

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ

МИКРООРГАНИЗМЫ В ИСКУССТВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Ответственные редакторы
д-ра биол. наук *Б. Г. Ковров, В. А. Кордюм*

(Отдельный оттиск)



НОВОСИБИРСК
ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
1985

10. Одоевская Н. С., Геращенко Л. М., Горюнова С. В. Длительное хранение коллекционных культур некоторых видов водорослей.— Микробиология, 1969, т. 38, вып. 3, с. 544—547.
11. Пименова М. Н., Жданникова Е. Н., Максимова И. В. Определение живых и мертвых клеток в культурах протококковых водорослей.— Микробиология, 1965, т. 34, вып. 6, с. 1080—1085.
12. Пименова М. Н., Максимова И. В., Жданникова Е. Н. Выживаемость некоторых представителей зеленых водорослей в зависимости от условий и длительности хранения.— Микробиология, 1969, т. 38, вып. 3, с. 538—543.
13. Рудова Т. С. Качественная направленность биосинтеза микроводорослей и его регуляция: Автореф. канд. дис.— М., 1981.— 24 с.
14. Семенов В. Е., Силицкий И. Г., Цоглин Л. П. Установка для изучения CO_2-O_2 -газообмена водорослей.— В кн.: Материалы 7-го Всесоюзного рабочего совещания по вопросам круговорота веществ в замкнутой системе. Киев: Наук. думка, 1972, с. 26—28.
15. Сиренко Л. А., Марценюк П. П. О количественной регистрации интенсивности флуоресценции микроскопических препаратов: Методы изучения и практического использования почвенных водорослей. Киров, изд. Киров. сельхозинститута, 1972, с. 118—124.
16. Терешкова Г. М. Устойчивость некоторых автотрофных микроорганизмов к низкотемпературной и сухой консервации: Автореф. канд. дис.— Иркутск, 1982.— 24 с.
17. Фатеева М. В. Методы хранения коллекционных культур дрожжей.— В кн.: Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М.: Наука, 1967, с. 55—90.
18. Цоглин Л. П., Владимировичева М. Г., Семенов В. Е. Математическое и экспериментальное моделирование процесса автоселекции микроводорослей в условиях проточного культивирования.— Физиология растений, 1970, т. 17, вып. 6, с. 1129—1139.
19. Hindak F. Culture collection of algae at Laboratory of Algology of Trebon.— Arch. Hydrobiol. /Suppl. 39, Algological Studies 2/3, 1974, p. 86—126.
20. Pringsheim E. G. Algenreinkulturen, ihre Herstellung und Erhaltung.— Jena, 1954.— 109 S.

Г. Л. Клячко-Гурвич, М. И. Таутс,
В. Е. Семенов

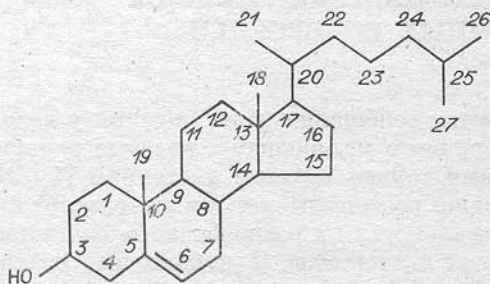
СОЕДИНЕНИЯ СТЕРОИДНОЙ ПРИРОДЫ У ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Все чаще появляются сообщения о нахождении у водорослей соединений вторичного метаболизма, которые раньше считались свойственными только высшим растениям [1—3]. В то же время все больше растет интерес к этим соединениям по мере того, как выясняются их разнообразные функции. К числу таких относятся и стероиды. Так называют соеди-

нения, в основе структуры которых лежит пентациклофенантропное кольцо. Такое определение не является исчерпывающим, так как это обширная и разнообразная группа веществ и нет четкой границы между ними и циклическими тритерпенами. Биосинтетическими и эволюционными предшественниками стероидов служат терпены [1, 4—7]. Стероиды отличаются чрезвычайно высокой физиологической активностью, которая может проявляться как по отношению к организму, синтезирующему данный стероид, так и к другим организмам. К стероидам относят собственно стерины, половые гормоны, кортикостероиды, желчные спирты и кислоты, сердечные гликозиды, сапогенины, стероидные алкалоиды, витамины группы Д и другие соединения. В последнее время открываются все новые классы физиологически активных стероидных соединений.

