



Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Биологический факультет

Кафедра микологии и альгологии

Изучение штаммов микроводорослей – продуцентов фукоксантина и оптимизация условий их культивирования

Выполнила студентка II курса магистратуры
Бутаева Галина Булатовна

Научные руководители:

к.б.н. Гололобова Мария Александровна

(кафедра микологии и альгологии, Биофак МГУ имени М.В.Ломоносова)

к.б.н. Кузьмин Денис Владимирович

(ООО «Соликсant»)

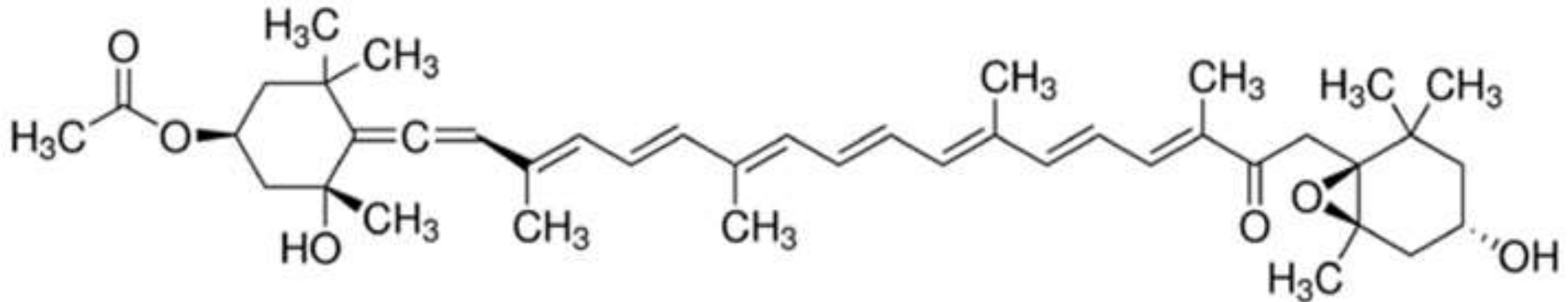
Москва 2019

Актуальность

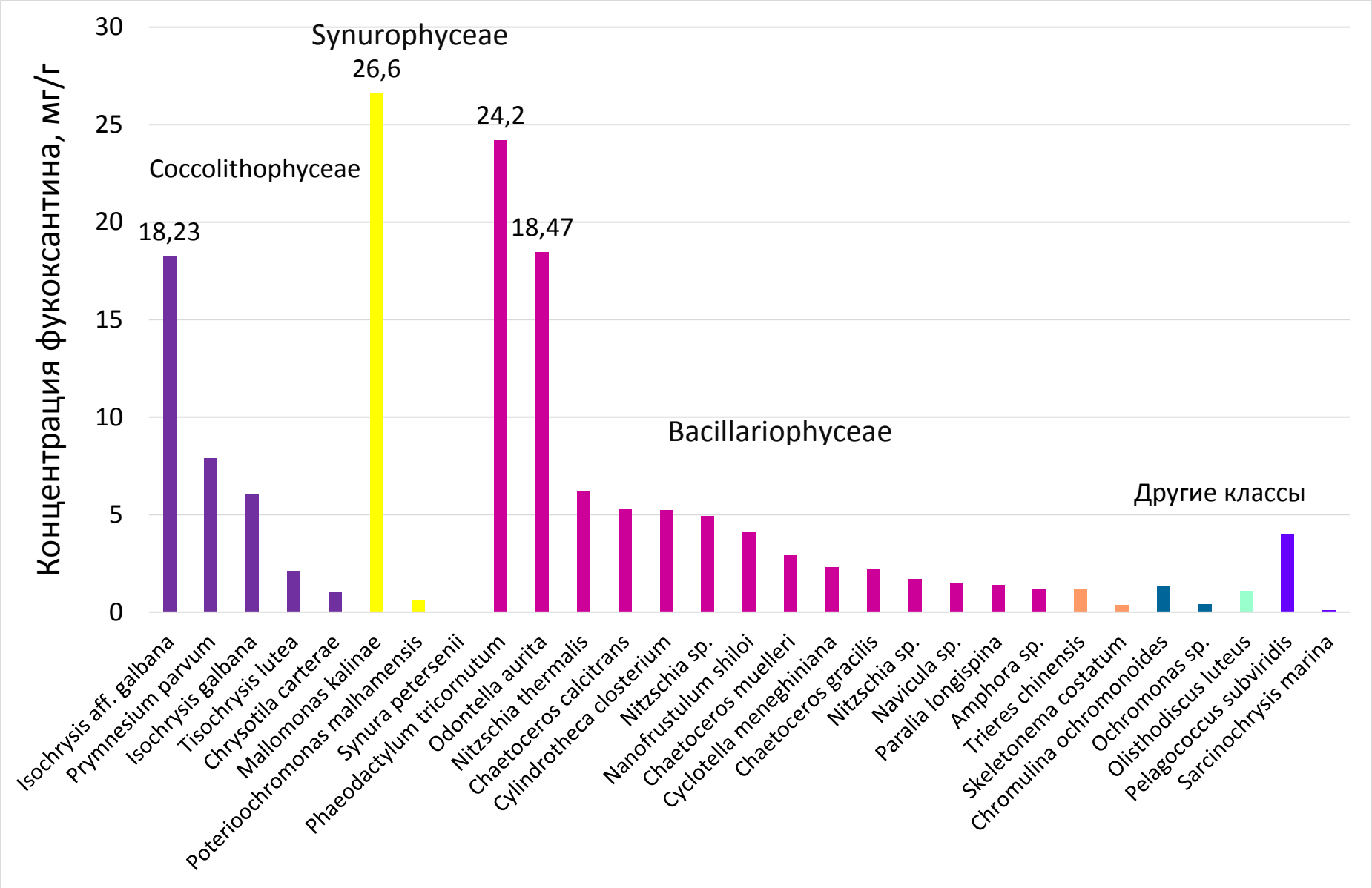
Фукоксантин – пигмент группы каротиноидов, содержащийся в водорослях отделов Ochrophyta, Haptophyta и Dinophyta.

Рассматривается как перспективное средство со следующими активностями:

- Антиоксидантной
- Противовоспалительной
- Антидиабетической
- Противоопухолевой
- Гипотензивной
- Против ожирения



Микроводоросли – перспективные продуценты фукоксантина



Микроводоросли – перспективные продуценты фукоксантина

Вид	Класс	Содержание, мг/г	Ссылка
<i>Mallomonas kalinae</i>	Synurophyceae (Ochrophyta)	26,6 ± 0,5	Petrushkina et al., 2017
<i>Synura petersenii</i>		0,02	Withers et al., 1981
<i>Poterioochromonas malhamensis</i>		0,6	
<i>Olisthodiscus luteus</i>	Raphidophyceae (Ochrophyta)	1,07	
<i>Sarcinochrysis marina</i>	Pelagophyceae (Ochrophyta)	0,09	
<i>Ochromonas</i> sp.	Chrysophyceae (Ochrophyta)	0,41	
<i>Chromulina ochromonoides</i>		1,32	
<i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i>	Coccolithophyceae (Haptophyta)	18,23 ± 0,54	Kim et al., 2012
<i>Tisochrysis lutea</i>		2,05 ± 0,07	Ishika et al., 2017
<i>Chrysotila carterae</i>		1,04 ± 0,01	
<i>Karenia brevis</i>	Dinophyceae (Dinophyta)	+	Ornolfsdottir et al., 2003

Вид	Класс	Содержание, мг/г	Ссылка
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	Bacillariophyceae (Ochrophyta)	2,3 ± 0,03	Petrushkina et al., 2017
<i>Paralia longispina</i>		1,4 ± 0,1	
<i>Odontella aurita</i>		18,47	Xia et al., 2013
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		24,2 ± 2,2	Eilers et al., 2016
<i>Chaetoceros muelleri</i>		2,92 ± 0,03	Ishika et al., 2017
<i>Navicula</i> sp.		1,49 ± 0,13	
<i>Amphora</i> sp.		1,21 ± 0,18	
<i>Nanofrustulum shiloi</i>		4,07	Süha Şahin et al., 2017
<i>Nitzschia</i> sp.		1,7	
<i>Nitzschia thermalis</i>		6,2	
<i>Chaetoceros calcitrans</i>		5,33 ± 0,01	Foo et al., 2015
<i>Nitzschia</i> sp.		4,92 ± 0,11	Kim et al., 2012
<i>Chaetoceros gracilis</i>		2,24 ± 0,01	
<i>Cylindrotheca closterium</i>		5,23	Pasquet et al., 2011
<i>Trieres chinensis</i>	Mediophyceae (Ochrophyta)	1,18	Foo et al., 2017
<i>Skeletonema costatum</i>		0,36	

Цель и задачи исследования

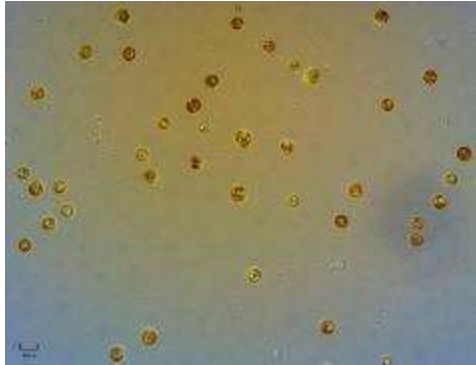
Цель – изучить штаммы микроводорослей — перспективных продуцентов фукоксантина и оптимизировать условия их культивирования.

