

ЕКОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ВОДНИХ РОСЛИН

УДК 582.263: [58.035.2:[577.112+577.114+577.115]]

Н.І. КІРПЕНКО, д. б. н., ст. наук. співроб., пров. наук. співроб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210, Україна
e-mail: nativnativ@ukr.net

О.М. УСЕНКО, к. б. н., ст. наук. співроб., ст. наук. співроб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210, Україна

Т.О. МУСІЙ, пров. інж.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210, Україна

З.Н. ГОРБУНОВА, мол. наук. співроб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210, Україна

ВМІСТ БІЛКІВ, ВУГЛЕВОДІВ ТА ЛІПІДІВ У КЛІТИНАХ ЗЕЛЕНИХ ВОДОРОСТЕЙ ЗА РІЗНОГО РЕЖИМУ ОСВІТЛЕННЯ КУЛЬТУР

Показано видоспецифічні особливості формування вмісту білків, вуглеводів та ліпідів у клітинах низки представників *Chlorophyta*, які відрізняються за фоновим вмістом цих сполук, в умовах різного освітлення культур — постійного рівня 2,5 клк або 25 клк та короткочасного впливу підвищеного рівня освітленості. Для збільшення вмісту білків у клітинах *Acutodesmus dimorphus* сприятливою є помірна освітленість 2,5 клк, *Monogardidium contortum* — підвищена освітленість 25 клк, *Scenedesmus obtusus* — стабільний режим освітлення. Кількість вуглеводів у досліджених видів є найнижчою і менше коливається в умовах постійного освітлення культур з інтенсивністю 25 клк, тоді як короткочасний вплив світла такої інтенсивності викликає суттєві флуктуації вмісту вуглеводів та ліпідів.

Ключові слова: культури зелених водоростей, інтенсивність та режим освітлення, білки, вуглеводи та ліпіди.

Інтенсивність освітлення поряд зі спектральним складом світла і тривалістю фотоперіоду у добовому циклі не тільки впливають на ріст, але й визначають спрямованість біосинтетичних процесів водоростей [8, 15]. Встановлення оптимумів цих параметрів і реакції водоростей на їхні зміни належить до актуальних завдань фундаментальної та прикладної альгології.

Ц и т у в а н н я: Кірпенко Н.І., Усенко О.М., Мусій Т.О., Горбунова З.Н. Вміст білків, вуглеводів та ліпідів у клітинах зелених водоростей за різного режиму освітлення культур. *Гідробіол. журн.* 2020. № 3. С. 34—42.

Відомо, що оптимальний рівень інтенсивності освітлення для різних водоростей коливається у широких межах — від 3—5 до 24—30 клк [13]. В основному водорості віддають перевагу більш помірній освітленості в цьому діапазоні, яку й використовують зазвичай для їхнього культивування. Наприклад, для вирощування *Monoraphidium contortum* (Thur.) Kom.-Legn. як продуцента білків та жирних кислот, а також потенційних продуцентів біодизелю *Chlamydomonas* sp. і *Ankistrodesmus falcatus* застосовували освітленість 2 клк, для інших представників р. *Ankistrodesmus* оптимальними були 5—10 клк, *Dunaliella salina* Teod. вирощували при 5—6 клк [3, 6, 14]. Помічено, що в екстенсивних умовах культивування погіршення фізіологічного стану водоростей може спостерігатись при підвищенні освітленості з 2 до 10 клк [7]. Водночас, для зеленої мікроводорості *Haematococcus pluvialis* Flotow спостерігалось збільшення інтенсивності росту та продукції каротиноїдів при підвищенні освітленості з 2 до 6 клк [11]. Але навіть в інтенсивних умовах культивування існує межа інтенсивності освітлення: наприклад, для хлорели максимальна освітленість не повинна перевищувати 30 клк [2].

Формування біохімічного складу водоростей обумовлене як їхніми видоспецифічними особливостями [5], так і змінами рівня абіотичних чинників [8, 15]. У зв'язку з цим, метою роботи було дослідження впливу режиму освітлення на динаміку вмісту білків, вуглеводів та ліпідів у клітинах культур низки представників Chlorophyta.