Как потенциальное сырье для производства стероидных препаратов и как компоненты первичного звена пищевых цепей водоросли привлекают внимание ученых уже около 50 лет. Последнее имеет особое значение в связи с тем, что многие беспозвоночные (моллюски, ракообразные, насекомые и т. п.) утратили способность к синтезу стероидов *de novo* [7—9]. В замкнутой экологической системе (ЗЭС) содержание и состав стероидов могут иметь значение, влияя на жизнедеятельность самих водорослей и определяя пищевую ценность или токсическую опасность при использовании биомассы или даже создавая определенный физиологически активный фон среды обитания.

Наиболее изучены среди стероидов водорослей стерины, возможно в силу их большей встречаемости. Стерины представляют соединения с 27—29 атомами углерода, содержащие наряду с циклической структурой боковую цепь при С-17 атоме углерода и гидроксильную группу при С-3. Типичным представителем стероидов, наиболее распространенным у животных и часто встречающимся у водорослей, является холестерин (рис. 1), играющий ключевую роль в биосинтезе многих классов стероидов. Стерины могут выполнять роль физиологически активных веществ или их пред-



синтезе многих классов стероидов. Стерины могут выполнять роль физиологически активных веществ или их пред-

Рис. 1. Структура холестерина. Цифрами обозначены порядковые номера атомов углерода.

пещественников. В то же время стерины, а у прокариотов родственные им терпеноиды входят в состав мембран и играют в них важную структурно-функциональную роль, регулируя физико-химические свойства мембран и многие стороны обмена клеток.

Стерины водорослей чрезвычайно многообразны. Уже накоплен большой экспериментальный материал по этому вопросу, однако инвентаризация их не закончена [7—9]. Приуроченность отдельных форм стеринов к определенным типам водорослей привела к тому, что состав первых часто рассматривают как один из таксономических критериев. При этом существует некоторый параллелизм между последовательностью этапов биосинтеза стеринов в организме и эволюцией указанного процесса в ходе филогенеза. У наиболее просто организованных синезеленых водорослей, как и у бактерий, долгое время не находили стеринов. В последние годы доказано, что синезеленые водоросли содержат стерины разнообразной природы, но в очень низкой концентрации [7, 10]. Признаки незавершенности структуры ядра стеринов отчетливо проявляются у пиропитовых водорослей, стоящих на относительно низкой ступени эволюционной лестницы. У них преобладают стерины, сохранившие метильную группу по C-4, а также двойную связь [8, 14] в ядре (см. рис. 1) [7, 11, 12]. У водорослей большинства других типов содержатся стерины с Δ^5 , Δ^7 или Δ^5 и 7 связями. Очень большим разнообразием форм отличается строение боковой цепи стеринов, при этом преобладают алкилированные по C-24. Необходимо отметить, что в отличие от высших растений, содержащих α -изомеры, у водорослей преимущественно находят β -изомеры. Исключения представляют диатомовые водоросли, с характерным для них диатомостерином (24 α -метил — 5,22-холестадиенол), который не встречается в других растениях, но найден у беспозвоночных [7, 11]. В последнее время, правда, α -изомеры стеринов обнаружены у золотистых и пиропитовых водорослей [12]. Алкилирование боковой цепи происходит путем последовательного метилирования C-24 атома. При рассмотрении алкильной группы у разных водорослей прослеживается тенденция к преобладанию одноуглеродной у более примитивных таксонов (пиропитовые, эгленовые, диатомовые) и двууглеродной у бурых, многоклеточных зеленых и харовых водорослей. Зеленые одноклеточные водоросли занимают промежуточное положение. У золотистых водорослей находят производные пролина. Особняком стоят красные водоросли, у которых алкилированные стерины становятся минорными ком-

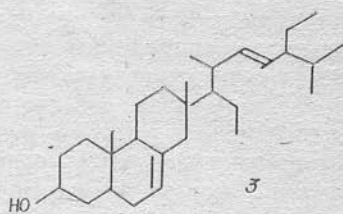
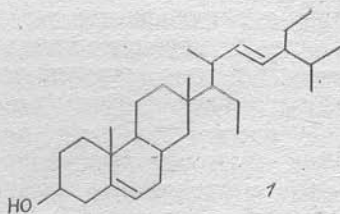
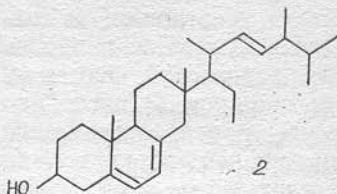


Рис. 2. Структура преобладающих стеридов в разных видах хлореллы. 1 — пориферастерин; 2 — эргостерин; 3 — хондрилластерин.



понентами, а преобладают холестерин, 22- и 24-дегидрохолестерин. Интересно, что отсутствие алкильной группы характерно для высших животных. Очевидно, в отношении процес-

са биосинтеза стеридов красные водоросли значительно отличаются от других растений, что согласуется с их обособленным таксономическим положением. Бурые водоросли характеризуются наличием уникального для этого типа фукостерина. Многоклеточные зеленые и харовые водоросли по составу стеридов приближаются к высшим растениям [7—9].