Задачи:

1. Проанализировать данные литературы, связанные с фукоксантином и его продуцентами;
2. Исследовать физиологические свойства штаммов микроводорослей из коллекции ООО «Соликсанти»;
3. Проанализировать содержание фукоксантина у данных штаммов;
4. Отобрать штаммы с наибольшим содержанием фукоксантина;
5. Разработать регламент культивирования наиболее перспективных продуцентов фукоксантина в полупромышленных условиях (в фотобиореакторе).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

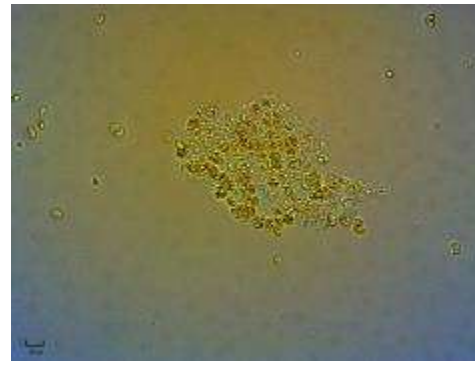
19 штаммов водорослей — возможных продуцентов фукоксантина



SBV-110
Crucioplacolithus sp.



SBV-13
Mallomonas kalinae



SBV-24
Halamphora sp.



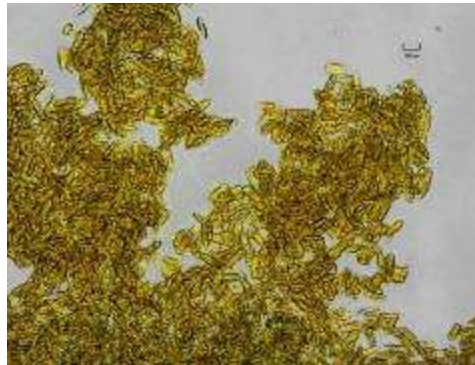
SBV-130
Amphora sp.



SBV-136
Amphora sp.



SBV-127
Karayevia sp.



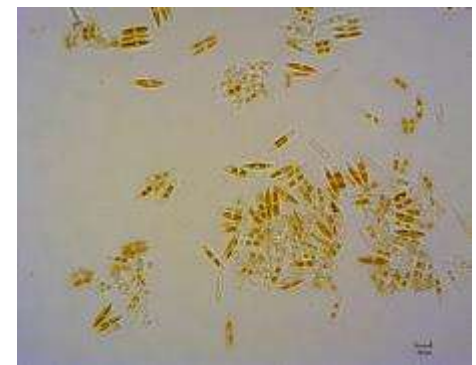
SBV-131
Navicula sp.



SBV-133
Nitzschia sp.



SBV-155
Nitzschia sp.



SBV-156
Nitzschia sp.

Культивирование штаммов

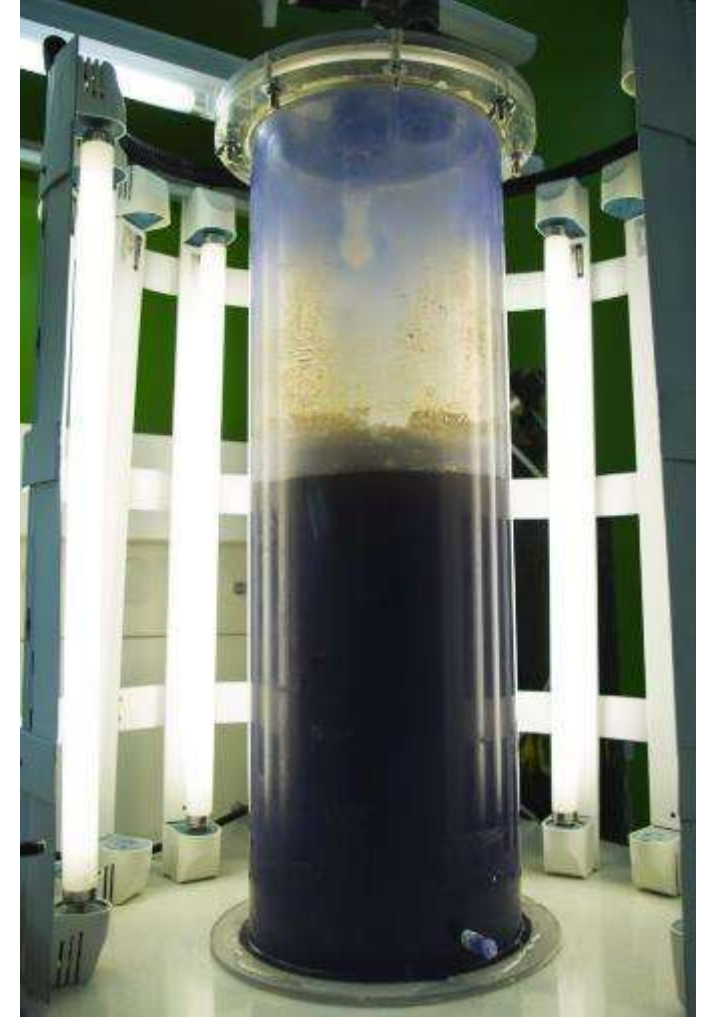
Лабораторный инкубаторный шейкер Multitron Infors

- Постоянное перемешивание: 150 об/мин
- Температура: 25°C
- Освещенность: 100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$
- Фотопериод: 16 «день» / 8 «ночь»
- CO_2 в поступающей смеси: 5%
- Среда: F/2 $\times$ 10, WC $\times$ 10, Громова №6
- Длительность культивирования: 14 дней



Этапы культивирования в вертикальном колончатом фотобиореакторе

- Масштабирование биомассы
- Подготовка активного инокулята
- Засев колончатого фотобиореактора
- Контроль оптической плотности и морфологии в период культивирования
- Сбор биомассы в проточной центрифуге CERA LE (Biorus)
- Замораживание биомассы при -80°C в низкотемпературном холодильнике MDF-U4186S (Sanyo)
- Лиофилизация биомассы в лиофильной сушке FreeZone 2.5 L, Labconco
- Хранение биомассы при -80°C



Определение концентрации NO_3^- и PO_4^{3-} в среде

Концентрацию **нитрат-иона** (NO_3^-) в среде определяли **спектрофотометрически** по поглощению в ультрафиолетовой области по методике Hach Company, 2007

Концентрацию **ортофосфат-иона** (PO_4^{3-}) в среде определяли **фотоколориметрически** по методике Hach Company, 2007



Анализ содержания фукоксантина

Определение **фукоксантина** проводилось методом **высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)** (на базе лаборатории химии метаболических путей ИБХ РАН)



Хроматограмма ацетонитрильного экстракта
биомассы штамма SBV-133 *Nitzschia* sp.



