

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАПРАВЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ЦЕННЫХ МЕТАБОЛИТОВ В УСЛОВИЯХ ИНТЕНСИВНОЙ КУЛЬТУРЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

*Г. Л. Клячко-Гурвич и В. Е. Семененко*

Одноклеточные зеленые водоросли давно привлекают внимание биологов как возможный источник белков, жиров и других ценных веществ. Однако основные усилия исследователей до последнего времени были направлены на развитие техники культивирования водорослей и подбор условий и штаммов для получения высокопродуктивной культуры. Особенности же метаболизма водорослей изучались сравнительно мало. Но так как возможность использования водорослей для направленного синтеза ценных веществ представляет большой интерес, необходимо хорошо знать пути их метаболизма. Хотя лабильность обмена веществ водорослей известна давно, недостаточно изучены способы направленного получения даже таких основных компонентов клеток, как белки, жиры и углеводы. Относительно других веществ сведений вообще почти нет. Вместе с тем полученные в последние годы данные позволяют думать, что водоросли можно использовать для направленного биосинтеза целого ряда соединений.

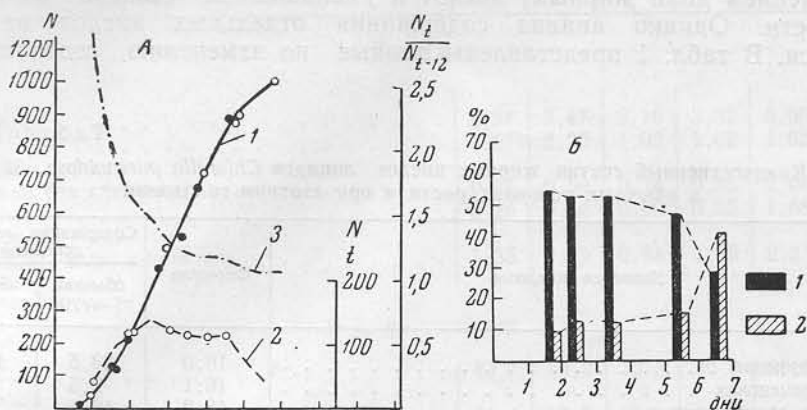
При направленном получении определенного вещества надо иметь в виду, что физиологические условия, оптимальные для общей продуктивности, не всегда являются наилучшими для синтеза желаемого соединения. Этот принцип широко применяется в промышленной микробиологии и, вероятно, его можно использовать и в отношении водорослей.

При создании оптимальных условий для роста культуры идет усиленное воспроизведение потомства, и синтетические процессы организма направлены на создание соответствующих веществ. В активно растущей культуре хлореллы в большом количестве синтезируются белки, привлекающие внимание исследователей своим аминокислотным составом. Обычно белки составляют 50—60% от сухого веса клеток, 10—15% приходится на долю углеводов и около 20% — на долю липидов. Подобное соотношение наблюдалось разными авторами для разных штаммов хлореллы.

При культивировании в ограниченном объеме, когда по мере нарастания плотности клеток изменяется весь комплекс условий, существует линейный участок роста культуры, когда соотношение основных групп веществ меняется очень незначительно (см. рисунок). Очевидно,

пока имеется хоть какая-то возможность, синтетическая активность организма направлена на создание пластического материала для образования дочерних клеток, и этот процесс в достаточной мере консервативный.

Для того чтобы направить обмен веществ на синтез других компонентов, липидов или углеводов, необходимо, вероятно, каким-то обра-



Изменение биохимического состава хлореллы по ходу кривой роста:  
 А.  $N$  — число клеток  $\times 10^6$  в 1 мл суспензии; 1 — плотность суспензии

( $N$ ); 2 — изменение плотности суспензии за 12 час. ( $\frac{N_t}{N_{t-12}}$ ); 3 — коэффициент размножения

$$\left( \frac{N_t}{N_{t-12}} \right)$$

Б. 1 — белковые вещества в % от сухого веса клеток; 2 — углеводы в % от сухого веса клеток. Значки на кривых относятся к разным опытам

зом задержать синтез белка. Наиболее простым путем для этого является лишение клетки специфического материала для построения белка, а именно азота.

Известно много работ (Spoehr a. Milner, 1948; Aach, 1952; Collyer a. Fogg, 1955; Iwamoto a. Suzuki, 1958), в которых азотное голодание использовали как прием для получения клеток с высоким содержанием липидов, в отдельных случаях до 70—80% от сухого веса. В опытах, проводившихся в нашей лаборатории, был использован тот же прием для получения хлореллы со сравнительно высоким (50% от сухого веса) содержанием липидов.

