

## ВЗАИМОСВЯЗЬ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФУКОКСАНТИНА И ОБЩИХ ЛИПИДОВ В БИОМАССЕ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN

**Железнова С.Н.<sup>1</sup>, Геворгиз Р.Г.<sup>1</sup>, Малахов А.С.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского,  
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет  
пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

**Аннотация.** Диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin способна синтезировать целый ряд биологически активных веществ: каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), витамины и т.д. Среди всех каротиноидов наибольший интерес представляет фукоксантин (Фк), который по нашим данным в клетках *C. closterium* накапливается до 2,3% от сухой массы. Таким образом диатомовую водоросль *C. closterium* целесообразно выращивать в промышленных масштабах с целью получения фукоксантина и липидов. Для подбора оптимальных условий синтеза липидов в промышленных условиях культивирования возникла необходимость в разработке экспресс-метода определения липидов в биомассе диатомовых. Цель: экспериментально определить взаимосвязь между концентрациями фукоксантина и общих липидов в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin при различных условиях культивирования. Нами была обнаружена линейная зависимость накопления фукоксантина и общих липидов в клетках диатомовой водоросли *C. closterium* при различных условиях проточного и накопительного культивирования. На основе данной зависимости можно разработать экспресс-метод определения липидов в интенсивной культуре.

**Ключевые слова:** диатомовые водоросли, фукоксантин, липиды.

Диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin способна синтезировать целый ряд биологически активных веществ: каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), витамины и т. д. [1-3]. Среди всех каротиноидов наибольший интерес представляет фукоксантин (Фк) [4-6], который по нашим данным в клетках *C. closterium* накапливается до 2,3 % от сухой массы. Особый интерес представляют эйкозапентаеновая кислота и арахидоновая кислоты [3], концентрация которых в сухой биомассе по нашим данным достигает 4,3 и 1,5 % (табл. 1).

**Таблица 1.** Состав жирных кислот диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (в % от суммарных липидов)

Наименование жирных кислот	Доля от суммарных липидов, %	Доля в биомассе, %
Миристиновая кислота 14:0	2,87±0.90	0,52
Пальмитиновая кислота 16:0	13,72±0.10	2,47
Пальмитоолеиновая 16:1 (n-7)	17,95±0.80	3,23
Стеариновая 18:0	1,08±0.80	0,2
Олеиновая 18:1 (n-9)	17,16±10	3,1
Линолевая 18:2 (n-6)	2,20±0.10	0,4
Арахидоновая 20:4 (n-6)	8,36±0.10	1,5
Эйкозапентаеновая 20:5 (n-3)	23,91±0.50	4,3
Докозагексаеновая 22:6 (n-3)	1,26±0.10	0,2268

По литературным данным концентрация общих липидов у *C. closterium* достигает 25-27 % от сухой массы [2, 3]. В наших экспериментах общие липиды не превышали 21 %. Поскольку практически все биологически активные вещества *C. closterium* жирорастворимы можно предположить, что будет наблюдаться взаимосвязь между долей общих липидов и биологически активных веществ.

**Цель:** экспериментально определить взаимосвязь между концентрациями фукоксантина и общих липидов в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin при различных условиях накопительного и проточного культивирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. Культуру адаптировали к концентрированным минеральным питательным средам. После адаптации культуру использовали в качестве инокулята для накопительного и проточного культивирования.

В интенсивной культуре как в накопительной, так и в проточной плотность культуры определяли методом йодатной окисляемости [7] и прямым взвешиванием сырой массы *C. closterium* после осаждения клеток центрифугированием при 1600g в полипропиленовых центрифужных пробирках.