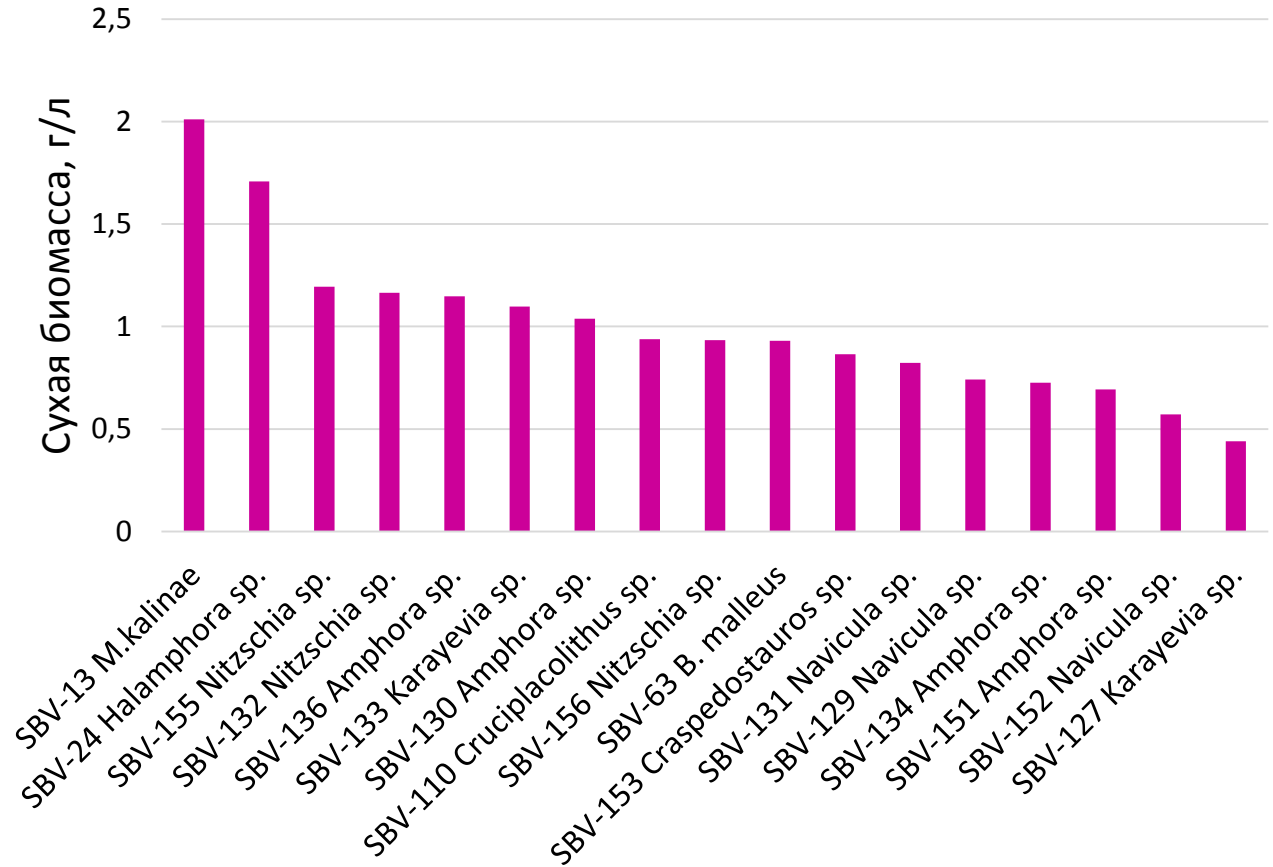
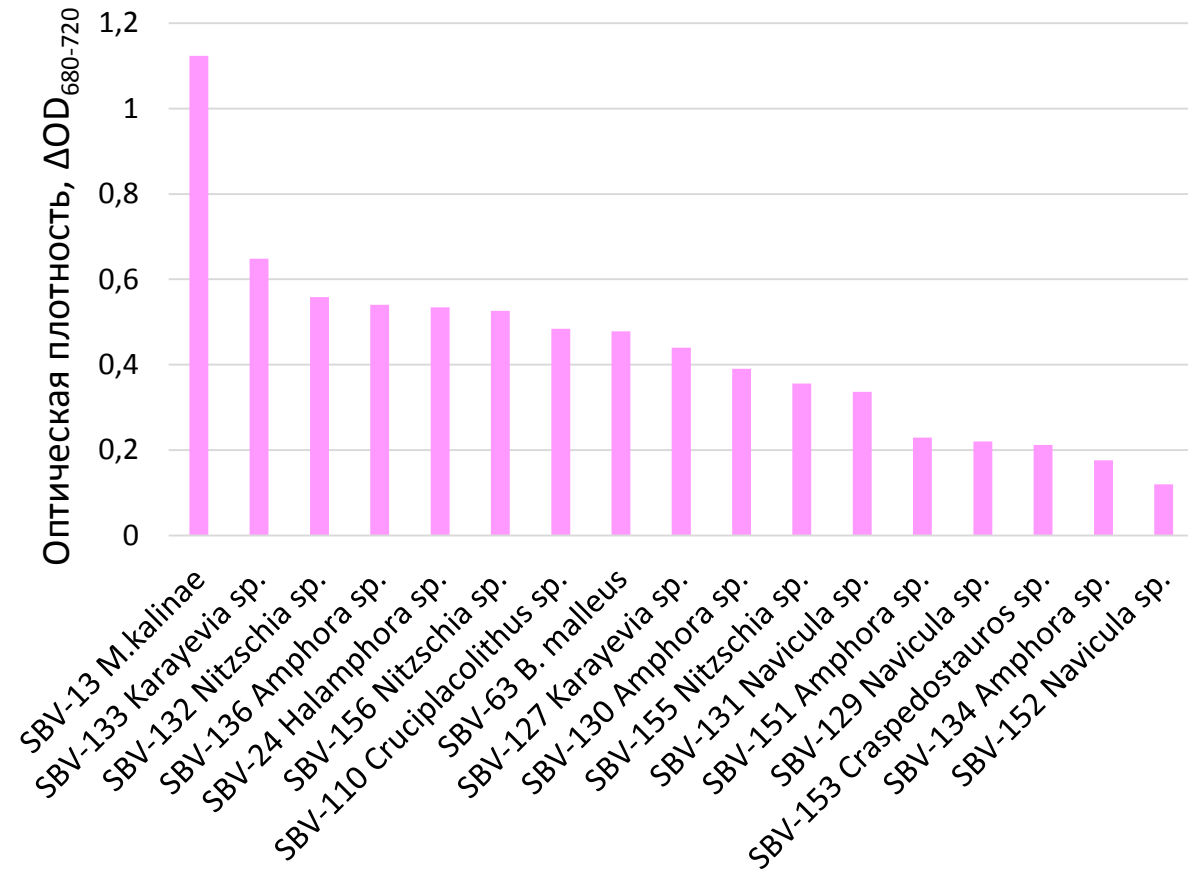
Определение биохимического состава биомассы

- Концентрацию **белков** определяли с **бицинхониновым реагентом** (BCA Protein Assay, Pierce) по Smith et al., 1985
- Концентрацию **углеводов** в биомассе определяли **3-метил-2-бензотиазолин гидразоновым (MBTH) методом** (по Van Wychen, Laurens, 2015) с модификациями
- Концентрацию **липидов** определяли **гравиметрическим методом** (экстракция гексаном)

