Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health // *Mar. Drugs.* – 2011. – **9**. – P. 1806–1828.
- Rijstenbil J.W. Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 2003. – **254**. – P. 37–48.
- Ryabushko V.I., Prazukin A.V., Popova E.V., Nekhoroshev M.V. Fucoxanthin of the brown alga *Cystoseira barbata* (Stackh.) C. Agardh from the Black Sea // *J. Black Sea / Mediter. Environ.* – 2014. – **20**(2). – P. – 108–113.

Поступила 18 декабря 2015 г.  
Подписала в печать Е.И. Шнюкова

## REFERENCES

- Affan A., Heo S.-J., Jeon Y.-J., and Lee J.-B., *J. Phycol.*, 2009, 45: 1405–1415.
- Gullard R.R. and Ryther J.H., *Can. J. Microbiol.*, 1963, 8: 229–239.
- Hashimoto T., Ozaki Y., Taminato M., Dass S. K., Mizuno M., Yoshimura K., Maoka T., and Kanazawa K., *Brit. J. Nutr.*, 2009, 102: 242–248.
- Kim S.M., Jung Y.J., Kwon O.N., Cha K.H., Um B.H., Chung D., and Pan C.H., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, 166: 1843–1855.
- Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H., Sugawara T., Miyashita K., and Nagao A., *J. Nutr.*, 2001, 131: 3303–3306.

- Li W., Gao K., and Beardall J., *J. Pone, PloS ONE*, 2012, 7(12): 1–8.
- Moreau D., Tomasoni C., Jacquot C., Kaas R., Le Guedes R., Cadoret J.P., Muller-Feuga A., Kontiza I., Vagias C., Roussis V., and Roussakis C., *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2006, 22: 97–103.
- Pasquet V., Chérouvrier J.-R., Farhat F., Thiérya V., Piot J.-M. Bérardb J.-B., Kaas R., Serive B., Patrice T., Cadoret J.-P., and Picot L., *Mar. Biotechnol.*, 2011, 46: 59–67.
- Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., and Wang J.-H., *Mar. Drugs.*, 2011, 9: 1806–1828.
- Rijstenbil J.W., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2003, 254: 37–48.
- Ryabushko V.I., Prazukin A.V., Popova E.V., and Nekhoroshev M.V., *J. Black Sea, Mediter. Environ.*, 2014, 20(2): 108–113.

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2017, 27(1): 15–21

[doi.org/10.15407/alg27.01.015](https://doi.org/10.15407/alg27.01.015)

*Ryabushko V.I., Zheleznova S.N., Nekhoroshev M.V.*

A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Researches  
2, Nakhimov Prosp., 299011 Sevastopol, Crimea

EFFECT OF NITROGEN ON THE ACCUMULATION OF FUCOXANTHIN FROM DIATOM *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN.

The effect of inorganic nitrogen content in the culture medium on accumulation of fucoxanthin (Fc) in the diatom *Cylindrotheca closterium* was studied. The Fc content in the biomass of the microalgae is determined in the transition to the stationary growth phase. Increase of the concentration of nitrogen in the medium F/2 promotes accumulation of fucoxanthin in the culture. With the concentration of sodium nitrate 225–300 mg · L<sup>-1</sup> in the medium, the concentration of fucoxanthin in dry biomass of *C. closterium* is found to reach 15 mg · g<sup>-1</sup>. The maximum cell concentration is above 2·10<sup>6</sup> cells · mL<sup>-1</sup> and the average specific growth rate is 0.21 day<sup>-1</sup>. Use of nutrient medium with high concentration of nitrogen allows obtaining the culture of *C. closterium* enriched with the biologically active substance fucoxanthin. Consequently, the diatom *Cylindrotheca closterium* can be regarded as a promising object in biotechnology.

**Key words:** *Cylindrotheca closterium*, cultivation, nitrogen, fucoxanthin.