Водоросли выращивали в культуральных сосудах на минеральной среде Тамийя при круглосуточном продувании воздуха, обогащенного до 1%  $CO_2$  и непрерывном освещении люминесцентными лампами. Освещенность на уровне сосудов порядка 13 000 лк (Владимилова и Семеновко, 1962). После достижения плотности 300—400 млн. клеток на 1 мл суспензию центрифугировали, и клетки для дальнейшего культивирования помещали в те же условия или на среду без азота.

Клетки, лишенные азота, сохраняли фотосинтетическую активность, и увеличение сухого веса суспензии продолжалось. За 3—7 дней азотного голодания увеличение общего веса 1 мл суспензии было примерно равно увеличению количества липидов в том же объеме. Следовательно, на этом этапе азотного голодания хлорелла представляла систему, синтетическая активность которой была направлена на образо-

вание липидов. При этом около 75% липидов составляли жирные кислоты.

Анализ состава жирных кислот позволил выявить еще более специфичную направленность синтеза исследуемой системы. Еще в работе Мильнера (Milner, 1948) было показано, что накопление липидов у хлореллы сопровождается изменением их качественного состава, а именно: увеличением доли жирных кислот и уменьшением степени их насыщенности. Однако анализ содержания отдельных кислот не проводился. В табл. 1 представлены данные по изменению соотношения

Таблица 1

Количественный состав жирных кислот липидов *Chlorella purenoidosa*, 82 в обычных условиях роста и при азотном голодании

Название кислоты	Формула	Содержание, весовые проценты	
		обычная культура	азотное голодание
Пальмитиновая . . . . .	16:0	23,5	18,0
9-гексадеценвая . . . . .	16:1	2,5	1,5
7,10-гексадекадиеновая . . . . .	16:2	12,0	3,8
7, 10, 13-гексадекатриеновая . . . . .	16:3	11,1	5,0
Стеариновая . . . . .	18:0	0,6	3,0
Олеиновая . . . . .	18:1	3,9	43,2
Линолевая . . . . .	18:2	21,0	11,0
Линоленовая . . . . .	18:3	24,2	13,7

жирных кислот хлореллы в условиях азотного голодания. Идентификация жирных кислот была проведена в предшествующей нашей работе (Верещагин и Клячко-Гурвич, 1965). Как видно из таблицы, в условиях азотного голодания в клетках хлореллы резко возрастает доля олеиновой кислоты. В исходной культуре она составляла 3,9%, при азотном голодании 43,2%. Это значит, что олеиновая кислота составляла около 30% от веса веществ, синтезируемых в период азотного голодания. Подобная реакция, вероятно, характерна для хлореллы и этим объясняется высокое содержание у данной водоросли олеиновой кислоты, отмеченное ранее в ряде работ (Schlenk a. oth., 1960; Klenk, u. a., 1963, а также Paschke u. Wheeler, 1954), обнаруживших довольно низкое содержание олеиновой кислоты при анализе материала, бедного жирами.

Однако в условиях азотного голодания может проявиться и другая направленность обмена. Нами было показано (Клячко-Гурвич, 1964), что *Chlorella* sp. К. при отсутствии азота переходит к интенсивному синтезу углеводов, и прежде всего крахмала. При этом удалось получить биомассу, содержащую 55% углеводов и 45% крахмала от сухого веса. Если рассматривать не только изменение состава клеток, но и соотношение веществ в расчете на прирост за определенный отрезок времени (табл. 2), можно видеть, что в данном случае хлорелла работает как система, синтезирующая преимущественно крахмал (53% от прироста).

М. В. Пахомова (1963) при культивировании водорослей в гетеротрофных условиях, в темноте, получила *Scenedesmus obliquus* с содержанием 27% крахмала и 15% гемицеллюлоз. У другого вида *Scenedesmus quadricauda* ею было найдено 40% гемицеллюлоз от сухого веса.