Содержание общих липидов определяли сульфифосфованилиновым методом [8]. Липиды экстрагировали дважды из сырой биомассы (навеска 0,04 г) смесью Фолча. Затем несколько раз промывали дистиллированной водой и переносили в сухие пробирки. Аликвоту 0,1-0,2 мл упаривали и добавляли по 0,5 мл серной кислоты. Удерживали на кипящей бане в течении 10-15 мин. После кипячения к пробам добавляли 2,5 мл фосфованилинового реактива и оставляли в темном месте на 40 мин для развития окраски. Затем определяли оптическую плотность на длине волны 530 нм. Содержание липидов в аликвотах рассчитывают по калибровочному графику. Все расчеты содержания липидов вели на общий объем экстрагированных из биомассы липидов.

Фукоксантин в биомассе *C. closterium* определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием ранее охарактеризованного стандарта методами UV-VIS, HPLC, масс- и ЯМР спектроскопии. Предварительно отбирали 10 мл культуры из экспериментального фитобиореактора, центрифугировали при 3000 об/мин (1600g), надосадочную жидкость удаляли. Из полученной массы водорослей фукоксантин экстрагировали спиртом. Экстракцию проводили два-три раза до полного обесцвечивания биомассы. Спиртовые экстракты объединяли. Для количественного определения Фк в суммарном спиртовом экстракте отбирали аликвоту 0,1 мл с помощью дозатора из суммарного спиртового экстракта и наносили её на хроматографические стеклянные пластинки, с закрепленным слоем силикагеля толщиной 0,5 мм. Процесс разделения каротиноидов методом ТСХ проводили в системе ацетон–гексан в соотношении 3:7. Фракцию силикагеля, содержащую Фк, несколько раз элюировали (экстрагировали) спиртом до полного обесцвечивания силикагеля с последующим центрифугированием. Концентрацию Фк в аликвоте ( $F_{c_{ал}}$ ) определяли на спектрофотометре СФ-2000 на длине волны 442 нм по формуле:

$$F_{c_{ал}} = \frac{10 \cdot D_{442} \cdot V_{эл}}{E}, \text{ мг/мл}$$

где  $V_{эл}$  – объем объединенного элюента с пластины, мл;  $D_{442}$  – оптическая плотность на длине волны 442 нм;  $E_{\%_1 \text{ см}} = 1280 \text{ м}^{-1}$  – коэффициент экстинкции фукоксантина в 96 % этаноле [9].

Концентрацию Фк в суммарном спиртовом экстракте (Fc) пересчитывали на сухую массу микроводоросли (Fc) по следующим формуле:

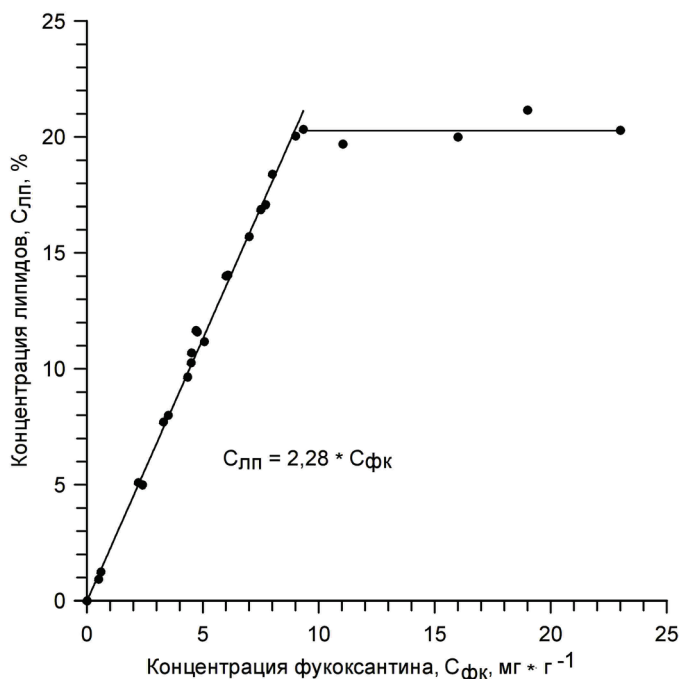
$$F_c = (F_{c_{ал}} \cdot V_{ал} \cdot V_{выт.}) / B, \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1},$$

