

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАРОТИНОИДОВ ИЗ ЦИАНОБАКТЕРИИ *ARTHROSPIRA PLATENSIS* В УСЛОВИЯХ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА НА ОБЕЗВОЖИВАНИЕ

Телегина Т.А.¹, Геворгиз Р.Г.², Нехорошев М.В.², Бирюков М.В.³, Вечтомова Ю.Л.¹, Крицкий М.С.¹

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Ленинский просп., 33, корп. 2, г. Москва, 119071, РФ

² ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН»
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119991, РФ
Поступила в редакцию: 15.07.2018.

Аннотация. Исследован хромогенный (каротиноидный) комплекс *A.platensis* и влияние на его формирование дегидратационного стресса. Исследованы различные условия обезвоживания при разных температурах и влияние облучения УФ-А (365 нм) и видимым светом (450 нм) на образование биологически ценных каротиноидов. Разработана методика экстракции и очистки ксантофиллов: миксоксантофилл (63 %) и осциллаксантин (27 %) из биомассы *A.platensis* с применением экстракции жидкостью: жидкость по методу Фолча. Показано, что облучение в области ближнего ультрафиолета (365 нм) при температуре 38 °С приводит к увеличению синтеза ксантофиллов, а низкая температура такого влияния не оказывает.

Ключевые слова: спирулина, *Arthrospira platensis*, каротиноиды, ксантофиллы, обезвоживание, дегидратационный стресс.

Цианобактерии, в частности спирулина, являются перспективными биотехнологическими объектами, синтезирующими большое количество биологически активных соединений, в том числе фикобилипротеинов и каротиноидов [1-3]. Каротиноиды, которых в настоящее время насчитывается порядка 600, являются производными изопрена и разделяются на две подгруппы: каротины – углеводородные производные изопрена (α -каротин, β -каротин, ликопин, нейроспорин и др.) и ксантофиллы – кислородсодержащие производные каротинов (лютеин, зеаксантин, астаксантин и др.). Присутствие в составе молекулы кислородных атомов в виде кетогрупп или ОН-групп делает ксантофиллы менее гидрофобными, чем каротины – углеводородные производные изопрена, и это позволяет разрабатывать методы выделения и очистки каротинов и ксантофиллов, основываясь на этом различии.

Каротиноиды являются антиоксидантами и способны тормозить развитие свободнорадикального окисления, протекающего как с участием активных форм кислорода (АФК), так и без АФК. Свободнорадикальные процессы окисления нарушают нормальное функционирование организма человека и ведут к развитию многих патологий. Антиоксидантные свойства каротиноидов обуславливают их фото- и радиопротекторное действие, антимуtagenную, антиканцерогенную и антиинфекционную активности, которые в совокупности положительно влияют на иммунитет, а также эффективно используются для профилактики и лечения А-авитаминозов. Ксантофилл астаксантин, синтезируемый микроводорослью *Haematococcus pluvialis*, оказался более эффективным антиоксидантом по сравнению с такими тушителями свободных радикалов, как, например, α -токоферол, β -каротин, ликопин, лютеин [4-9].

Каротиноиды синтезируются бактериями, водорослями, высшими растениями, грибами, но не синтезируются de-novo млекопитающими. Удовлетворение потребности человека в каротиноидах происходит при поступлении их с пищей, в виде биологически активных добавок (БАД) или лекарств. Таким образом производство, эффективное выделение и очистка высокоактивных каротиноидов из природных объектов является актуальной биотехнологической задачей. В первую очередь внимание приковано к выделению ксантофиллов, как наиболее активных антиоксидантов.

Объектом нашего исследования является цианобактерия *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont, имеющая коммерческое наименование спирулина. Практический интерес к спирулине определяется её биохимическим составом: большим содержанием белка (более 60 % от сухого веса), присутствием ряда ценных полиненасыщенных жирных кислот, комплекса витаминов группы В и витаминов С, Д, А, Е, набором макро- и микроэлементов в биодоступной форме, а также набором пигментов, обладающих терапевтическим эффектом. Наряду с хлорофиллом важнейшими пигментами спирулины являются фикобилины и каротиноиды [2-5, 8]. В спирулине присутствуют как каротины, так и ксантофиллы. Состав каротиноидов спирулины, выраженный в % от суммы каротиноидов, выглядит следующим образом: $\beta\beta$ -каротин – 35 %; $\beta\beta$ -каротин-5,8-эпоксид – 2 %; эхиненон – 2 %; криптоксантин – 2 %; 3-гидроксиэхиненон – 1 %; зеаксантин – 31 %; миксоксантофилл – 24 %; осциллаксантин – 3 % [10]. Важно отметить, что миксоксантофилл и осциллаксантин, являющиеся очень эффективными антиоксидантами, находятся в спирулине в виде α -гликозидов с хиновозой (6-дезоксиглюкоза) и фукозой (6-дезоксигалактоза). Также важно отметить, что среди ксантофиллов присутствует в небольшом