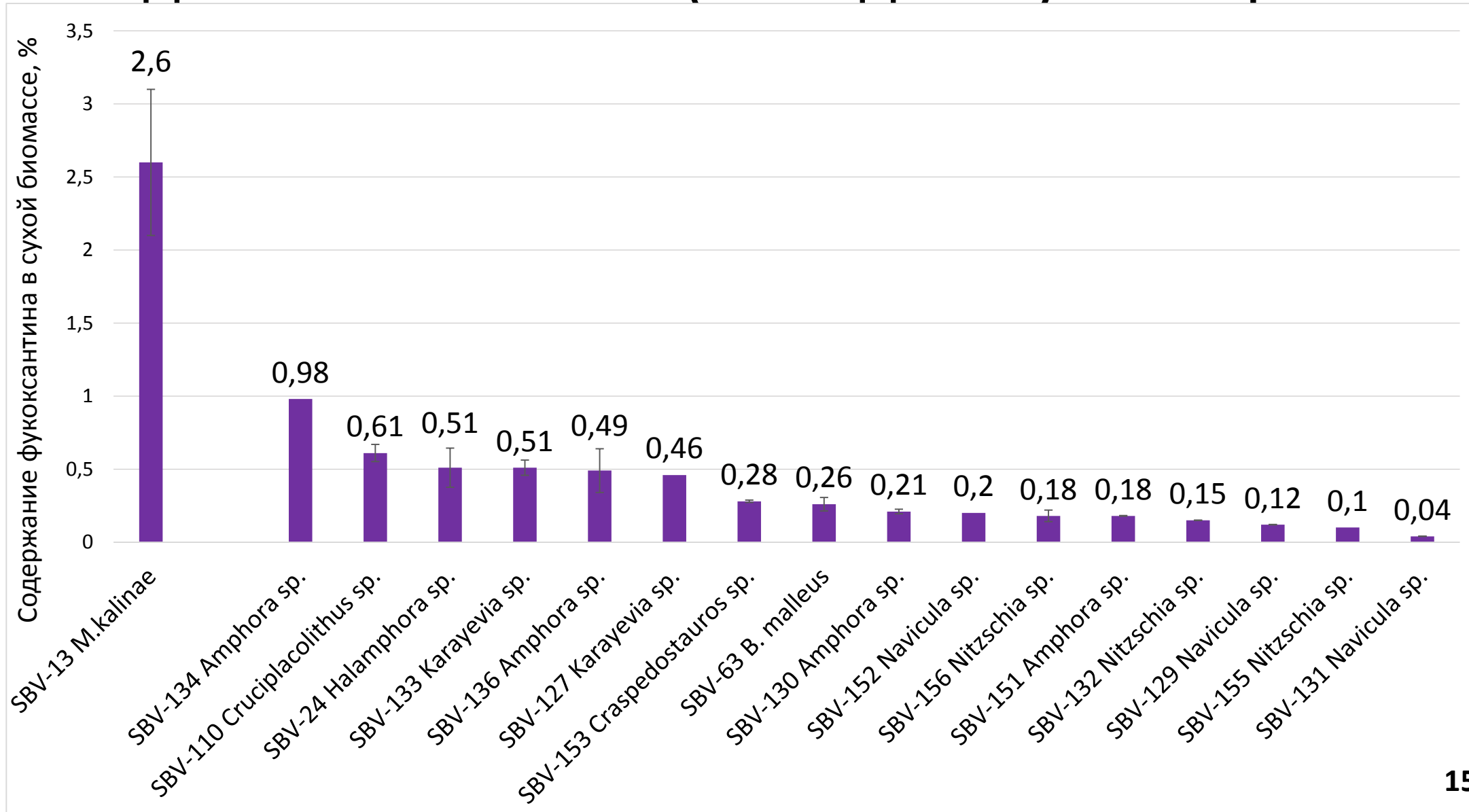


РЕЗУЛЬТАТЫ

Оптическая плотность и содержание сухой биомассы исследованных штаммов (на 14 день культивирования)



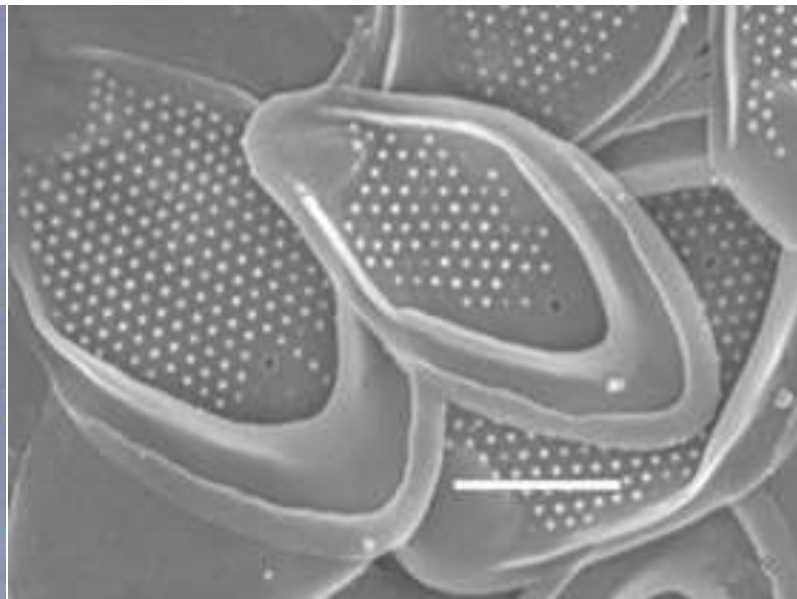
Содержание фукоксантина (%) в сухой биомассе исследованных штаммов (на 14 день культивирования)



Mallomonas kalinae Rezáčova 2006 (штамм SBV-13) – продуцент с
максимальным известным содержанием фукоксантина –
 $26,6 \pm 0,5$ мг/г (Petrushkina et al., 2017)



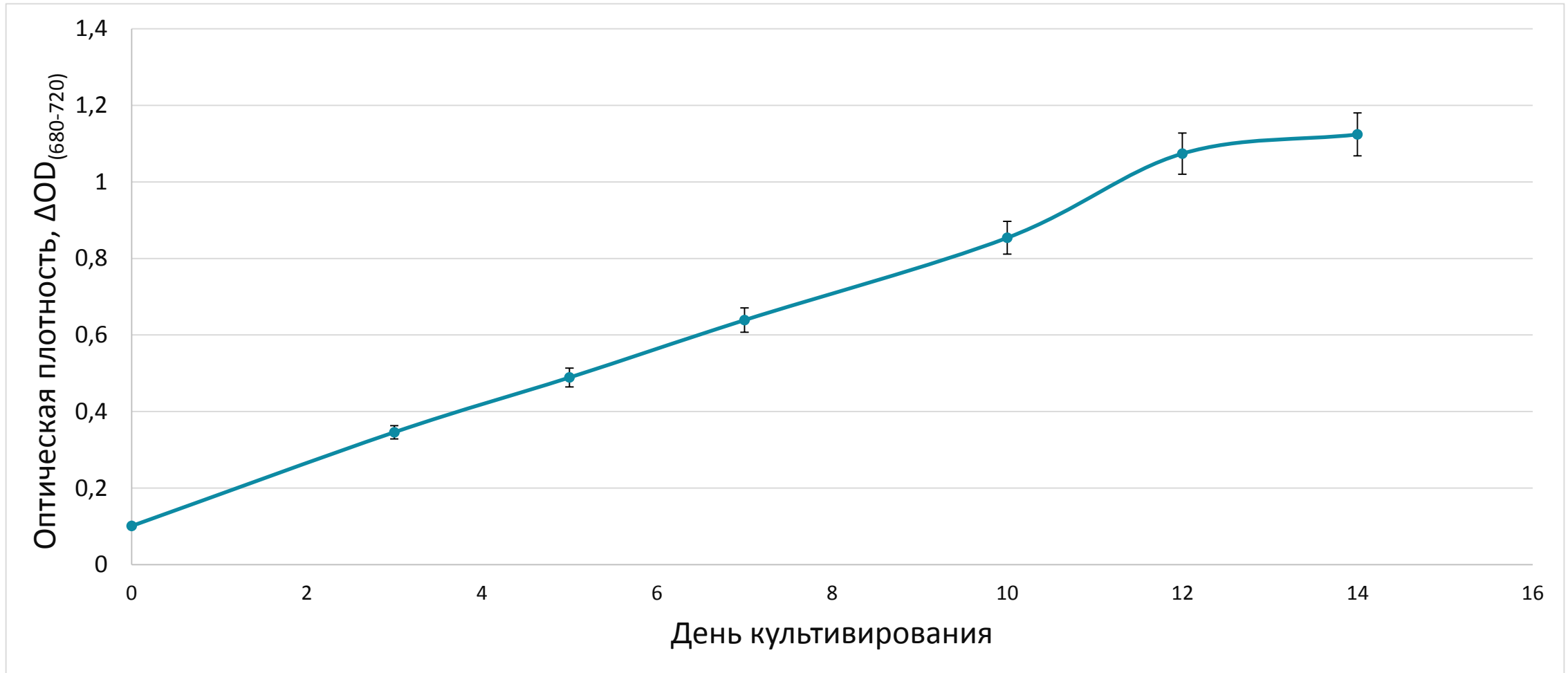
вегетативная клетка (СМ)