Матеріал і методика дослідження

В експериментах використовували культури зелених водоростей з колекцій Інституту гідробіології НАН України та Інституту ботаніки НАН України, зокрема *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P. Tsarenko HPDP-108, *Monoraphidium contortum* (Thur.) Kom.-Legn. IBASU-A 364 та *Scenedesmus obtusus* Meyen HPDP-113. Культури водоростей вирощували в накопичувальному режимі на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горема в інтервалі температури 25 ± 3 °C і освітлювали лампами денного світла ДС-40, які створювали освітленість на поверхні колб 2,5 клк, або лампами MAXUS 425W, які забезпечували освітленість 25 клк. Освітленість (інтенсивність освітлення, або світловий потік, що падає на одиницю поверхні) вимірювали за допомогою люксметра Ю116.

Досліджували наступні режими освітлення: постійний рівень при вирощуванні культур водоростей 2,5 клк або 25 клк, а також короточасний вплив 25 клк, для чого культури, вирощені протягом 14, 21 чи 28 діб при 2,5 клк, на 1 добу переносили в умови інтенсивного освітлення 25 клк. При всіх режимах освітлення дотримувались чергування світлого й темного періодів 16 : 8 год.

Загальний вміст білків, вуглеводів та ліпідів у клітинах водоростей аналізували у трикратній повторності на 14-у, 21-у та 28-у добу, які розглядали як початок, середину й закінчення стадії інтенсивного росту культур. Біохімічні показники визначали у біомасі, відділеній від культурального середовища шляхом фільтрування через беззольні паперові фільтри-

ри. Наважки біомаси для визначення білків, вуглеводів і ліпідів після звільнення від середовища заморожували. При проведенні біохімічного аналізу біомасу гомогенізували у фарфоровій ступці з кварцовим піском. Загальний вміст білків визначали методом Лоурі [18], вуглеводів та ліпідів — гравіметричним методом після екстракції водним розчином етилового спирту (75 %) або сумішшю хлороформ : метанол 2 : 1 та висушування екстрактів [1, 10]. Показники розраховували у відсотках від сухої маси, яку визначали за допомогою методу висушування до постійної ваги [9].

Результати статистично опрацьовані з використанням стандартного пакету програм Microsoft Office 2013 та *t*-критерію Стьюдента для визначення достовірної різниці ($P \geq 0,95$).

Результати досліджень та їх обговорення

У попередніх дослідженнях було встановлено, що культури різних зелених водоростей суттєво відрізняються за кількістю та співвідношенням білків, вуглеводів і ліпідів в різних умовах вирощування [4, 16, 17]. Значні відмінності у накопиченні цих біологічно цінних сполук виявлено і щодо обраних видів (таблиця).

Зміна режиму освітлення культур супроводжувалась помітними флуктуаціями в динаміці формування кількості та співвідношення біохімічних компонентів. Як свідчать одержані результати, при постійному рівні освітлення різної інтенсивності зміни вмісту білків в клітинах *A. dimorphus* характеризувались близькими тенденціями, відрізняючись лише за величиною (рис. 1, а), причому показники на 21-у та 28-у добу були значно вищими при 2,5 клк, ніж при 25 клк (відповідно 29,24 та 20,02 % порівняно з 18,60 і 13,83 %). При цьому на 28-у добу кількість білків залишалась вищою при нижчій освітленості, що, на наш погляд, свідчить про більш тривалий період інтенсивного росту *A. dimorphus* в таких умовах, а в цілому характеризує нижчий світловий оптимум для цієї водорості.

Підтвердженням цьому може бути зменшення кількості білків у відповідь на стресове підвищення освітленості, яке було особливо помітним на початкових етапах періоду інтенсивного росту культури *A. dimorphus* (рис. 1, а III).

Що стосується динаміки зміни кількості вуглеводів у клітинах цієї культури, то найбільш значним відхиленням при 25 клк, порівняно з 2,5 клк, стало зниження їхнього вмісту на 21-у добу (рис. 1, б), тоді як при інших режимах освітлення в цей період вміст вуглеводів суттєво зростав.