Таблица 2

Синтез углеводов *Chlorella* sp. K. при азотном голодании

Показатели	Среда Тамия			Среда Тамия без азота		
	I срок	II срок	при-рост	I срок	II срок	при-рост
В мг/мл						
Сухой вес . . . . .	3,37	5,47	2,10	3,37	6,05	2,68
Белок . . . . .	1,67	2,70	1,03	1,67	1,62	-0,05
Углеводы (сумма без клетчатки) . . . . .	0,35	0,59	0,24	0,35	2,08	1,73
Крахмал . . . . .	0,25	0,34	0,09	0,25	1,68	1,43
Остаток (липиды, зола, клетчатка) . . . . .	1,35	2,19	0,84	1,35	2,33	0,98

## В % на сухой вес

Белок . . . . .	49,7	49,3	49,3	49,7	26,7	-1,9
Углеводы (сумма без клетчатки) . . . . .	10,4	10,7	11,4	10,4	34,8	64,5
Крахмал . . . . .	7,4	6,3	4,3	7,4	27,7	53,3
Остаток (липиды, зола, крахмал) . . . . .	39,9	40,0	40,0	39,9	38,5	36,5

В этом случае также шел направленный синтез углеводов, но уже не крахмала, а гемицеллюлоз.

Таким образом, рассмотренные выше данные свидетельствуют о том, что метаболизм хлореллы не только может иметь белково-липидную направленность, как неоднократно указывалось в литературе, но и может быть изменен в сторону синтеза углеводов. При этом существенно, что общее количество липидов или углеводов увеличивается в результате усиленного синтеза отдельных соединений этих фракций. Организм, не имея возможности синтезировать все многообразные вещества, необходимые для его жизнедеятельности, направляет свою синтетическую активность на образование одного или немногих веществ. Эту особенность можно, очевидно, использовать для направленного получения данных веществ.

При соответствующих условиях можно резко усилить синтез тех соединений, которых обычно в клетках содержится очень мало. Как пример приведем данные Е. С. Милько (1963) по синтезу каротина у зеленой водоросли *Dunaliella*, на основании которых составлена табл. 3.

Таблица 3

Влияние условий культивирования *Dunaliella salina* на синтез  $\beta$ -каротина  
(по Е. С. Милько, 1963)

	27°		2200 лк		34°		12000 лк	
	I срок	II срок	при-рост	I срок	II срок	при-рост	I срок	II срок
Сухой вес биомассы, мг/л . . . . .	350	640	290	350	430	80		
$\beta$ -каротин, мг/л . . . . .	1,54	2,66	1,12	1,54	5,00	3,46		
$\beta$ -каротин, % на сухой вес биомассы . . . . .	0,44	0,415	0,39	0,44	1,16	4,34		

Как видно из таблицы, повышение температуры с 27 до 34° и освещенности с 2200 до 12000 лк способствовало повышению концентрации каротина с 0,39 до 4,34% от сухого веса прироста клеток за определенный отрезок времени. Таким образом, в этот период интенсивность синтеза каротина возрастает более чем в 10 раз, условия среды отрицательно сказываются на приросте биомассы.

Для иллюстрации усиленного накопления углеводов и липидов взяты случаи, когда общая интенсивность синтеза биомассы не менялась, но менялась его направленность. Однако в ряде случаев и в наших опытах усиленный синтез одного соединения, например крахмала, происходил при падении общей продуктивности культуры. Очевидно, преодолеть это противоречие можно, вводя соответствующую технологию культивирования. Например, посредством предварительного выращивания водорослей в условиях, оптимальных для накопления биомассы, с последующим переходом на условия, способствующие синтезу данного вещества.

Большой интерес представляет возможность использовать одноклеточные зеленые водоросли для биосинтеза веществ вторичной природы: алкалоидов, стероидов, витаминов и т. п. Выше был приведен пример усиленного синтеза каротина у *Dunaliella*, однако в общем условия биосинтеза вторичных веществ изучены очень плохо. Поэтому говорить об уже существующих возможностях преждевременно, можно лишь ставить вопрос о необходимости постановки подобных исследований. Например, по немногочисленным данным зеленые водоросли могут представлять интерес с точки зрения обмена стероидов. В отличие от высших растений, у хлореллы обнаружен эргостерин, свойственный грибам (0,2—0,3% на сухой вес). Наряду с эргостерином найдены (Otsuka, 1963) соединение с одной двойной связью у пятого атома углерода и соединение типа кортикостерина. У двух штаммов сценедесмуса обнаружены разные стериды (хондрилластерин и зимостерин). Представляет интерес уже само разнообразие стероидов.

Кроме того, показано (Guehler, a. oth., 1962), что хлорелла способна трансформировать различные стероиды, добавленные в среду. Под влиянием одного штамма хлореллы, выведенного упомянутыми выше авторами, образуется несколько производных из прогестерона. Повидимому, целесообразно более детальное исследование одноклеточных водорослей в отношении способности трансформации стероидов, а также и в отношении их способности к другим специфическим биосинтезам.