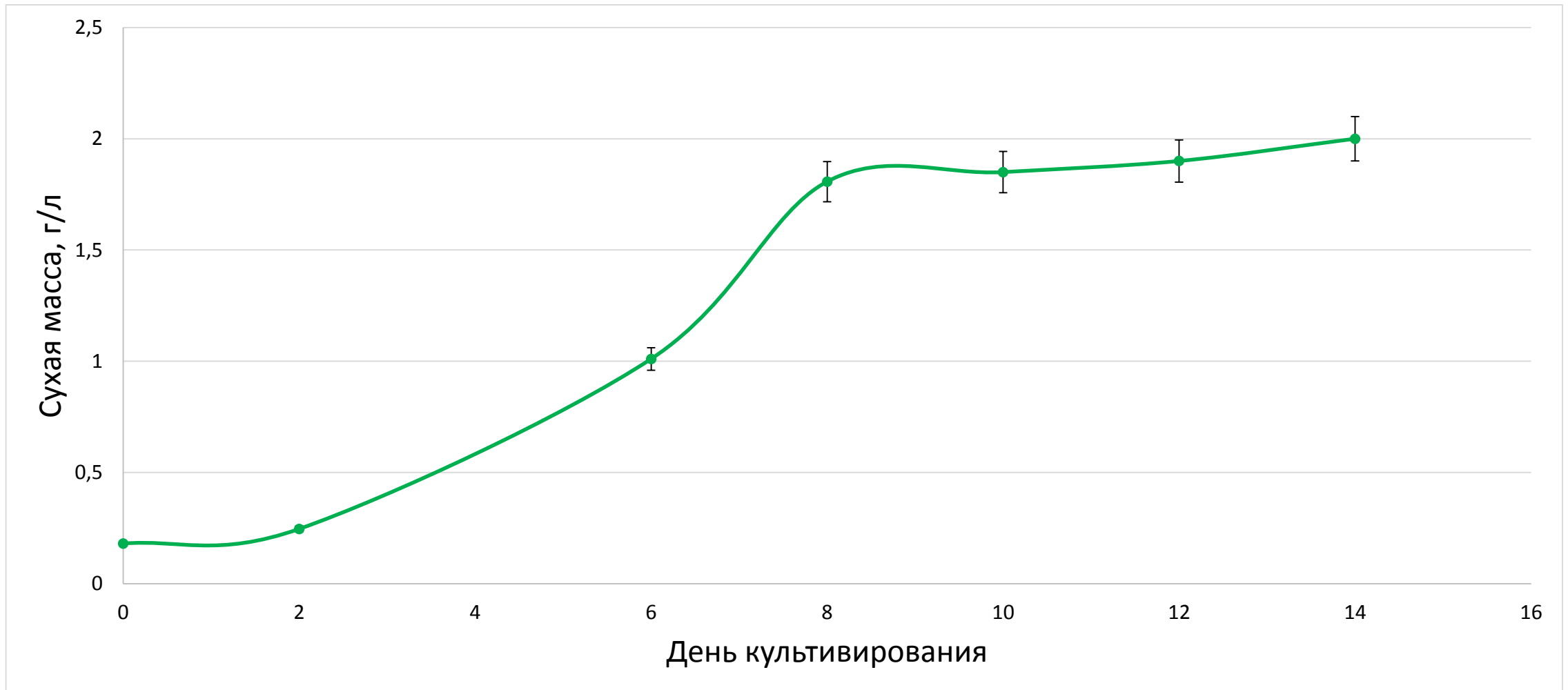
отдельные чешуйки (СЭМ)

Отдел **Ochrophyta**
Класс **Synurophyceae**
Порядок **Synurales**
Семейство **Mallomonadaceae**
(по: Guiry, Guiry, 2019)

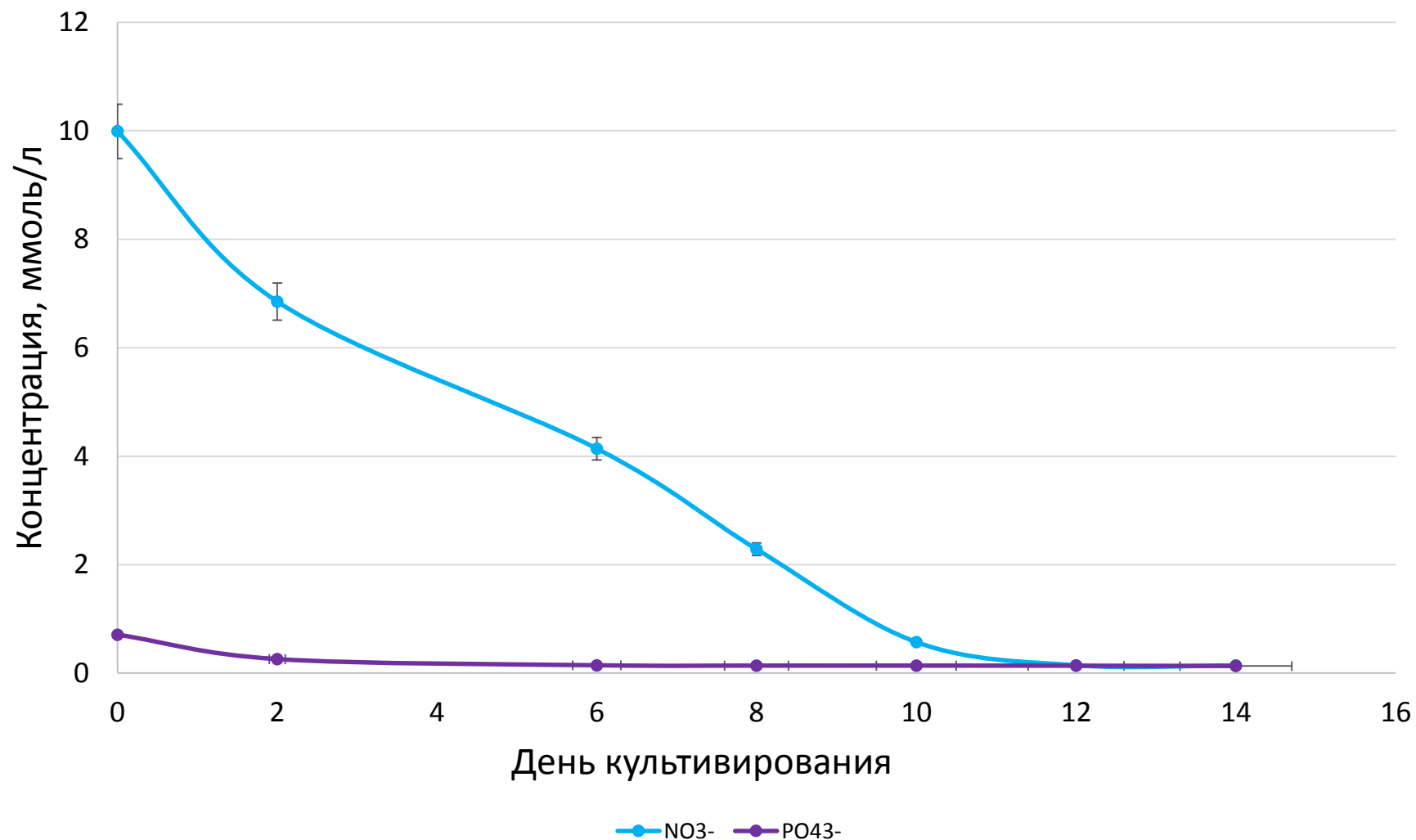
Кривая роста штамма SBV-13 *Mallomonas kalinae*, построенная по оптической плотности