Если рассматривать в эволюционном плане картину распределения стеридов у водорослей, то можно отметить, что обособленные и туниковые группы характеризуются своеобразным и однородным составом стеридов. В то же время водоросли, занимающие ключевые позиции в эволюции, например зеленые, отличаются крайним разнообразием стеридов, часто даже в пределах одного рода, как у хлореллы [13, 14]. По составу стеридов виды этого рода можно отнести к трем группам. Для первой из них (*Chl. ellipsoidea*, *Chl. pringsheimii*, *Chl. saccarophylla*) характерно преобладание стеридов с Δ^5 связью в ядре — пориферастерина и дигидробрассикостерина (рис. 2). Во второй группе (*Chl. sorokiniana*, *Chl. vulgaris* и др.) доминируют эргостерин и его производные. Наконец, в третьей группе (*Chl. fusca*, некоторые штаммы *Chl. vulgaris*) больше всего хондрилластерина и его производных с Δ^7 связью. Характер положения двойных связей в мипорных компонентах в значительной степени соответствует такому в преобладающем стериде. Эти особенности структуры стеридов имеют принципиаль-

ное значение при оценке пищевых достоинств биомассы, так как только штаммы, содержащие эргостерин и его производные, т. е. стерины с $\Delta 5$ и 7 в ядре, поставляют предшественники витамина Д.

Изучение стеринов в значительной степени шло по пути определения их качественного состава, и данные по количественному содержанию этих соединений приводятся лишь в немногих работах. Наиболее низким содержанием (0,01—0,1%) отличаются синезеленые, красные и многоклеточные зеленые водоросли (см. таблицу). У большинства изученных видов одноклеточных зеленых водорослей стеринсы составляют 0,1—0,3, а в некоторых случаях 0,5—0,6% от сухой биомассы. Несмотря на ограниченные сведения, можно считать, что пиррофитовые, золотистые и желтозеленые водоросли заслуживают особого внимания в связи с повышенным содержанием в них стеринов, достигающим при определенных условиях нескольких процентов [7, 15].

Обмен стеринов водорослей, как и их метаболизм в целом, отличается большой лабильностью, что необходимо учитывать при параметрическом управлении ростом водорослей. Некоторые примеры влияния условий культивирования на содержание стеринов приведены в таблице. Можно видеть, что свет, температура, условия азотного питания значительно изменяют содержание стеринов. В то же время меняется их качественный состав. Так, при использовании нитратного азота [16] 70% стеринов составляет холестерин, а при выращивании на аммиачном азоте 75% приходится на долю стигмастерина. Приведенные данные не исчерпывают имеющейся информации по варьированию содержания и состава стеринов в зависимости от условий, но все же необходимо отметить, что вопрос этот почти не изучен. Содержание и

Содержание стеринов у водорослей разных типов в зависимости от условий культивирования

Водоросль		Условия культивирования	Стерины, % от сухой биомассы	Литература
Тип	Вид			
Синезеленые	<i>Chlorogloea pritschia</i>	NH ₄	0,13	[16]
		NO ₃	0,01	
Золотистые	<i>Ochromonas danica</i>	35—37°C	1,0—1,5	[17]
		15—18°C	1,9—4,3	
Зеленые	<i>Chlorella emersonii</i>	Свет	0,31	[18]
		Темнота	0,13	

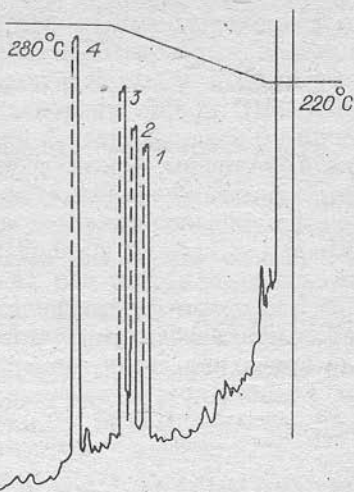
качественный состав стеринов зависят также от фазы роста культуры и стадий клеточного цикла, хотя и эти сведения базируются на единичных работах [19, 20].

