Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and theoretical articles•

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 2(70), 2018

ԿԱՆԱՉ ՄԻԿՐՈՋՐԻՄՈՒՌՆԵՐԻՑ ԿԱՐՈՏԻՆՈԻԴՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՕՐԻՆԱՉԱՓՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Լ.Հ. ՍԱՂԱԹԵԼՅԱՆ, Ա.Ռ. ՍԱՐԳՍՅԱՆ, Վ.Բ. ԳՈԳԻՆՅԱՆ

ՀՀԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ,
Այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիա
sn.lusi91@gmail.com

Ուսումնասիրվել են տարբեր սթրես գործոնների ազդեցության պարագայում Հայաստանի ջրերից անջատված միաբջիջ կանաչ միկրոջրիմուռների կողմից կարոտինոիդների սինթեզի օրինաչափությունները:

Որոշվել է միկրոջրիմուռների կողմից սինթեզվող կարոտինոիդների քանակական և որակական կազմը: Ցույց է տրվել, որ կուլտուրաների աճեցման պայմաններում լուսավորության ինտենսիվության մեծացման դեպքում բոլոր կուլտուրաների մոտ նկատվում է ինչպես ընդհանուր կարոտինոիդների, այնպես էլ քլորոֆիլ *a* և *b*-ի բարձր քանակների կենսասինթեզ:

Միկրոջրիմուռներ – կարոտինոիդներ – կենսասինթեզ

Изучали синтез каротиноидных пигментов новыми штаммами культур зеленых одноклеточных микроводорослей, выделенных из вод Армении в условиях воздействия различных внешних стресс-факторов. Определены качественный и количественный составы синтезированных каротиноидов. Установлено, что при культивировании микроводорослей в условиях интенсивного освещения наблюдается наиболее высокий уровень синтеза как общего количества пигментов, так и хлорофилла *a* и *b*.

Микроводоросли – каротиноиды – биосинтез

The investigation is devoted to the study of the synthesis of carotenoid pigments by new strains of cultures of green unicellular microalgae isolated from Armenian aquatic habitats under the influence of various external stress factors. Qualitative and quantitative compositions of synthesized carotenoids were determined. It has been established that the highest level of synthesis of the total amount of pigments and chlorophyll a and b was observed in the cultivation of microalgae under intensive illumination conditions.

Microalgae – carotenoids – biosynthesis

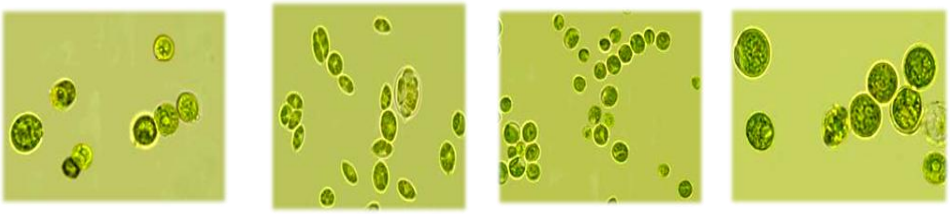
Միկրոջրիմուռները կենսոլորտի գրեթե բոլոր շերտերում տարածված միաբջիջ օրգանիզմներ են: Նրանք հանդիսանում են մի շարք արժեքավոր նյութերի՝ ճարպաթթուների, սպիտակուցների, կարոտինոիդների և այլ կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների (ԿԱՄ) արտադրիչներ: Սինթեզվող ԿԱՄ-երի շարքում առավել արժեքավոր բնական միացություններ են հանդիսանում կարոտինոիդները, որոնք մարդու և կենդանիների օրգանիզմում կարևոր դեր են կատարում օրգանիզմի բնականոն գործունեության համար: Դրանք որպես արժեքավոր հակաօքսիդանտներ, ֆոտոպրոտեկտորներ, իմունախթանիչներ և նախավիտամիններ կարգավորում են օրգանիզմի նյարդային, տեսողական, սիրտ-անոթային և մի շարք այլ համակարգերի աշխատանքը [7]: Սակայն դրանք մարդու և կենդանիների օրգանիզմներում բավարար քանակի չեն արտադրվում և դրանց անհրաժեշտ պաշարը լրացվում է սննդի միջոցով (որոշ բանջարեղեններ, մրգեր, ձկան միս և այլն) [3]:

Գոյություն ունեն կարոտինոիդների ստացման ինչպես կենսատեխնոլոգիական, այնպես էլ քիմիական եղանակներ: Սակայն կառուցվածքի բարդության և բազմազանության պատճառով արտադրական պայմաններում դրանց քիմիական ստացումը բազմափուլ է և մեծ դժվարություններ է ներկայացնում, ինչը բերում է շուկայական գնի բարձրացմանը: Ուստի, արդիական է մնում բնական կարոտինոիդների արդյունավետ արտադրիչների որոնումը, որոնք վերջնանյութի շուկայական արժեքի տեսանկյունից կլինեն մատչելի [2]:

Հայտնի է, որ անբարենպաստ պայմանների՝ աղայնության, pH-ի և լուսավորության կտրուկ փոփոխության դեպքում միկրոջրիմուռների որոշ տեսակներ, որպես բջջի պաշտպանողական ռեակցիա, սկսում են արտադրել կարոտինոիդներ [4]:

Աշխատանքի նպատակն էր ուսումնասիրել Հայաստանի ջրային ավազաններում առավել տարածված որոշ միկրոջրիմուռների կարոտինոիդներ սինթեզելու ունակությունը և օպտիմալ պայմանների մշակումը, որը կապահովվի կարոտինոիդների կենսասինթեզի առավել բարձր ելք:

Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքի համար ընտրվել են Հայաստանի քաղցրահամ ջրերից անջատված *Chlorella emersonii, Acutodesmus obliquus, Chlorococcum* sp., *Coelastrella terrestris* տեսակների միկրոջրիմուռները: Դրանք ընդգրկված են այլընտրանքային էներգիայի աղբյուրների լաբորատորիայի միկրոջրիմուռների հավաքածուում և կարող են հանդիսանալ կարոտինոիդների պոտենցիալ արտադրիչներ (նկ.1):



Նկ. 1. Աշխատանքում օգտագործված կանաչ միաբջիջ միկրոջրիմուռների տեսակներ

Հայաստանի ջրերից միկրոջրիմուռների անջատման, մաքրման և պահպանման համար օգտագործվել է Տամիայի սննդամիջավայրը (հիմնական լուծույթ (գ/լ)՝ KNO_3 – 2,0; KH_2PO_4 – 0,3; $MgSO_4$ x $7H_2O$ – 0,3; միկրոտարրերի լուծույթ (գ/լ)՝ $FeSO_4$ x $7H_2O$ – 5,0; $Ca(NO_3)_2$ – 10,0; $Co(NO_3)_2$ x $6H_2O$ – 0,02; $CuSO_4$ x $5H_2O$ - 0,01; $ZnSO_4$ x $7H_2O$ – 0,04; $MnSO_4$ – 1,0; H_3BO_3 - 0,6; $(NH_4)6M_{07}O_{24}$ -1,0; EDTA – 5,0 -10,0; pH-ը – 8,5-9):

Միկրոջրիմուռների կողմից կարոտինոիդների սինթեզի համար կուլտուրաներն աճեցվել են երկփուլ համակարգով՝ տարբեր պայմաններում [4]: Առաջին (կանաչ) փուլում միկրոջրիմուռները կուլտիվացվել են 2 լիտրանոց կոնաձև կոլբաներում՝ 1լ ծավալով Տամիայի սննդամիջավայրի վրա, մշտական 1000 լյուքս լուսավորությամբ (Phywe Luxmeter), 25 ± 2^0C-ում, ASH-3 միկրոօդամղիչների կիրառմամբ սիլիկոնե խողովակներով համակարգում օդի շուրջօրյա հագեցվածությամբ:

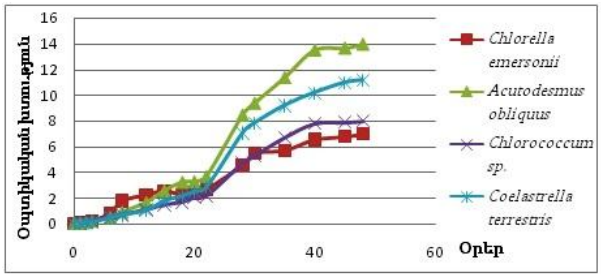
Աճի էքսպոնենցիալ փուլում կուլտուրաները ցենտրիֆուգվել են և կուլտիվացվել երկրորդ (կարմիր) փուլում՝ կարոտինոիդների սինթեզը խթանելու նպատակով [5]: Երկրորդ փուլում կուլտուրաներն աճեցվել են չորս տարբեր սթրեսային պայմաններում (աղ. 1):

Աղյուսակ 1. Միկրոջրիմուռների կուլտիվացման պայմանները Տամիայի սննդամիջավայրում (2-րդ փուլ)

Տամիայի սննդամիջավայր			
1	2	3	4
Լուսավորության ինտենսիվության փոփոխում՝ միջավայրում կուլտուրայի նոսրացմամբ (53 անգամ)	Առանց ազոտի (N_2) որևէ աղբյուրի	10 գ/լ կոնցենտրացիայով նատրիումի քլորիդի (NaCl) ավելացմամբ	1, 2, 3 սյուներում ներկայացված պայմանների համադրմամբ

Կուլտիվացման մյուս պայմանները (լուսավորություն, ջերմաստիճան, օդով հագեցվածություն) ապահովվել են առաջին փուլին համապատասխան:

Արդյունքներ և քննարկում: Կուլտուրաների աճը գնահատելու համար որոշվել է օպտիկական խտությունը 540 նմ ալիքի երկարության տակ ($OD_{\lambda 0}$ 540 nm, Hitachi U-2000): Թաղանթային ֆիլտրերով կենսազանգվածը ֆիլտրելուց հետո այն պահվել է 24 ժ 80°C ջերմաստիճանում (GF/C, 47 mm, Whatman)՝ օպտիկական խտության և չոր կենսազանգվածի հարաբերությունը որոշելու համար: Միկրոջրիմուռների օպտիկական խտության փոփոխու-թյունը կուլտիվացման ընթացքում ներկայացված է նկ. 2-ում:



Նկ. 2. Միկրոջրիմուռների աճի դինամիկան կուլտիվացման ընթացքում

Ընդհանուր կարոտինոիդների, քլորոֆիլ *a*-ի և քլորոֆիլ *b*-ի քանակների որոշման համար կատարվել է կարոտինոիդների էքստրակցիա ացետոնով (99.5%, Sigma-Aldrich). 2 մլ կուլտուրալ հեղուկը ցենտրիֆուգվել է (Heraeus, Multifuge 3SR+) 3900 պտ/ր, 12 րոպե տևողությամբ: Նստվածքի վրա ավելացվել է 2 մլ ացետոն և հաջորդաբար թափահարվել 2 րոպե տևողությամբ ու պահվել սառույցի մեջ: Գործողությունը 3 անգամ կրկնելուց հետո խառնուրդը ցենտրիֆուգվել է (3900 պտ/ր, 20 րոպե) և հավաքվել վերնստվածքային հեղուկը: Գործընթացը կրկնվել է մինչև նստվածքի գունազրկվելը: Այնուհետև ընդհանուր կարոտինոիդների և քլորոֆիլ *a, b*-ի քանակները որոշվել են համաձայն Բեր-Լամբերտի օրենքի՝ սպեկտրոֆոտոմետրի օգնությամբ՝ աբսորբումը (A) չափելով 470, 630, 647, 664 և 691 նմ ալիքների երկարության տակ: Ամփոփված արդյունքներն ալիքների երկարության տակ ներկայացված են աղ. 2-ում [1]:

Ինչպես երևում է աղ. 2-ից, աճի կանաչ փուլից կարմիր փուլի անցման ընթացքում *Chlorella emersonii* և *Chlorococcum* sp. կուլտուրաների մոտ քլորոֆիլ *a-ի* քանակը նվազել է, իսկ ընդհանուր կարոտինոիդների և քլորոֆիլ *b*-ի քանակություններն՝ ավելացել: *Coelastrella terrestris* կուլտուրայի մոտ ընդհանուր կարոտինոիդների և քլորոֆիլ *a-ի* քանակությունը նվազել է, իսկ քլորոֆիլ *b*-ինն՝աճել:

Աղյուսակ 2. Միկրոջրիմուռների կողմից սինթեզված քլորոֆիլ a-ի, b-ի և ընդհանուր կարոտինների քանակները՝ կուլտիվացման տարբեր փուլերում

Միկրոջրիմուռներ / կարոտինոիդներ	Աճի պարամետրերը տարբեր փուլերում					
	Աճի էքսպոնենցիալ փուլ (48-րդ օր)	Երկրորդ փուլի սկիզբ (56-րդ օր)	Լուսավորության ինտենսիվության փոփոխում (նոսրացում 53 անգամ)	Կուլտիվացում առանց ազոտի (N_2) աղբյուրի սնդամիջավայրում	Միջավայրում (10գ/լ) նատրիումի քլորիդի (NaCl) ավելացմամբ	Բոլոր պայմանների համադրմամբ
			I	II	III	IV
Chlorella emersonii						
Քլորոֆիլ *a*	0,18222	0,13224	0,00249	0,00082	0,00054	0,00061
Քլորոֆիլ *b*	0,11331	0,28596	0,00149	0,00062	0,00100	0,00055
Կարոտինոիդներ	9,49294	17,7140	0,14873	0,06820	0,01800	0,01977
Chlorococcum sp.						
Քլորոֆիլ *a*	0,19910	0,10432	0,00266	0,00086	0,00207	0,00331
Քլորոֆիլ *b*	0,10063	0,21637	0,00332	0,00115	0,00238	0,00672
Կարոտինոիդներ	9,56098	12,2948	0,27859	0,00936	0,05377	0,20867
Coelastrella terrestris						
Քլորոֆիլ *a*	0,16368	0,11891	0,00535	0,00129	0,00331	0,00043
Քլորոֆիլ *b*	0,10325	0,27593	0,00759	0,00173	0,00268	0,00049
Կարոտինոիդներ	6,27413	2,98408	0,35418	0,00089	0,10868	0,02822

Ընդհանուր կարոտինոիդների, քլորոֆիլ *a, b*-ի քանակության առավել բարձր արդյունք *Chlorella emersonii* և *Coelastrella terrestris* կուլտուրաների մոտ նկատվել է I պայմանում կուլտիվացման ժամանակ, իսկ *Chlorococcum* sp. կուլտուրայի մոտ՝ I և IV պայմաններում կուլտիվացման ժամանակ:

Կարոտինոիդների կազմը որոշվել է նրբաշերտային քրոմատոգրաֆիական եղանակով (ՆՇՔ): Որպես թիթեղ օգտագործվել է ապակյա հիմքով սիլիկագել (Silicagel 60 (Merck) 20x20 սմ կամ 10x20 սմ), իսկ ՆՇՔ լուծիչ-համակարգ՝ պետրոլային եթեր (եռման միջակայքը 65°C-95°C) – ացետոն – պիրիդին՝10:4:2.5 ծավալային հարաբերությամբ խառնուրդը: Կարոտինոիդների կազմը որոշվել է ըստ գունանյութի և լուծիչ համակարգի բարձրության հարաբերության (R_f) [7]: Արդյունքներն ամփոփված են աղ. 3-ում:

Աղյուսակ 3. Տարբեր պայմաններում աճեցված կուլտուրաների ՆՇՔ-ների Rf-ը

Միկրոջրիմուռներ	Կարոտինոիդների կազմը								
	Աստաքսանտին (ազատ ձև)	Լյուտեին	Աստաքսանտին (մոնոէսթեր)	Քլորոֆիլ *b*	Քլորոֆիլ *a*	Աստաքսանտին	Կանտաքսանտին	Էխինենոն	β-կարոտին
Rf	**4-8**	**38-40**	**42-43**	**48**	**55-56**	**59-60**	**63-68**	**83-86**	**98-99**
Coelastrellaterrestris	6,66	-	42,5	48,8	55,9	-	64,44	-	97,77
Chlorellaemersonii	5,9	-	42,22	-	55,5	-	64,44	-	97,53
Acutodesmusobliquus	8	38,6	42,4	47,7	54,5	59	64,39	-	98
*Chlorococcum*sp.	-	37,6	-	47,9	54,4	59	64,39	-	97,96

Ինչպես երևում է աղ. 3-ից, էխինենոն չի հայտնաբերվել ոչ մի տեսակի միկրոջրիմուռի մոտ, իսկ *Chlorella emersonii* և *Coelastrella terresris* տեսակի միկրոջրիմուռների մոտ՝ լյուտեին և աստաքսանտին տեսակի կարոտինոիդներ: *Chlorococcum* sp. միկրոջրիմուռի մոտ չի հայտնաբերվել նաև աստաքսանտինի մոնոէսթերներ: Աղյուսակում նշված մնացած բոլոր կարոտինոիդները հայտնաբերվել են ուսումնասիրված միկրոջրիմուռների մոտ:

Ամփոփելով կարելի է եզրակացնել, որ կուլտուրաների երկփուլ աճեցման համակարգով կուլտիվացման դեպքում պայմանների փոփոխման I պայմանի ժամանակ (լուսավորության ինտենսիվության ավելացում՝ սննդամիջավայրում կուլտուրայի նոսրացման միջոցով, աղ. 2), կուլտիվացման ժամանակ բոլոր կուլտուրաների մոտ նկատվում են ընդհանուր կարոտինոիդների, քլորոֆիլ *a* և *b*-ի առավել բարձր կենսասինթեզ՝ համեմատած մյուս պայմաններում աճեցնելու հետ: Ելնելով վերը նշվածից, կարելի է եզրակացնել, որ կուլտիվացման I պայմանը խթանում է միկրոջրիմուռների մոտ ընդհանուր կարոտինորդների սինթեզը:

Հետազոտությունն իրականացվել է ՀՀԿԳՆ գիտության պետական կոմիտեի տրամադրած ֆինանսավորմամբ՝ 16YR-2I029 ծածկագրով գիտական թեմայի շրջանակներում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Кахнович Л.В.* Фотосинтез: Методические рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов, БГУ, 88 с., 2003.
2. *Курегян А.Г., Печинский С.В., Зилфикаров И.Н.* Способы получения каротиноидов, лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище на их основе (Обзор). Научно-производственный журнал “Разработка и регистрация лекарственных средств”, 2014, №1 (6), с. 54-63.

3. *Цоглин Л.Н., Пронина Н.А.* Биотехнология микроводорослей. М., Научный Мир, 182 с., 2012.
4. *Челебеева Э.С.* Особенности вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей. Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского, Севастополь, Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 157 с., 2014.
5. *Fábregas J, Otero A, Maseda A, Domínguez A.J.* Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcuspluvialis*, J. Biotechnol, *89*, issue1, 65-71, 2001.
6. *Reis A.* Laboratorionacional de energenhariatechnologia industrial, Departmento de energies renovaveis, LNETI/DER-0092/82, Lisboa, 1992.
7. *Ritchie R.* J.Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d andtotal chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents.Photosynthetica, *46*, pp. 115-126, 2008.

Ստացվել է 02. 02.2018