количестве 3-гидроксиэхиненон, который является хромофором в водорастворимом оранжевом каротиноидном белке (ОРБ) и выполняет функции рецептора, регулятора и эффектора нефотохимического тушения флуоресценции фикобилисом цианобактерий, а также способен тушить АФК [11].

Учитывая важность каротиноидов как с точки зрения их функциональной роли в цианобактериях, так и с биомедицинской точки зрения, задачей работы было выявление условий, способствующих эффективному образованию каротиноидов в спирулине и их более полному извлечению с применением простых биотехнологических методов, а также изучение их свойств.

Выращивание культуры спирулины проводили в стеклянных фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим слоем 5 см на минеральной среде Заррук в накопительном режиме при постоянном перемешивании посредством барботирования воздуха в условиях постоянного освещения люминесцентные лампы дневного белого света Philips TL-D 18W/54-765 (средняя поверхностная облученность 50 Вт/м²). Температуру среды поддерживали на уровне 30-32 °С, рН среды поддерживали на уровне 8-9. Здесь следует отметить, что поддержание рН среды на уровне 8-9 является важнейшим фактором успешного роста алкалофильной культуры спирулины и накопления в ней пигментов (хлорофилла, каротиноидов и фикобилинов) [12]. Именно выращивание культуры в этих пределах рН приводило далее к проявлению максимальной антиоксидантной, в том числе антирадикальной активности у пигментов *A.platensis*. При рН выше 9,5 наблюдалось значительное снижение роста культуры, по-видимому, при этих рН наступали стрессовые условия для спирулины [12], хотя ранее рН 8-11 считались приемлемыми для роста и развития *A.platensis* [13].

Суспензию двухнедельной культуры *A.platensis* концентрировали на фильтре с размерами пор 30 мкм, сырую массу клеток промывали на фильтре водой и далее высушивали при температуре 38 °С в темноте или обезвоживали в других условиях. Воздушно-сухая биомасса содержит 10-15% остаточной влажности, но клетки при этом не погибают, а переходят в состояние анабиоза (ангидробиоза). Мы полагаем, что при переходе в состояние ангидробиоза в клетках спирулины может индуцироваться синтез защитных веществ, в частности, каротиноидов. Параллельно обезвоживание проводили в других условиях. Во-первых, дегидратировали биомассу, помещенную в диализную мембрану с помощью влагопоглощающего агента – полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 20000 Da при температуре 6 °С. Во втором и третьем вариантах сырую биомассу высушивали при температуре 38 °С и одновременно облучали светодиодными источниками с длиной волны 365 или 450 нм, с облученностью 22 Вт/м².

Далее сухую биомассу измельчали и экстрагировали смесью Фолча (хлороформ:этанол, 2:1). После добавления к экстракту воды формируется двухфазная система с формированием оранжевого осадка в интерфазе, что говорит о присутствии в нём каротиноидов. Концентрация в спирулине выделенного комплекса веществ, содержащего в своём составе каротиноиды, составляла 0,76 %, а содержание каротиноидов в комплексе 9,8 %.

Показано, что стресс в условиях обезвоживания влияет на пигментобразование в клетках спирулины. На рисунке 1 приведены спектры поглощения экстрактов смесью Фолча, взятых в количестве 20 мкл, доведённых этанолом до 2 мл и снятых против этанола, для образцов сырой биомассы, подвергнутой обезвоживанию в четырёх различных условиях. Вычисляли (в %) прирост каротиноидов по поглощению при 475 нм, прирост фикоцианинов по поглощению при 620 нм и прирост хлорофилла по поглощению при 665 нм относительно образца, высушенного в диализной трубке в темноте при 6 °С.