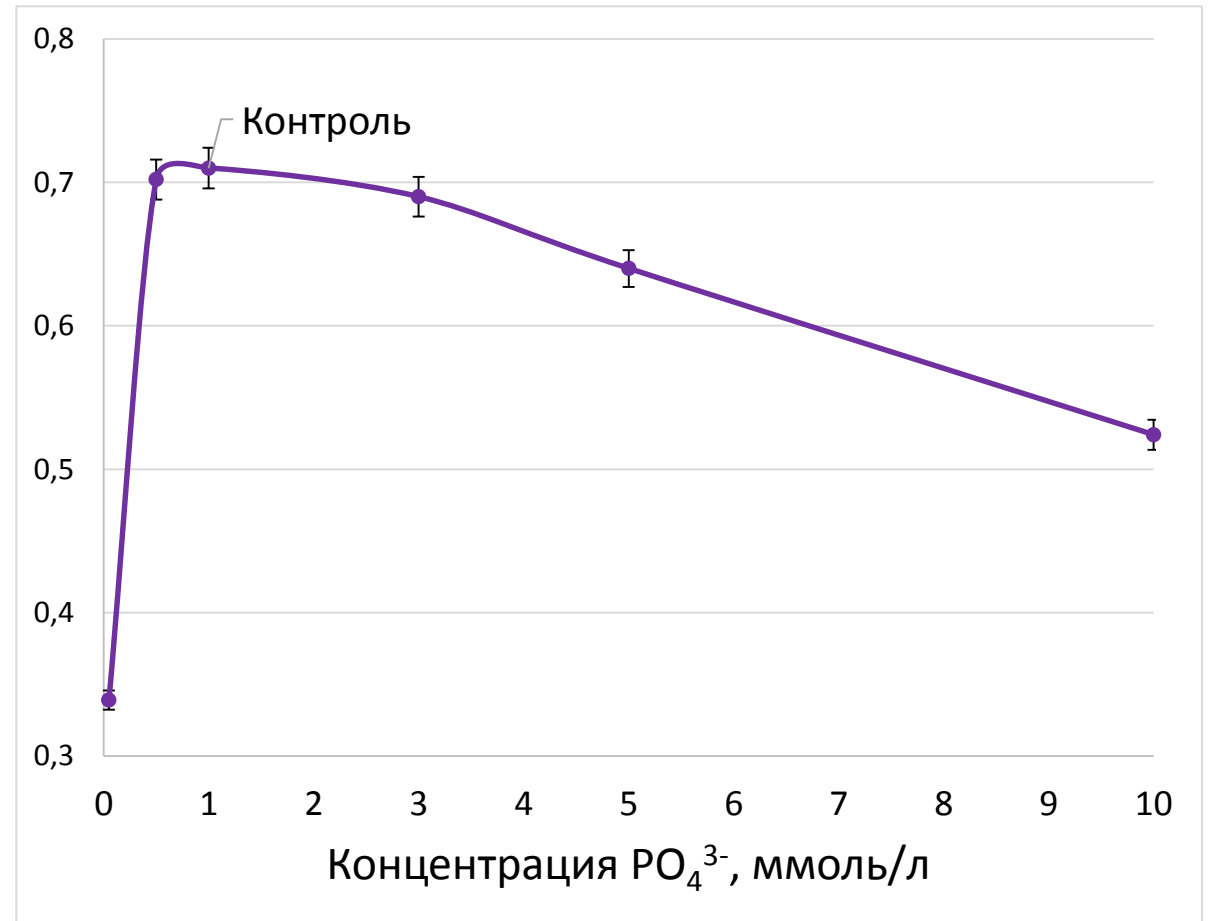
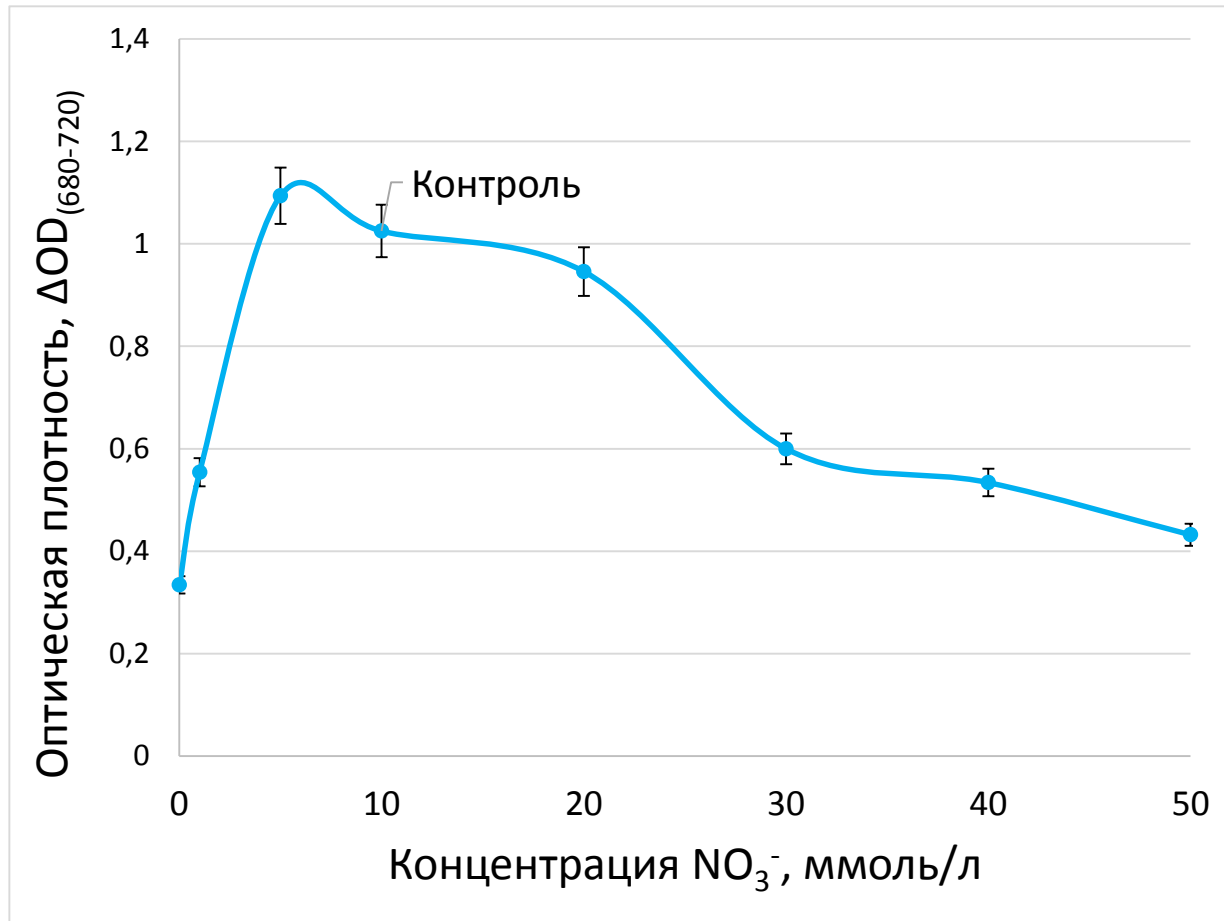
Кривая роста штамма SBV-13 *Mallomonas kalinae*, построенная по сухой массе



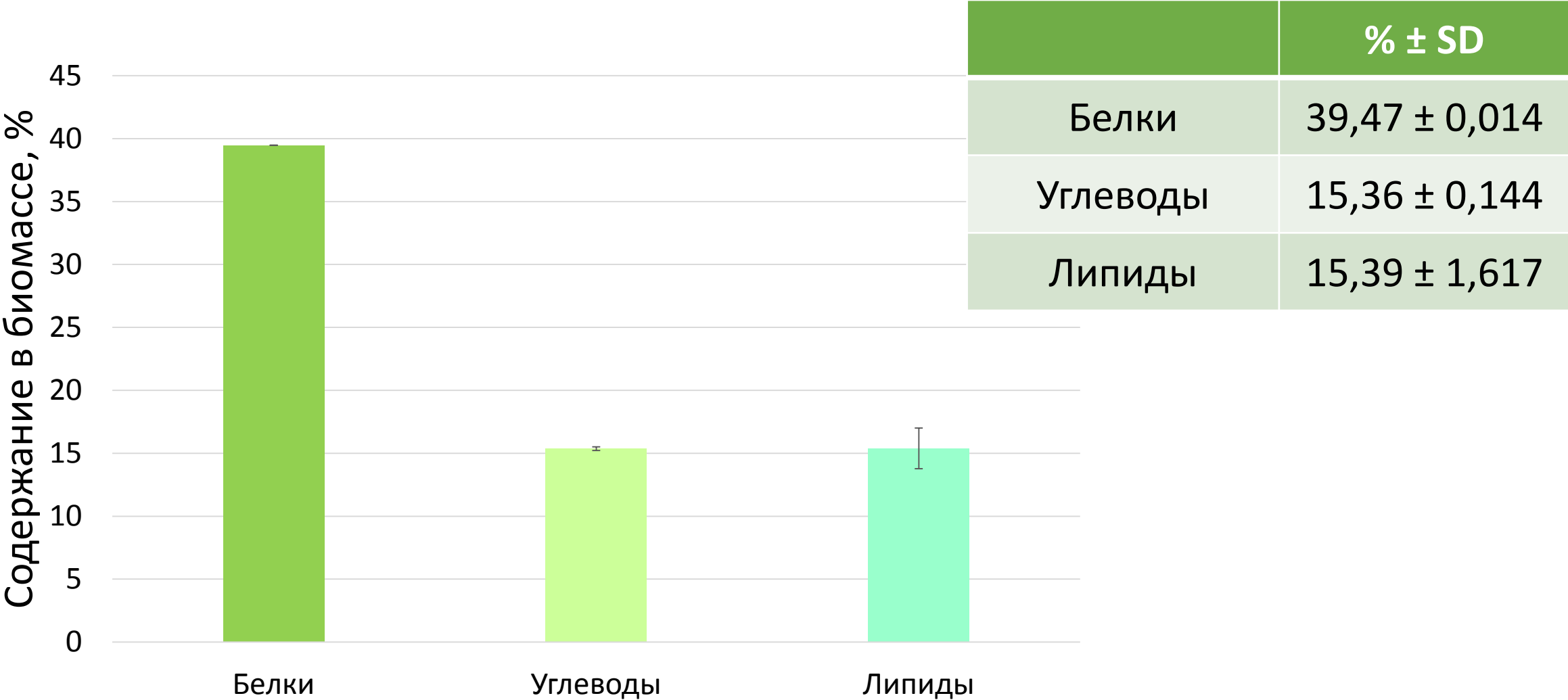
Поглощение NO_3^- и PO_4^{3-} штаммом SBV-13 *Mallomonas kalinae*