Таким образом, физиолого-биохимические исследования показывают, что при создании соответствующих условий одноклеточные зеленые водоросли способны к направленному биосинтезу определенных веществ, таких, как отдельные жирные кислоты, аминокислоты, крахмал, пигменты. Эта особенность водорослей может представлять практический интерес для промышленного получения определенных веществ по типу современных микробиологических производств, но с использованием фотоавтотрофных организмов. Надо учитывать, что в настоящее время исследованы далеко не все возможности изменения биохимического состава водорослей и круг их может быть расширен как путем введения в культуру различных природных и создания новых форм водорослей, так и подбором физиологических условий, в которых биохимические особенности этих форм проявились бы в полной мере.

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL ASPECTS OF A DIRECTED PRODUCTION OF VALUABLE METABOLITES OF ALGAE IN INTENSIVE CULTIVATION

G. L. Klyachko-Gurvich and V. E. Semenenko

Summary

Unicellular green algae are capable of a directed biosynthesis of certain substances (aminoacids, fatty acids, starch, pigments, steroids, vitamins etc.). An actively growing *Chlorella* culture is characterised by a heightened synthesis of protein. This process is fairly conservative. In order to direct metabolism towards a synthesis of other basic components, lipids or carbohydrates, it is necessary to inhibit in some way the synthesis of proteins. If this is achieved the *Chlorella* cell becomes a system which synthetic activity may be directed depending on the characteristics of the strain and the conditions of its cultivation to the production of lipids (*Chl. pyrenoidosa*, 82) or carbohydrates (*Chl. sp.*, K). It is significant that increase in total lipids or carbohydrates is achieved by an intensified synthesis of certain compounds of these substances. In the investigated strains these compounds were oleinic acid and starch, in other algae — hemicelluloses. Since an intensified synthesis of lipids, carbohydrates and secondary substances frequently proceeds under conditions which reduce the total productivity of the culture, appropriate technology of cultivation has to be employed to ensure a continuous production of biomass with modified chemical composition.

ЛИТЕРАТУРА

- Верещагин А. Г. и Клячко-Гурвич Г. Л. 1965. Строение и количественный состав жирных кислот липидов водоросли *Chlorella*. «Биохимия», **30**, 543.
- Владимирова М. Г. и Семененко В. Е. 1962. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М., Изд-во АН СССР.
- Клячко-Гурвич Г. Л. 1964. Направленный биосинтез углеводов у хлореллы. «Физиология растений», **11**, 978.
- Милько Е. С. 1963. Изучение физиологии и пигментообразования зеленой водоросли *Dunaliella*. Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. МГУ.
- Пахомова М. В. 1963. Биохимическое исследование некоторых видов водорослей. Автореф. дисс. на соиск. ученой степени канд. биол. наук. МГУ.
- Aach H. G. 1952. Über Wachstum und Zusammensetzung von *Chlorella pyrenoidosa* bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen. «Arch. Mikrobiol.», **17**, 213.
- Collyer D. a. Foff G. 1955. Studies on fat accumulation by Algae. «J. Exptl. Bot.», **6**, 256.
- Guehler P. F. Dodson R. M. a. Tsuchiya H. M. 1962. Transformation of steroids with *Chlorella pyrenoidosa*. «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.», **48**, 377.
- Iwamoto H. a. Suzuki A. 1958. Fat Synthesis in Unicellulae Algae, p. IV. Nocturnal effect on fat accumulation in *Chlorella*. «Bull. agric. Chem. Soc.» Japan., **22**, 42.
- Klenk E., Knipprath W. a. oth. 1963. Über die ungesättigten Fettsäuren der Fettstoffe von Subwasser und Meeresalgen. «Z. phys. Chem.», **334**, 44.
- Milner H. W. 1948. The fatty acids of *Chlorella*. «J. Biol. Chem.», **176**, 813.
- Otsuka H. 1963. Contents of sterols in *Chlorella* cells at different developmental stages. «Plant cell Physioll.», **4**, 293.
- Paschke R. E. u. Wheeler D. H. 1954. Die ungesättigten Fettsäuren der Alga *Chlorella*. «J. Amer. Oil Chemists' Soc.», **31**, 81.
- Schlenk H., Mangold H. and oth. 1960. Comparative analitical studies of fatty acids of the Alga *Chlorella pyrenoidosa*. «J. Amer. Oil Chemists' Soc.», **37**, 547.
- Spoehr H. a. Milner H. 1948. The chemical composition of *Chlorella* effect of environmental condition. «Plant Physioll.», **24**, 120.