Таблиця

Кількість білків, вуглеводів та ліпідів (% а. с. м.) у клітинах зелених водоростей

| Культури | Білки | Вуглеводи | Ліпіди |
|--------------------------------|------------|------------|------------|
| <i>Acutodesmus dimorphus</i> | 37,45±4,28 | 19,46±1,23 | 16,51±2,09 |
| <i>Monoraphidium contortum</i> | 15,15±2,30 | 23,79±2,35 | 31,28±2,45 |
| <i>Scenedesmus obtusus</i> | 18,40±1,40 | 18,23±0,93 | 12,56±0,92 |

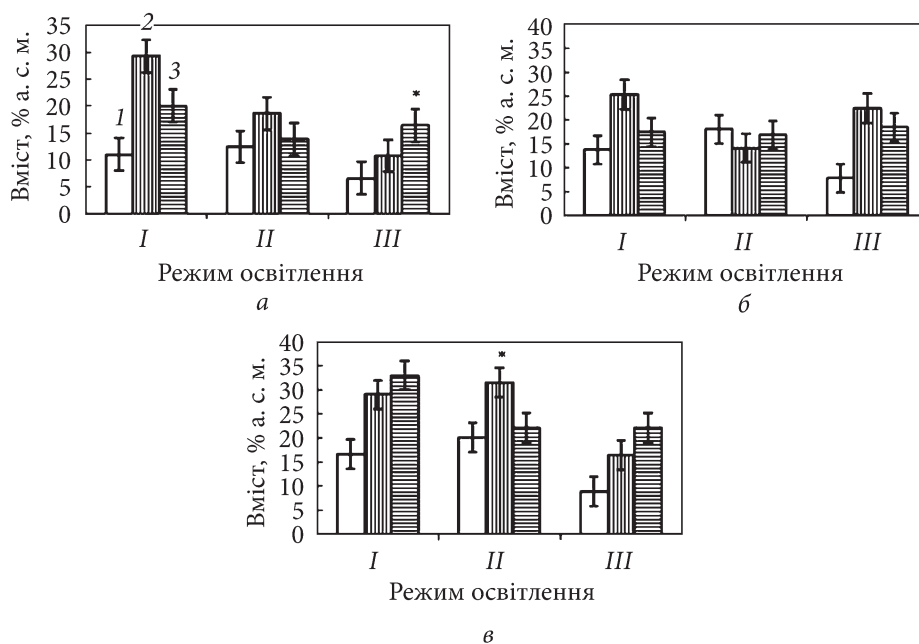


Рис. 1. Динаміка вмісту білків (а), вуглеводів (б) та ліпідів (в) у клітинах *Acutodesmus dimorphus* різної тривалості вирощування (1 — 14 діб; 2 — 21 доба; 3 — 28 діб) при різних режимах освітлення культури: I — постійне освітлення 2,5 клк; II — постійне освітлення 25 клк; III — одна доба освітлення 25 клк. * Рівень достовірності $P < 0,95$.

Реакція культури на різке збільшення освітленості була найбільш вираженою у віці 14 діб, коли кількість вуглеводів зменшилась порівняно з фоновими значеннями більше, ніж удвічі — з 18,04 до 7,80 %. В інші періоди коливання були менш суттєвими порівняно з фоновими показниками.

Кількість ліпідів у *A. dimorphus* при помірній освітленості 2,5 клк зростала впродовж всього терміну спостережень, тоді як при 25 клк на 28-у добу культивування вміст цих сполук суттєво знизився, що може бути наслідком посилення їхнього витрачання на підтримання гомеостазу клітин у несприятливих для них умовах (рис. 1, в). Зниженням вмісту ліпідів відповідала культура і на стресове підвищення освітленості на всіх етапах розвитку, що також, на нашу думку, свідчить про несприятливий вплив на неї світла високої інтенсивності.

Вміст білків у клітинах *Monoraphidium contortum* зменшувався в міру затухання ростових процесів і переходу культури на стаціонарну стадію (рис. 2, а). Проте при більшому освітленні (25 клк) кількість білків у клітинах була вищою протягом всього експерименту, що може бути ознакою більш високого оптимуму інтенсивності освітлення для цього виду. Цікаво відзначити, що у відповідь на різке збільшення рівня освітленості культура порівняно менше змінювала кількість білків і підтримувала вміст цих сполук на одному рівні впродовж тривалого часу.