где Fc – концентрация фукоксантина в навеске;  $F_{c_{ал}}$  – концентрация фукоксантина в аликвоте, которую нанесли на хроматографическую пластинку;  $V_{ал}$  – объем аликвоты, нанесенной на пластину, мл;  $V_{выт.}$  – объем общей спиртовой вытяжки, полученной в результате многократной экстракции навески сырой биомассы *C. closterium*, мл; B – масса навески водоросли, г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На рисунке 1 представлена обнаруженная нами зависимость накопления фукоксантина и общих липидов в клетках диатомовой водоросли *C. closterium* при различных условиях проточного и накопительного культивирования. В диапазоне от 0 до 10 мг·г<sup>-1</sup> содержания Фк наблюдается линейная зависимость с углом наклона равным 2,28. Затем идет насыщение – концентрация Фк увеличивается, а содержание липидов остается неизменным. Возможно, прямолинейную зависимость между концентрациями Фк и общих липидов до определенного значения Фк в культуре можно объяснить тем, что и Фк, и липиды являются структурными компонентами пластид [10] и синтез липидов в основном идет по прокариотическому пути метаболизма, а не по эукариотическому пути (все жирные кислоты накапливаются в пластидах) [11]. В условиях лимитирования роста биогенными элементами фотосинтетические мембраны, включающие липиды и Фк активно синтезируются для защиты фотосинтетического аппарата от повреждающего действия света, причем доля липидов и Фк остается неизменной. При накоплении липидов до 21 % синтез липидов приостанавливается, а накопление Фк продолжается до 23 мг·г<sup>-1</sup>. Принято считать, что Фк локализован в фотосинтетической мембране и выполняет защитную функцию. Согласованный синтез фотосинтетических липидсодержащих структур при малом содержании Фк (до 10 мг·г<sup>-1</sup>) в клетках, по-видимому, это подтверждает. Не ясным остается вопрос о локализации Фк в клетках, когда его концентрация достигает 23 мг·г<sup>-1</sup>.

Отметим, возможно, прямолинейная зависимость между концентрациями Фк и общих липидов характерна для всех диатомей, но для каждого вида диатомовых водорослей коэффициент перехода будет индивидуальным.



**Рисунок 1.** Зависимость концентраций Фк и общих липидов в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin

Полученная линейная зависимость имеет большое практическое значение, поскольку позволяет исключить трудоёмкое определение общих липидов при исследовании культур диатомей. Зная концентрацию Фк у *C. closterium*, можно определить концентрацию липидов по уравнению:

$$C_{\text{лп}} = K * C_{\text{Фк}},$$

где  $C_{\text{лп}}$  – концентрация липидов, %;  $C_{\text{Фк}}$  – концентрация фукоксантина,  $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ ;  $K = 2,28$  – коэффициент перехода от концентрации Фк к концентрации общих липидов для диатомовой водоросли *C. closterium*.

Также отметим, что обнаруженную нами линейную зависимость можно использовать для разработки экспресс-метода определения общих липидов по оптической плотности культуры *C. closterium* или ее экстрактов, т.к. по нашим данным концентрация Фк и оптическая плотность также связаны функциональной зависимостью.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружена линейная зависимость накопления фукоксантина (до  $10 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ ) и общих липидов в культуре *C. closterium* при различных условиях проточного и накопительного культивирования. На основе данной зависимости можно разработать экспресс-метод определения липидов в интенсивной культуре.

*Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ИМБИ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ госрегистрации АААА-А18-118021350003-6) и при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-34-00672.*

### Список литературы / References:

1. D'Orazio N., Gemello E., Gammone M.A., de Girolam M., Ficoneri C., Riccioni G. Fucoxanthin: A Treasure from the Sea. *Marine Drugs*, 2012, vol. 10, pp. 604-616.
2. Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroil J.-M., Jeffrey S.W. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, 1994, vol. 35, pp. 155-161.
3. Suman K., Kiran T., Devi U.K., Sarma N.S. Culture medium optimization and lipid profiling of *Cylindrotheca*, a lipid- and polyunsaturated fatty acid-rich pennate diatom and potential source of eicosapentaenoic acid. *Botanica Marina*, 2012, vol. 55, pp. 289-299.
4. Affan A., Heo S.-J., Jeon Y.-J., Lee J.-B. Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium*. *Journal of Phycology*, 2009, vol. 45, pp. 1405-1415.
5. Kumar S.R., Hosokawa M., Miyashita K. Fucoxanthin: a marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Marine Drugs*, 2013, vol. 11, pp. 5130-5147.

6. Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Murakami-Funayama K., Miyashita K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular Medicine Reports*, 2009, vol. 2, iss. 6, pp. 897-902.

7. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Никонова Л.Л., Бобко Н.И., Нехорошев М.В. Оценка плотности культуры фототрофных микроорганизмов методом йодатной окисляемости. Севастополь, 2015, 31 с. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Nikonova L.L., Bobko N.I., Nekhoroshev M.V. Estimation of the density of culture of phototrophic microorganisms by the iodate oxidation method. Sevastopol, 2015, 31 p. (In Russ.)]

8. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры. Ред. А.И. Агатова. Москва: изд-во ВНИРО, 2004, 123 с. [A guide on modern biochemical methods for studying aquatic ecosystems that are promising for fishing and mariculture. Ed. A.I. Agatova. Moscow: publishing house VNIRO, 2004, 123 p. (In Russ.)]

9. 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. *British Journal of Nutrition.*, 2009, vol. 102, pp. 242-248.

10. Тренкеншу Р.П. Динамическая модель биотрансформации резервных и структурных форм биомассы микроводорослей в темноте. *Вопросы современной альгологии*, 2016, № 2 (12), URL: <http://algology.ru/967>. [Trenkenshu R.P. Dynamic model of biotransformation of reserve and structural forms of microalgae biomass in the dark. *Voprosy sovremennoy al'gologii*, 2016, no. 2 (12), URL: <http://algology.ru/967>. (In Russ.)]

11. Pratiwi A.R., Syah D., Hardjito L., Panggabean L.M.G., Suhartono M.T. Fatty Acid Synthesis by Indonesian Marine Diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Hayati Journal of Biosciences*, 2009, vol. 16, iss. 4, pp. 151-156.

#### RELATIONSHIP OF FUKOXANTHINE CONCENTRATIONS AND COMMON LIPIDS IN BIOMASS OF DIATOMIC ALGAE *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN

Zheleznova S.N.<sup>1</sup>, Gevorgiz R.G.<sup>1</sup>, Malakhov A.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Marine Biological Research A.O. Kovalevsky

*Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia*

<sup>2</sup> National Research Tomsk Polytechnic University

*Lenin av., 30, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru*

**Abstract.** Diatoms *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin is able to synthesize biologically active substances: carotenoids, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), vitamins, and others. Among all carotenoids, fucoxanthin (Fc) is the most important, which according to our data in *C. closterium* cells accumulates up to 2.3% of the dry mass. Thus *C. closterium* is advisable to grow on an industrial scale in order to obtain fucoxanthin and lipids (PUFA). For the selection of optimal conditions for the synthesis of lipids under industrial cultivation conditions, there was a need to develop an express method for determining lipids in biomass diatoms. Objective: to experimentally determine the relationship between the concentrations of fucoxanthin and total lipids in the biomass of diatom alga *C. closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin under various cultivation conditions. We found a linear relationship between the accumulation of fucoxanthin and total lipids in cells of the diatom *C. closterium* under the various conditions culture. Based on this relationship, it is possible to develop an express method for the determination of lipids.

**Key words:** diatoms, fucoxanthin, lipids.