Оптическая плотность SBV-13 *Mallomonas kalinae* при различных концентрациях NO_3^- и PO_4^{3-} в среде (на 14 день культивирования)



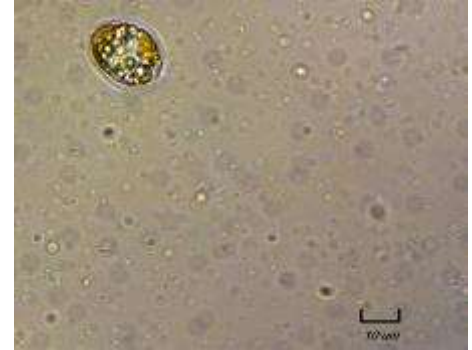
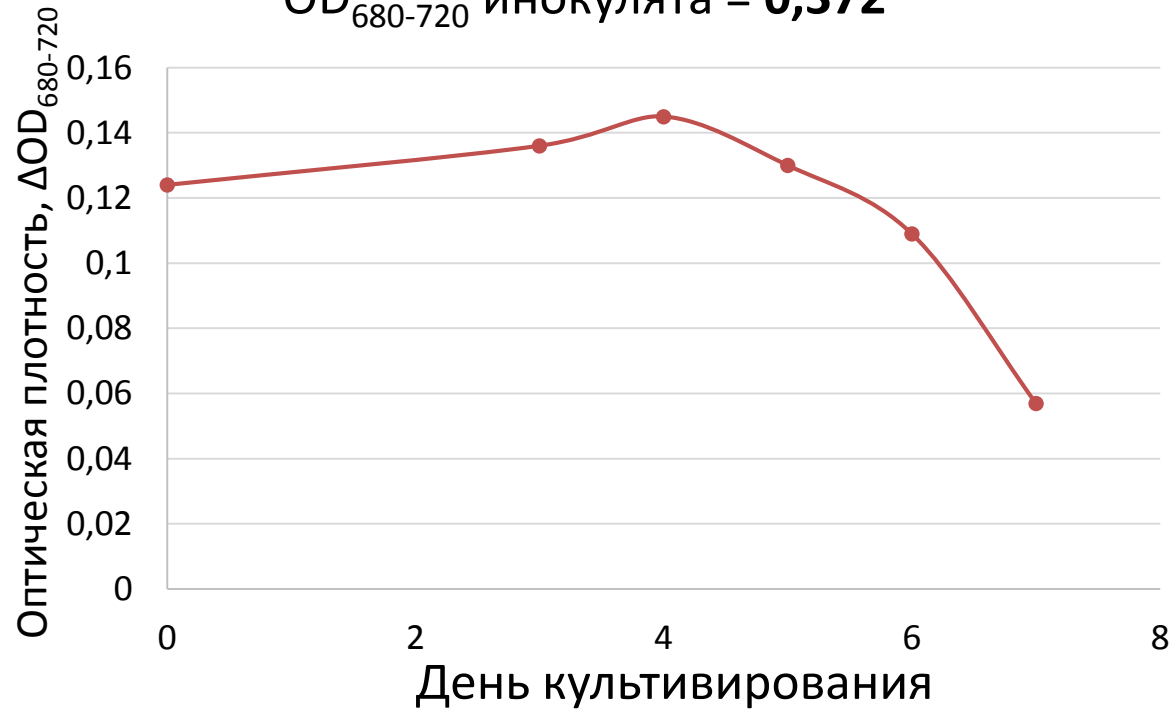
Содержание белков, углеводов и липидов в сухой биомассе SBV-13 *Mallomonas kalinae* (на 14 день культивирования)



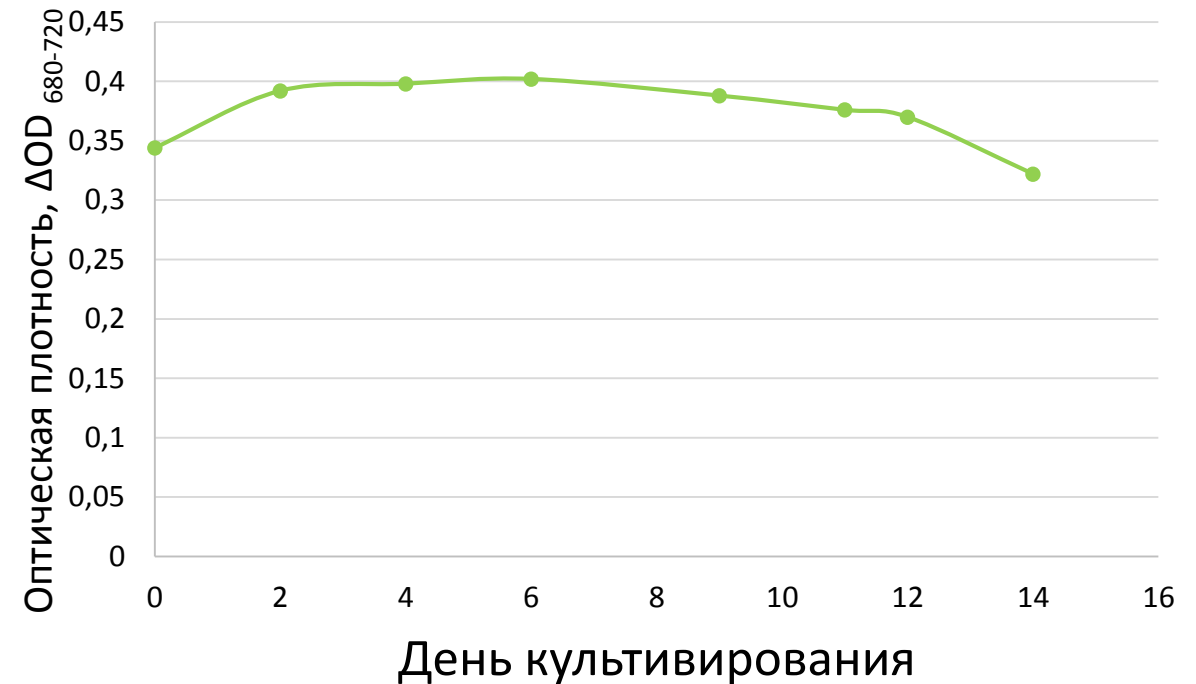
Оптическая плотность SBV-13 *Mallomonas kalinae* при культивировании в колончатом фотобиореакторе