Анализ спектральных данных, представленных на рисунке 1 и проведенные расчёты показали, что относительно образца, высушенного при низкой температуре в темноте в диализной трубке, воздействие температуры и облучения образцов во время обезвоживания приводило к усилению синтеза и накоплению пигментов. При обезвоживании при 38 °С содержание хлорофилла увеличивалось примерно на 9 %, содержание каротиноидов увеличивалось примерно на 6 %, а количество фикобилинов изменялось очень незначительно. Сочетанное действие температуры и облучения оказывало различное воздействие. Так, совместное воздействие температуры и облучения при 365 или 450 нм, приводило к одинаковому незначительному приросту количества фикобилинов. На синтез каротиноидов и хлорофилла свет разного спектрального диапазона влиял по-разному. Если излучение с длиной волны 450 нм практически не влияло на синтез каротиноидов, то излучение при 365 нм влияло значительно, увеличивая количество каротиноидов более чем на 15 %. Ещё более сильное воздействие оказывало облучение во время теплового обезвоживания на синтез хлорофилла. Облучение при 450 нм во время высушивания при 38 °С привело к увеличению хлорофилла на 15 %, а облучение при 365 нм привело к увеличению количества хлорофилла на 20 %. Таким образом, можно заключить, что обезвоживание клеток спирулины на пути к ангидробиозу вызывает перестройку клеточного метаболизма. При этом, наряду с температурным воздействием, сильное действие оказывает ближнее ультрафиолетовое (УФ-А) излучение, индуцируя выработку пигментов (хлорофилла и каротиноидов).

Далее необходимо было проанализировать состав выделенного путём экстракции со смесью Фолча комплекса, содержащего каротиноиды. Комплекс растворяли в 96 % этаноле и при этом выпадал белый осадок, который как мы предположили имеет белковую природу на основании нижеследующего. Осадок был осаждён центрифугированием при 12000 g. Элементный состав белковой части комплекса, проанализированный на СНN-анализаторе, показал присутствие углерода в количестве 47,7±1,7 % и азота – 6,7±0,3 %. Таким образом,

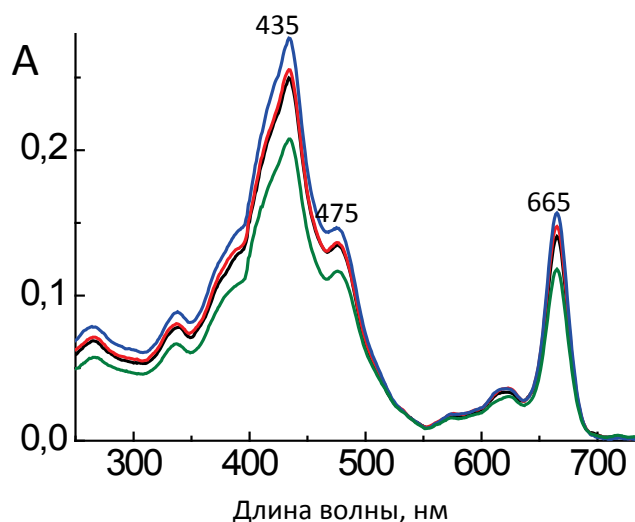


Рисунок 1. Спектры поглощения экстрактов *A. platensis*. смесью Фолча, разбавленных 98 % спиртом: черный – биомасса высушена при 38 °С; красный – биомасса высушена при 38 °С при облучении 450 нм; синий – биомасса высушена при 38 °С при облучении 365 нм; зеленый – биомасса высушена над ПЕГ в диализной трубке при 6 °С.

можно предположить, что комплекс состоит из белков, каротиноидов и, возможно, углеводных компонентов пептидогликана клеточной стенки. На рисунке 2 приведен спектр поглощения спиртового экстракта каротиноид-белкового комплекса, полученного экстракцией со смесью Фолча из сухой биомассы, высушенной при 38 °С. Как видно из рисунка в спектре присутствуют максимумы при 415 нм и 667 нм, которые можно отнести к поглощению феофитина и хлорофилла, а также плечо в области 450 нм, максимум при 476 нм и плечо в области 500 нм, которые можно соотносить с поглощением миксоксантофилла, имеющего в поглощении плечо при 448 нм, основной максимум при 473 нм и максимум при 507 нм. Таким образом, можно предположить, что в составе выделенного нами каротиноид-белкового комплекса присутствует также в незначительных количествах хлорофилл. На вставке в рисунок 2 приведен спектр флуоресценции из которого видно, что флуоресцирует только хлорофильная компонента комплекса при возбуждении на 415 нм и отсутствует флуоресценция от каротиноидных компонентов комплекса, так как каротиноиды не флуоресцируют.