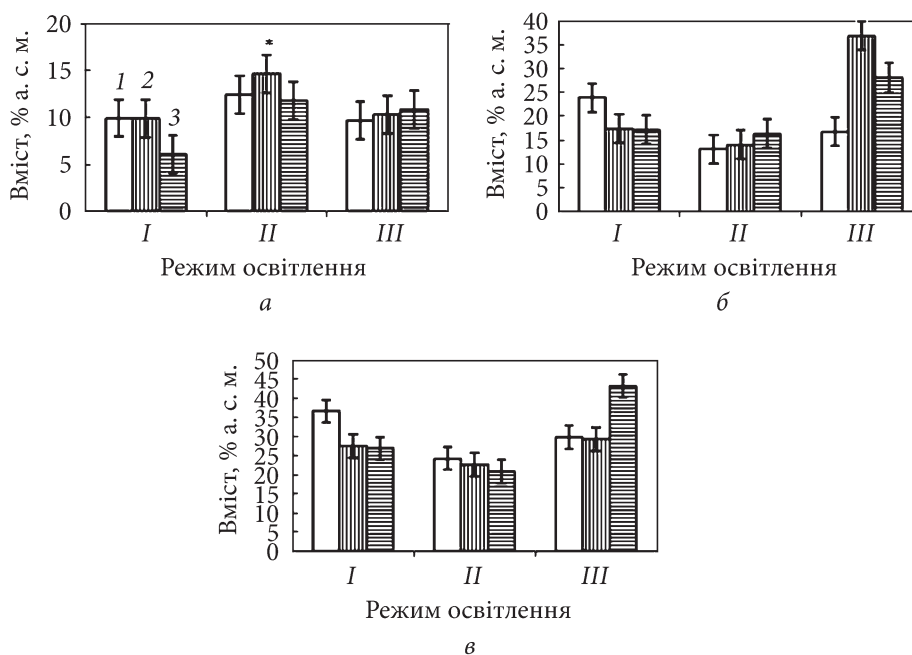


Рис. 2. Динаміка вмісту білків (а), вуглеводів (б) та ліпідів (в) у клітинах *Monoraphidium contortum* різної тривалості вирощування (1 — 14 діб; 2 — 21 доба; 3 — 28 діб) при різних режимах освітлення культури: I — постійне освітлення 2,5 клк; II — постійне освітлення 25 клк; III — одна доба освітлення 25 клк. * Рівень достовірності $P < 0,95$

Кількість вуглеводів була дещо нижчою впродовж вирощування *M. contortum* при 25 клк, проте суттєво зростала у відповідь на різке збільшення інтенсивності освітлення культури у віці 21 та 28 діб (рис. 2, б). Подібна динаміка змін характерна і для накопичення ліпідів при різному режимі освітлення, але зростання кількості цих сполук під впливом короткочасних коливань освітленості було значнішим у клітинах старшої культури (рис. 2, в).

В цілому суттєвіші відхилення досліджуваних показників *M. contortum* у відповідь на стресовий вплив інтенсивного світла спостерігались на більш пізніх стадіях росту порівняно з *A. dimorphus*.

Динаміка вмісту білків у клітинах *Sc. obtusus* відрізнялась від такої у інших досліджуваних видів (рис. 3, а). При постійному освітленні як 2,5, так і 25 клк спостерігалось зростання вмісту білкових сполук упродовж всього терміну спостережень, що може бути обумовлене довшим періодом інтенсивного росту цієї культури порівняно з іншими видами. Як показав аналіз динаміки концентрації клітин, у *A. dimorphus* затухання інтенсивності ростових процесів спостерігалось на 25—28-у добу, у *M. contortum* — на 22—25-у добу, а у *Sc. obtusus* — після 35-ої доби.