Таким образом, водоросли отличаются большим разнообразием стеринов. Возможное число форм стеринов у различных водорослей составляет около 60 наименований, не считая микорных компонентов. Большие различия наблюдаются в количестве стеринов у отдельных таксонов. Высокое содержание стеринов у ряда водорослей заслуживает внимания, так как эта особенность ставит их в один ряд с такими традиционными продуцентами стеринов, как дрожжи [4]. Разнообразие стеринов позволяет выбирать среди водорослей виды и штаммы, содержащие физиологически активные или удобные для дальнейшей трансформации стерины. Так, β -ситостерин, встречающийся у многих водорослей, обладает гипохолестеримическим эффектом. Большое значение имеет содержание эргостерина и его производных как предшественников витамина Д.

Несмотря на довольно большую по объему литературу, многие вопросы обмена стеринов водорослей остаются малоизученными. В частности, открытым остается вопрос о существовании у водорослей стероидных соединений, отличающихся от стеринов и их эфиров. До самого последнего времени считали, что водоросли не содержат даже стерилгликозидов. В настоящее время они обнаружены у многоклеточных зеленых, красных (в том числе и одноклеточных) и бурых водорослей, однако во всех случаях агликаны совпадали по структуре со стеринами данной водоросли [21]. Если не считать довольно неточных данных о наличии кортикостероидов в клетках хлореллы [19] и данных о нахождении стеринов в водной фазе (без их идентификации) [22], нам неизвестны работы, в которых были бы найдены не стерины, а стероиды других классов. Правда, в последние годы появились данные о нахождении у водорослей соединений, родственных стероидам, — терпенов. Обнаружены гоцаноиды у синезеленых водорослей; летучие монотерпены у одноклеточных зеленых; дитерпены и сесквитерпены, часто бромированные, у многоклеточных зеленых, красных и бурых водорослей [4, 7, 23]. Анализ литературы показал, что в большинстве случаев сами условия экстракции и первичной обработки экстракта исключали нахождение форм, отличающихся от стеринов. Между тем оценка водорослей с этой точки зрения имеет существенное значение, так как речь идет о физиологически активных веществах, способных ока-

Рис. 3. ГЖХ разделение «стероидных» соединений, выделенных после кислотного гидролиза.

1 — соединение, не подвергающееся силилированию; 2—4 — силильные производные.



зять положительное действие или вызвать нежелательные последствия. В условиях ЗЭС знание приобретает также то, что различные стероидные соединения, как и ряд других вторичных веществ, могут выступить в роли факторов, влияющих на отношения между организмами, тем более существенных, что организмы эти находятся в очень ограниченном пространстве.

Так, показано, что многие терцены бурых и красных водорослей обладают свойствами детеррентов по отношению к рыбам и некоторым беспозвоночным.

Мы предприняли попытку провести поиск таких стероидных соединений у хлореллы. Экстракцию биомассы хлореллы проводили растворителями различной полярности по схеме, обеспечивающей извлечение стероидов различных классов. Предварительную идентификацию экстрагированных веществ проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя параллельно проявление хроматограмм в нескольких системах растворителей и окрашивание реактивами, выявляющими липиды, стероиды и другие вторичные соединения. В разных фракциях экстракта было обнаружено несколько соединений, дающих характерное для стеринов окрашивание и отличающихся по подвижности от стеринов. Основное внимание привлекло соединение, появляющееся после кислотного гидролиза (без гидролиза в соответствующей фракции «стероидная» окраска обнаруживалась на старте хроматограммы). Очевидно, до гидролиза это соединение входило в состав более сложных веществ, скорее всего гликозидов. Дальнейшее выделение и очистка его позволили провести более детальный анализ методами инфракрасной (ИК) спектроскопии, ТХС, газожидкостной (ГЖХ) и ГЖХ-масс-спектрометрии в свободном виде и в форме силильных производных. Было обнаружено, что это не одно, а несколько соединений, сравнительно близких по полярности и молекулярному весу. Возможно, они обогаще-