Каротиноиды, входящие в состав комплекса анализировали далее методом ВЭЖХ после ацетилирования уксусным ангидридом в пиридине. На рисунке 3 приведена ВЭЖХ хроматограмма, на которой видны только два основных пика, соответствующих по времени удерживания ацетатам осциллаксантина и миксоксантофилла, взятых в качестве свидетелей. Соотношение ксантофиллов в комплексе составляет 63 % миксоксантофилла и 27 % осциллоксантина.

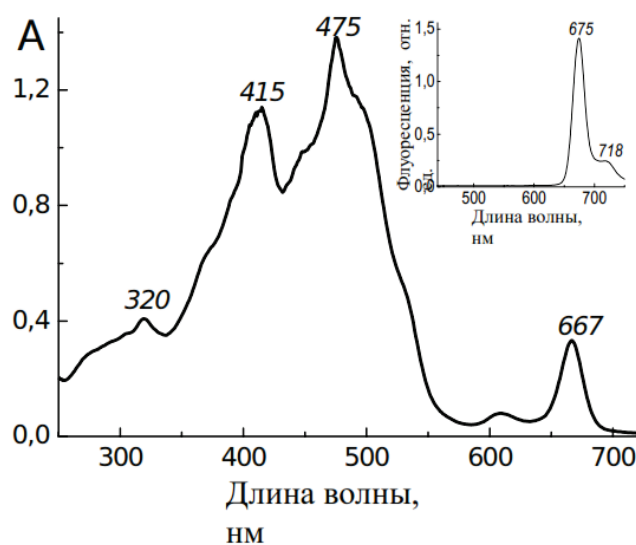


Рисунок 2. Спектр поглощения экстракта каротиноид-белкового комплекса в 98 % спирте. На вставке: спектр флуоресценции этого комплекса при длине волны возбуждения $\lambda = 415$ нм

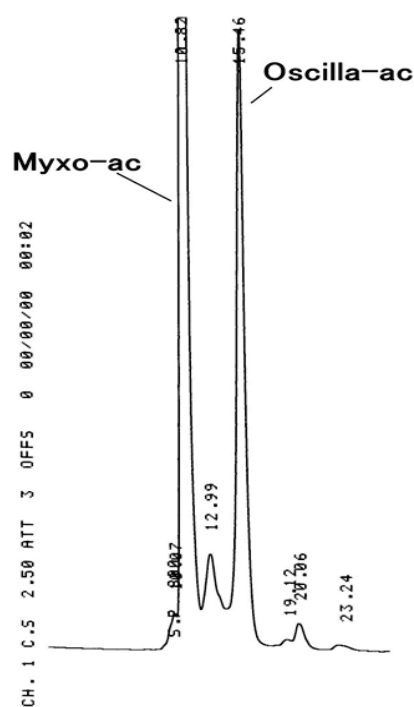


Рисунок 3. ВЭЖХ ацетатов ксантофилов полученных из каротиноид-белковых комплексов на колонке с силикагелем, подвижная фаза Ацетон:Гексан (4:6)

Таким образом, можно заключить, что разработанный нами метод позволил выделить биологически активные ксантофиллы, обладающие сильной антиоксидантной активностью, в виде комплекса с белком, который придаёт устойчивость и определенную гидрофильность ксантофиллам, что увеличивает их биодоступность и потенциальную физиологическую активность. Эти результаты согласуются с ранее полученными нами данными по выделению из этой цианобактерии водорастворимых каротиноид- и хлорофилл-связывающих белков. Был выделен и охарактеризован водорастворимый каротиноид- и хлорофилл-связывающий белок с молекулярной массой 16 кДа [14].

Список литературы / References:

1. Ciferri O., Tiboni O. The biochemistry and industrial potential of spirulina. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1985, vol. 39, pp. 503-526.
2. Чернова Н.И., Коробкова Т.П., Киселева С.В. Микроводоросль спирулина как объект биотехнологии. *Биология: учеб.-метод. и науч.-попул. журн. для преподавателей биологии, экологии и естествознания*, 2006, № 13, ID=200601304. [Chernova N.I., Korobkova T.P., Kiseleva S.V. Microalga spirulina as an object of biotechnology. *Biologiya*, 2006, no. 13, ID=200601304 (In Russ.)]
3. Henrikson R. *Earth Food Spirulina*. California: Ronore Enterprises. Inc. Kenwood, 1994, 187 p.
4. Johnson E.J. The role of carotenoids in human health. *Nutr. Clin. Care*, 2002, vol. 5, pp. 56-65.
5. Hiquers-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F.M. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Application. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2006, vol. 46, pp. 185-196.
6. Дараселия Г.Я., Фомина М.И. Стимуляция роста и каротиногенеза *Rhodococcus specium* штамм 44. *Вестник Астраханского государственного технического университета*, 2008, № 3, с. 173-177. [Daraceliya G.Ya., Fomina M.I. Stimulation of growth carotenogenesis Phodococcus specium culture 44. *Vestnik Astrahanskogo gosudarsvennogo universiteta*, 2008, no. 3, pp. 173-177. (In Russ.)]
7. Дейнека В.И., Шапошников А.А., Дейнека Л.А., Гусева Т.С., Вострикова С.М., Шенцева Е.А., Закирова Л.Р. Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: медицина. фармация*, 2008, т. 6, № 6, с. 19-25. [Deineka V.I., Shaposhnikov A.A., Deineka L.A., Guseva T.S., Vostrikova S.M., Shentseva E.A., Zakirova L.R. Carotenoids: biological functions and perspectives of application. *Nauchnie vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: medicina. farmaciya*, 2008, vol. 6, no. 6, pp. 19-25. (In Russ.)]
8. Eriksen N.T. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 80, no. 1, pp. 1-14.
9. Jiang L., Wang Y., Yin Q., Liu G., Liu H., Huang Y., Li B. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. *J. Cancer.*, 2017, vol. 8, no. 17, pp. 3416-3429.
10. Aakermann T., Skulberg O.M., Liaaen-Jensen S. A comparison of the carotenoids of strains of Oscillatoria and Spirulina (Cyanobacteria), *Biochemical Systematics and Ecology*, 1992, vol. 20, no. 8, pp. 761-769.

11. Maksimov E.G., Moldenhauer M., Shirshin E.A., Parshina E.A., Sluchanko N.N., Klementiev K.E., Tsoraev G.V., Tavraz N.N., Willoweit M., Schmitt F.J., Breitenbach J., Sandmann G., Paschenko V.Z., Friedrich T., Rubin A.B. A comparative study of three signaling forms of the Orange Carotenoid Protein. *Photosynthesis Research*, 2016, vol. 130, no. 1-3, pp. 389-401.
12. Ismaiel M.M., El-Ayouty Y.M., Piercey-Normore M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Braz. J. Microbiol.*, 2016, vol. 47, no. 2, pp. 298-304.
13. Pandey J.P., Pathak N., Tiwari A. Standardization of pH and Light Intensity for the Biomass Production of *Spirulina platensis*. *J. Algal Biomass Utiln.* 2010, vol. 1, no. 2, pp. 93-102.
14. Telegina T.A., Biryukov M.V., Terekhova I.V., Vechtomova Yu.L., Kritsky M.S. Isolation and Characterization of the Water-Soluble Chromoproteins of Cyanobacteria *Arthrospira platensis*: C-phycoerythrin, Allophycoerythrin, Carotenoid- and Chlorophyll a-Binding Proteins. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2018, vol. 54, no. 6.

SPECTRAL CHARACTERISTICS OF CAROTENOIDS FROM CYANOBACTERIUM *ARTHROSPIRA PLATENSIS* UNDER CONDITIONS OF ADAPTIVE RESPONSE TO DEHYDRATION

Telegina T.A.¹, Gevorgiz R.G.², Nekhoroshev M.V.², Biryukov M.V.³, Vechtomova Y.L.¹, Kritsky M.S.¹

¹ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences
Leninsky prospect, 33, bld. 2, Moscow, 119071, Russia

² Institute of Marine Biological Research A.O. Kovalevsky
Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

³ M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gori, 1, buld 12, Moscow, 119991, Russia

Abstract. The chromogenic (carotenoid) complex *A.platensis* and the influence on its formation of dehydration stress is studied. Various conditions of dehydration at different temperatures and the influence of UV-A (365 nm) irradiation and visible light (450 nm) on the formation of biologically important carotenoids have been investigated. A method was developed for extraction and purification of xanthophylls: myxoxanthophyll (63 %) and oscillaxanthin (27 %) from biomass *A.platensis* using fluid: liquid extraction with the Folch extraction. It was - found that irradiation in the near ultraviolet range (365 nm) at a temperature of 38 °C leads to an increase in the synthesis of xanthophylls, and a low temperature does not have such effect.

Key words: *spirulina, Arthrospira platensis, carotenoids, xanthophylls, dehydration, dehydration stress.*