Характер зміни вмісту білків у клітинах *Sc. obtusus* був близьким за обох постійних рівнів освітленості — 2,5 та 25 клк, з незначними відхиленнями величин і зменшенням амплітуди відхилень у міру збільшення

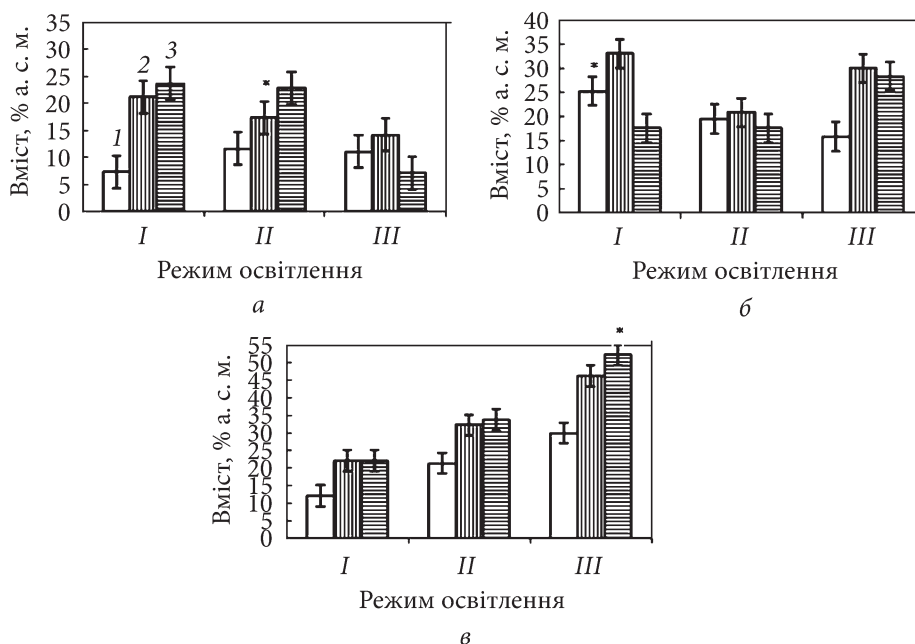


Рис. 3. Динаміка вмісту білків (а), вуглеводів (б) та ліпідів (в) у клітинах *Scenedesmus obtusus* різної тривалості вирощування (1 — 14 діб; 2 — 21 доба; 3 — 28 діб) при різних режимах освітлення культури: I — постійне освітлення 2,5 клк; II — постійне освітлення 25 клк; III — одна доба освітлення 25 клк. * Рівень достовірності $P < 0,95$.

віку культури. Водночас різке посилення освітленості викликало значне зменшення кількості білків у клітинах, особливо помітне на більш пізніх стадіях вирощування, що може свідчити про прискорення виходу культури на стаціонарну стадію росту і порівняно низьку стійкість виду до коливань світлового чинника.

Цікаво відмітити, що в умовах вирощування *Sc. obtusus* при інтенсивності освітлення 25 клк у його клітинах, як і у інших досліджених видів, нівелювались вікові коливання накопичення вуглеводів, характерні для умов помірного освітлення (рис. 3, б). Водночас при перенесенні культур з 2,5 клк на 25 клк спостерігались дзеркальні зміни кількості вуглеводів у культурах різного віку — найменше цих сполук було у 14-добовій культурі і значно більше — у 21-добовій, з тенденцією до зниження при подальшому збільшенні тривалості культивування.

Особливо цікавими є зміни кількості ліпідів у клітинах *Sc. obtusus* при різних режимах освітлення — накопичення цих сполук характеризувалось однаковою динамікою впродовж вирощування, але суттєво посилювалось із збільшенням інтенсивності світла, причому як при постійному рівні 25 клк, так і, особливо, при стресовому підвищенні інтенсивності освітлення (рис. 3, в). Як відомо, для індукції синтезу ліпідів у водоростей частіше застосовують зменшення кількості доступного світла (вирощування у темряві, зменшення тривалості періодів освітлення, зниження

інтенсивності освітлення) [12], тому виявлені особливості засвідчують видоспецифічність реакції різних водоростей на вплив зовнішніх чинників, що зумовлює необхідність детального дослідження особливостей росту і метаболізму різних видів у конкретних умовах.

Таким чином, в реакції культур досліджених видів водоростей на зміни режиму освітлення є як подібні риси, так і суттєві відмінності. Зокрема, при 25 клк кількість вуглеводів у клітинах всіх культур зберігалась на одному, порівняно невисокому рівні. Зменшенням кількості цих сполук порівняно з фоновими значеннями реагували також всі культури у віці 14 діб на стресове різке підвищення освітленості.