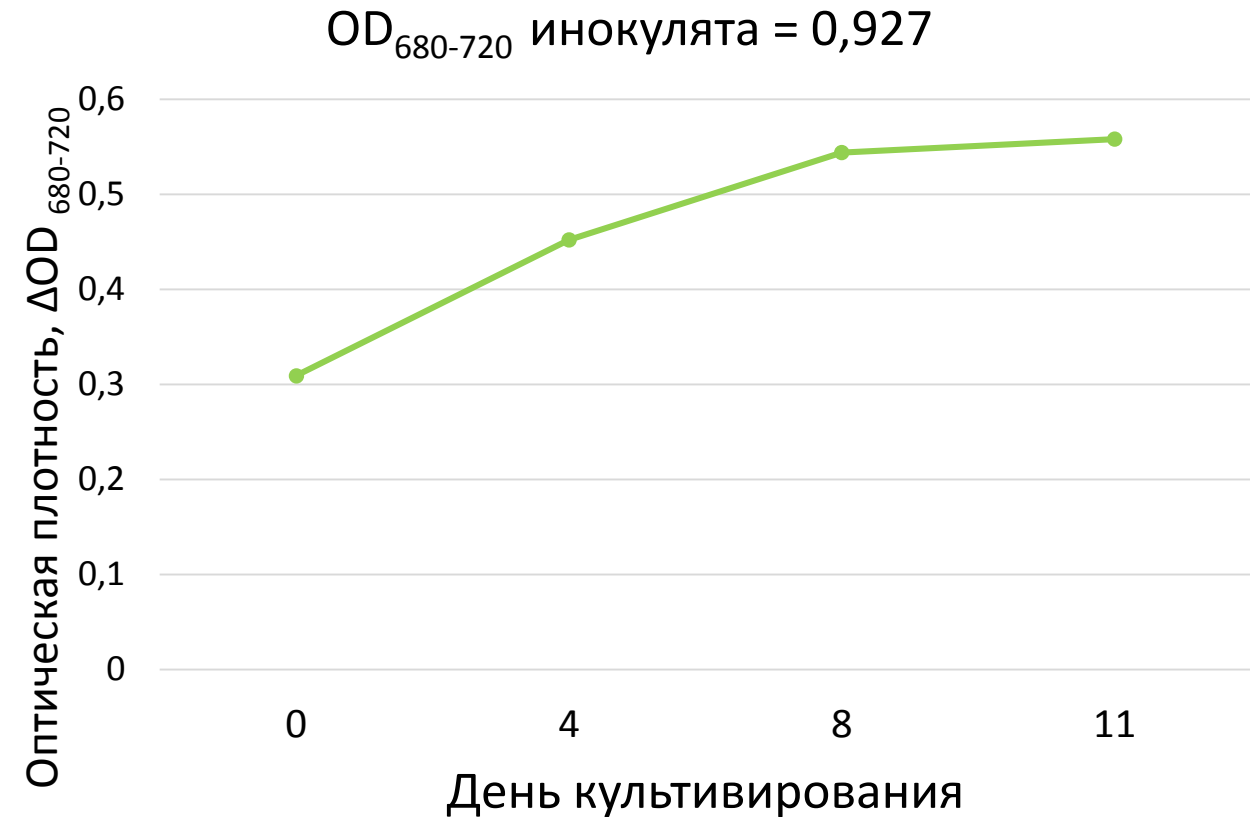
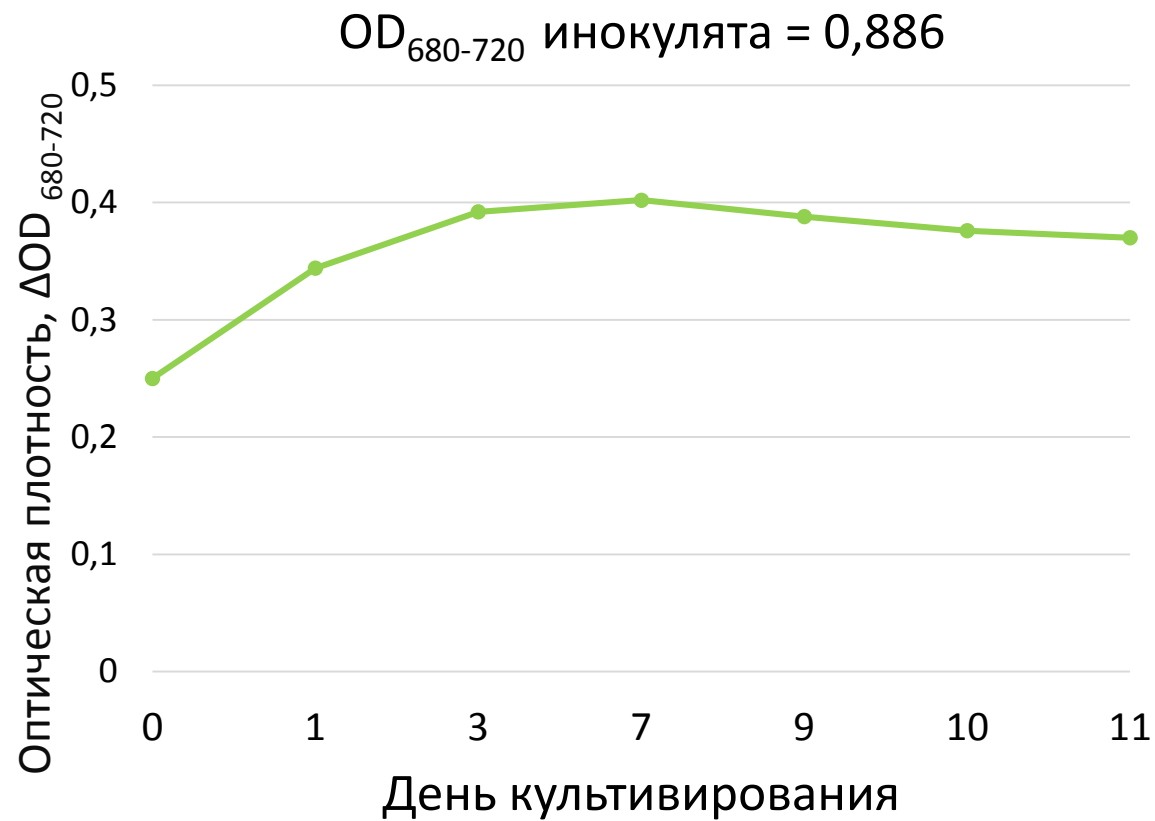
OD₆₈₀₋₇₂₀ инокулята = **0,372**



OD₆₈₀₋₇₂₀ инокулята = **0,824**



Оптическая плотность SBV-13 *Mallomonas kalinae* при культивировании в колончатом фотобиореакторе



Выводы

1. Анализ литературных данных показал, что содержание фукоксантина варьирует у представителей различных систематических групп водорослей; наиболее перспективные продуценты фукоксантина среди микроводорослей встречаются в классах Coccolithophyceae, Synurophyceae и Bacillariophyceae.
2. На основании изучения физиологических характеристик 19 штаммов и анализа содержания в них фукоксантина был отобран наиболее перспективный продуцент – *Mallomonas kalinae* (штамм SBV-13).
3. При оптимизации условий культивирования установлено, что лимитирующим фактором для штамма SBV-13 *M. kalinae* является концентрация NO_3^- в среде.
4. Высокое содержание белков в биомассе штамма SBV-13 *M. kalinae* (39,47%) представляет дополнительный интерес к нему как к продуценту не только фукоксантина, но и белка.
5. Установлено, что одним из ключевых параметров для культивирования штамма SBV-13 *M. kalinae* в фотобиореакторе является исходная плотность инокулята.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Благодарности

Хотелось бы выразить благодарность:

- своим научным руководителям – **Марии Александровне Гололобовой** и **Денису Владимировичу Кузьмину**,
- рецензенту – **Максиму Сергеевичу Куликовскому**,
- сотрудникам ООО «Соликсant» – **Борису Сорокину** и **Марии Петрушкиной**,
- а также **Зоригто Баировичу Намсараеву**, **Евгению Сергеевич Гусеву** и **Ольге Викторовне Анисимовой**,
- своим одноклассникам – **Александре Голубевой**, **Никите Бибикову** и **Татьяне Бувеч**,
- всем **сотрудникам кафедры** микологии и альгологии.

Литература

1. Eilers U., Bikoulis A., Breitenbach J., Büchel C., Sandmann G. Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum* //Journal of applied phycology. – 2016. – V. 28. – №. 1. – P. 123-129.
2. Foo S. C., Yusoff F. M., Ismail M., Basri M., Chan K. W., Khong N. M., Yau S. K. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968 //Algal Research. – 2015. – V. 12. – P. 26-32.
3. Ishika T., Moheimani N. R., Bahri P. A., Laird D. W., Blair S., Parlevliet D. Halo-adapted microalgae for fucoxanthin production: Effect of incremental increase in salinity //Algal Research. – 2017. – V. 28. – P. 66-73.
4. Kim S. M., Kang S. W., Kwon O. N., Chung D., Pan, C. H. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis* aff. *galbana*: Characterization of extraction for commercial application //Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. – 2012. – V. 55. – №. 4. – P. 477-483.
5. Şahin M. S., Demirel Z., Alkan C., Dalay M. C. Effects of different light intensities on growth rate and fucoxanthin concentration of diatom species. 11th Central European Diatom meeting. – 2017. – P. 30-31.
6. Pasquet V., Chérouvrier J. R., Farhat F., Thiéry V., Piot J. M., Bérard J. B., Picot L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction //Process Biochemistry. – 2011. – V. 46. – №. 1. – P. 59-67.
7. Petrushkina M., Gusev E., Sorokin B., Zotko N., Mamaeva A., Filimonova A., Kulikovskiy., Maltsev Y., Yampolsky I., Guglya E., Vinokurov V., Namsaraev Z., Kuzmin D. Fucoxanthin production by heterokont microalgae //Algal Research. – 2017. – V. 24. – P. 387-393.
8. Withers N. W., Fiksdahl A., Tuttle R.C., Liaaen-Jensen S. Carotenoids of the Chrysophyceae //Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. – 1981. – V. 68. – №. 2. – P. 345-349.
9. Xia S., Wang K., Wan L., Li A., Hu Q., Zhang C. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita* //Marine drugs. – 2013. – V. 11. – №. 7. – P. 2667-2681.