ны гидроксильными группами, способны образовывать сильные производные и только в такой форме становятся летучими при температуре 250—300°C. По результатам ГЖХ—МС можно предположить наличие среди них соединений стероидной (рис. 3, пики 2, 4) и терпеноидной (рис. 3, пик 3) природы. Среди веществ, принадлежащих к указанным классам соединений, многие, как уже было отмечено, обладают физиологической активностью. Обнаружение такого рода соединений в хлорелле заслуживает внимания и свидетельствует о том, что как при подборе организмов для ЗЭС, так и при параметрическом изменении условий культивирования необходимо учитывать возможность присутствия или появления соединений стероидной, терпеноидной природы, а также других вторичных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Terpenoids and steroids*. V. 8.—London: Burlington house, 1978.—346 p.
2. Blunden G., El Barouni M. M., Gordon S. M. e. a. Extraction, purification and characterization of Dragendorff positive compounds from some British marine algae.—*Botanica marina*, 1981, v. 24, p. 451—456.
3. Таутс М. И. Фенольные соединения безбактериальной культуры хлореллы и некоторая их характеристика.—*Физиология растений*, 1983, т. 30, вып. 2, с. 332—340.
4. Ахрем А. А., Титов Ю. А. Стероиды и микроорганизмы.—М.: Наука, 1970.—526 с.
5. Хафтман Э. Биохимия стероидов.—М.: Мир, 1972.—175 с.
6. Пассиниченко В. А., Гусева А. Р. О биосинтезе и физиологической роли фитостероидов.—*Успехи биол. химии*, 1973, т. 14, с. 254—278.
7. Nes W. R., McKean M. L. *Biochemistry of steroids and other isoprenoids*.—Univ. Park Press, Baltimore, 1977. 690 p.
8. Patterson G. W. The distribution of sterols in algae.—*Lipids*, 1971, v. 6, N 2, p. 120—127.
9. Goad L. J. The biosynthesis of plant sterols.—In: *Lipids and lipid polymers in higher plants*. Berlin: Springer Verlag, 1977, p. 146—168.
10. Ourisson G., Rohmer M., Anton R. From terpenes to sterols.—In: *Topics in the biochemistry of natural products. Recent advances in phytochemistry*. N. Y.—London: Plenum Press, 1978, p. 131—166.
11. Kōkke W. C. M., Fenical W., Djerassi C. Sterols with unusual nuclear unsaturation from three cultured marine dinoflagellates.—*Phytochemistry*, 1981, v. 20, N 1, p. 127—134.
12. Goad L. J., Holz G. G., Beach D. H. Identification of 24S—24-methylcholesta-5,22-dien-3β-ol as the major sterol of a marine cryptophyte and a marine prymnesiophyte.—*Phytochemistry*, 1983, v. 22, N 2, p. 475—476.
13. Patterson G. W. Sterols of some green algae.—*Comp. Biochem. Physiol.*, 1974, B. 47, N 2, p. 453—457.

14. Holden M. J., Patterson G. W. Taxonomic implication of sterol composition in the genus *Chlorella*.— *Lipids*, 1982, v. 17, N 3, p. 215—218.
15. Lin D. S., Ilais A. M., Connor W. E. e. a. Composition and biosynthesis of sterols in selected marine phytoplankton.— *Lipids*, 1982, v. 17, N 11, p. 818—824.
16. Paoletti C., Pushparaja B., Florenzano G. Unsaponifiable matter of green and blue-green algae lipids as a factor of biochemical differentiation of their biosynthesis.— *Lipids*, 1976, v. 11, N 4, p. 266—271.
17. Betouichim El T., Kohan D., Eckstein B. Influence of temperature on the sterols of *Ochromonas danica*.— *Comp. Biochem. Physiol.*, 1977, v. 58, p. 243—248.
18. Wright D. C., Berg L. R., Patterson G. W. Effect of cultural conditions on the sterols and fatty acid of green algae.— *Phytochemistry*, 1980, v. 19, N 5, p. 783—785.
19. Otsuka H. Content of sterols in *Chlorella* cells at different developmental stages.— *Plant and Cell Physiol.*, 1965, v. 4, N 3, p. 293—297.
20. Janero D. R., Barnett R. Sterol synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* 137 cell-cycle variations.— *Biochim. et Biophys. Acta*, 1982, v. 710, N 2, p. 242—247.
21. Duperon R., Thiersault M., Duperon P. Occurrence of steryl glycosides and acylated steryl glycosides in some marine algae.— *Phytochemistry*, 1983, v. 22, N 2, p. 535—538.
22. Eichenberger W. Steryl glycosides and acylated steryl glycosides.— In: *Lipids and lipid polymers in higher plants*. Berlin: Springer Verlag, 1977, p. 169—182.
23. Aaronson S., Berner T., Dubinsky Z. Microalgae as a source of chemicals and natural products.— In: *Algae Biomass*. Elsevier N. Hol. Biomed. Press. 1980, p. 575—601.

П. Г. Сидоренко, С. П. Жадько, А. Ф. Попова,
И. М. Карнаух, В. П. Ильин

ОБ АДАПТАЦИИ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ И КУЛЬТУР ТКАНЕЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ ГИПОГРАВИТАЦИИ

Проблема изучения адаптационных возможностей растений к различным условиям среды приобретает особое значение в связи с разработкой замкнутых экологических систем. Одной из таких систем является система жизнеобеспечения на космическом корабле, в которой считается перспективным использовать одноклеточные растительные организмы и культуры тканей высших растений. В связи с этим необходимо выяснить адаптационные возможности таких организмов к факторам космического полета.