Водночас спостерігалась також значна видоспецифічність реакції водоростей на зміну рівня освітленості, як це відмічено і щодо інших зовнішніх впливів [3, 16, 17]. Підвищення інтенсивності освітлення було сприятливим для збільшення вмісту білків у *M. contortum*, проте менш сприятливим воно виявилось для формування вмісту цих сполук у *A. dimorphus* та *S. obtusus*. Кількість вуглеводів у клітинах досліджених водоростей, на фоні зниження при вирощуванні культур за інтенсивності 25 клк, зазнавала суттєвих коливань при стресовому впливі цього чинника. Щодо особливостей вмісту ліпідних сполук, то зміни режиму освітлення викликали доволі різнотипні реакції у різних видів водоростей. Якщо у *M. contortum* відбувалось зменшення кількості ліпідів при вирощуванні за 25 клк, а у *A. dimorphus* — при його короткочасному впливі, то в клітинах *Sc. obtusus* посилення інтенсивності освітлення, як у постійному, так і в короткочасному режимі, викликало помітне збільшення кількості ліпідів, причому ця тенденція спостерігалась на різних стадіях росту культури.

Виявлені особливості можуть мати практичне значення для визначення стратегії вирощування водоростей з метою збагачення їх тими чи іншими біохімічними компонентами. Для *A. dimorphus* з точки зору накопичення біологічно цінних сполук більш сприятливим є режим постійного підтримання помірного освітлення, причому біомаса найбільш збагачена білками на стадії інтенсивного росту (21 доба).

У *M. contortum* підвищення інтенсивності освітлення в постійному режимі сприяє збільшенню вмісту білків (на всіх стадіях росту), а в короткочасному — вуглеводів (на 21—28-у доби) та ліпідів (28 діб). У клітинах *Sc. obtusus* збільшення інтенсивності освітлення, як при постійному, так і при короткочасному режимі, викликає перерозподіл співвідношення досліджених біохімічних компонентів у бік накопичення ліпідів на всіх стадіях росту культури.

Висновки

Зелені мікроводорості характеризуються видоспецифічними особливостями формування в клітинах вмісту та співвідношення білків, вуглеводів і ліпідів залежно від режиму освітлення.

Найвищий вміст білків у *A. dimorphus* спостерігався за підтримання постійного помірного рівня освітленості 2,5 клк, у *M. contortum* — за

підвищеного рівня 25 клк, у *Sc. obtusus* за обох рівнів коливання цього показника характеризувались близькими тенденціями. Різке короткочасне збільшення освітленості з 2,5 клк до 25 клк супроводжується значним зниженням вмісту білків у *A. dimorphus* та *Sc. obtusus*, на відміну від *M. contortum*, для якого негативного впливу не зафіксовано.

Вміст вуглеводів у всіх досліджених видів був найнижчим і відзначався найменшими коливаннями в умовах постійного освітлення 25 клк. Короткочасний вплив підвищеної освітленості викликав суттєве коливання вмісту вуглеводів, особливо в клітинах культури *M. contortum*.

Вміст ліпідів найбільш помітно змінювався під впливом короткочасного збільшення інтенсивності освітлення — зменшувався в клітинах *A. dimorphus* і зростав у *Sc. obtusus* та *M. contortum*.

Виявлені особливості мають практичне значення для визначення стратегії вирощування водоростей в штучних умовах з метою збагачення їхньої біомаси білками, вуглеводами та ліпідами.

Список використаної літератури

1. Горда 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. Дворецкий Д.С., Дворецкий С.И., Темнов М.С. и др. Технология получения липидов из микроводорослей. Тамбов: Изд-во ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015. 99 с.
3. Исмаилходжаев Б.Ш. Влияние экологических факторов на рост, продуктивность и биохимические особенности некоторых видов *Chlorella* Beyer., *Scenedesmus* Meyen, *Ankistrodesmus* Corda, *Chlamydomonas* Ehr. в культуре: дис. ...канд. биол. наук. Ташкент, 1984. 161 с.
4. Кирпенко Н.И., Усенко О.М., Мусий Т.О. Биохимический состав зеленых водорослей на разных стадиях роста. *Гидробиол. журн.* 2015. Т. 51, № 2. С. 44—50.
5. Кирпенко Н.И., Усенко О.М., Мусий Т.О. Сравнительный анализ содержания белков, углеводов и липидов в клетках зеленых микроводорослей. *Там же*. 2017. Т. 53, № 6. С. 87—98.
6. Комаристая В.П., Антоненко С.П., Рудась А.Н. Культивирование *Dunaliella salina* Teod. при субоптимальных концентрациях азота и фосфора и исключении их из среды. *Альгология*. 2010. Т. 20, № 1. С. 42—55.
7. Курейшевич А.В., Козицкая В.Н. Влияние светового и температурного режимов на содержание хлорофилла *a* в биомассе микроводорослей. *Там же*. 1992. Т. 2, № 3. С. 37—43.
8. Мельников С.С., Самович Т.В., Мананкіна О.Е., Будакова О.А. Вплив чергування світлових і темнових періодів на продуктивність *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler (Cyanophyta). *Там же*. 2012. Т. 22, № 2. С. 121—130.
9. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. думка, 1975. 247 с.
10. Практикум по общей биохимии. Ю. Б. Филиппович, Т.А. Егорова, Г.А. Севастьянова. М.: Просвещение, 1975. 318 с.
11. Терентьева Н.В., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Минюк Г.С. Влияние освещенности на физиолого-биохимические характеристики зеленой микроводоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Экология моря*. 2008, Вып. 75. С. 82—88.
12. Чернова Н.И., Киселева С.В., Калинина О.Ю. Биодизель из микроводорослей: методы индукции липидов и скрининг перспективных штаммов. *Альтернативная энергетика и экология*. 2015. № 21 (185). С. 44—54.
13. Шубернецкий И.В., Борщ З.Т. Культивирование хлореллы в различных температурных и световых условиях. Биологические основы культивирования водных организмов. Кишинев: Штиинца, 1983. С. 26—35.

14. Ajayan K.V., Manaswini P.S., Harilal C.C. Effect of nitrate and phosphate levels on biochemical contents and fatty acid methyl esters profile of (*Thuret*). *Eco Chronicle*. 2018. Vol. 13, N 2. P. 51—59.
15. Borgen K. Evaluation of physicochemical properties of modified algae protein adhesives. Kansas state university. Manhattan, Kansas, 2012. 46 p.
16. Kirpenko N.I., Usenko O.M., Musiy T.O. Content of proteins, carbohydrates and lipids in biomass of green algae under different temperature of cultivation. *Hydrobiol. J.* 2016. Vol. 52, N 1. P. 99—105.
17. Kirpenko N.I., Usenko O.M., Musiy T.O. Content of proteins, carbohydrates, and lipids in the cells of green algae at short-term temperature fluctuations. *Ibid.* 2017. Vol. 53, N 1. P. 50—59.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr G.A., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, N 1—2. P. 265—268.

Надійшла 19.03.2020

N.I. Kirpenko, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12 Geroyiv Stalingrada Ave, Kyiv, 04210, Ukraine

O.M. Usenko, PhD (Biol.), Senior Researcher
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12 Geroyiv Stalingrada Ave, Kyiv, 04210, Ukraine

T.O. Musiy, Lead Engeneer
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12 Geroyiv Stalingrada Ave, Kyiv, 04210, Ukraine

Z.N. Gorbunova, Junior Researcher
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12 Geroyiv Stalingrada Ave, Kyiv, 04210, Ukraine

CONTENT OF PROTEINS, CARBOHYDRATES AND LIPIDS IN GREEN ALGAE CELLS UNDER DIFFERENT LIGHTING MODES OF CROPS

It has been shown that the formation of the content of proteins, carbohydrates, and lipids in the cells of some representatives of Chlorophyta (differing in the initial content of these substances) cultivated under various conditions of illumination is species – specific. Algal cultures were cultivated under conditions of constant (2,5 and 25 kLx) and short-term illumination. The content of proteins in the cells of *Acutodesmus dimorphus* changed at moderate illumination of 2,5 kLx, in *Monoraphidium contortum* – at a rather high intensity of illumination of 25 kLx, whereas in *Scenedesmus obtusus* under the constant regime of illumination. The lowest and most stable content of carbohydrates was observed under conditions of constant illumination of 25 kLx. At the same time, a short-term influence of light of such intensity resulted in significant fluctuations in the content of carbohydrates and lipids.

Keywords: green algae cultures, light intensity and modes, proteins, carbohydrates and lipids.