

## СОДЕРЖАНИЕ И СОСТАВ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СУАНОРНЫТА

Д.И. Петрухина

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга, Россия

### ВВЕДЕНИЕ

В исследованиях, посвященных хранению различных биологических объектов путем криоконсервации, помимо жизнеспособности, изучается также их биосинтетический потенциал после хранения при низкой температуре. Более того, исследование биосинтетического потенциала криоконсервируемых объектов считается одним из наиболее значимых параметров, который может свидетельствовать о результатах криоконсервации. Возможно, что изменения в биосинтезе являются общим компонентом реакции клеток как на физиологические, так и повреждающие воздействия. В этой связи изучение изменений биосинтеза в восстановительный период, как ответ на стресс, вызванный криоконсервацией, имеет важное значение для понимания не только криоповреждений, криоустойчивости, но и характера репарационных процессов.

Однако в работах, посвященных хранению родов *Arthrospira* и *Spirulina*, в том числе в обзорных статьях (Hubalek, 2003) приводятся данные только о выживаемости (Takano et al., 1973; Muhling, 2000; Motham et al., 2012).

Поскольку цианей *Spirulina* и *Arthrospira* представляют интерес как продуценты экзополисахаридов, имеющих коммерческое применение (Bertocchi et al., 1990; Nicolaus et al., 1999), то необходимо было исследовать их биосинтетический потенциал до и после криоконсервации.

Известно, что полисахариды найденные в *A. platensis* обладают противовоспалительными свойствами и имеют доказанный терапевтический эффект. Кроме того, показано, что Spirulan, сульфатированный полисахарид продуцируемый *A. platensis*, является ингибитором образования метастаз в легких и может препятствовать делению раковых клеток (Nwodo et al., 2012).

Преимуществом использования экзополисахаридов заключается в том, что они экскретируются в культуральную среду, поэтому их получение не так дорого, как для эндоклеточных веществ (Friedrich, 2013). Экзополисахариды цианей могут быть связаны с наружной поверхностью клетки, так называемые экзополисахариды капсулы или слизи (Bertocchi et al., 1990; Gloaguen et al., 1995), либо быть растворенными в культуральной / питательной среде (Filali Mouhim et al., 1993).

Поскольку исследуемые штаммы цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 могут представлять интерес как продуценты экзополисахаридов, имеющих коммерческое применение, было проведено исследование влияния сроков криоконсервации на биосинтетический потенциал исследуемых цианей после ре-культивации.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали аксеничные штаммы *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 из коллекции культур университета Пастера, Франция. Выращивание исходных культур и низкотемпературное консервирование осуществляли согласно методике, описанной нами ранее (Петрухина, Лыков, 2016).

Количество образовавшихся экзополисахаридов у исходной культуры цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223, а также ре-культивированных после криоконсервации в присутствии стерильного раствора глюкозы и ДМСО, определяли гравиметрически.

Определение экзополисахаридов исследуемых цианей проводили в исходной культуре (до криоконсервации) и после ре-культивирования криоконсервированных в течении 1 месяца, полугода и 1 года культур цианей и измеряли спустя 7 и 30 дней после оттаивания. Капсульные полисахариды экстрагировали из биомассы цианей, а внеклеточные растворимые полисахариды экстрагировали из питательной среды Заррука, в которой выращивали ре-культивированные цианей после криоконсервирования.

Определение общего содержания уроновых кислот осуществляли согласно методу, описанному в статье Blumenkrantz и Asboe-Hansen (1973). Определение возможного содержания ацетил-групп осуществляли согласно методу, описанному в статье McComb и McCready (1957), а пируватных групп – согласно методу, описанному в статье Sloneker и Orentas (1962).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание экзополисахаридов цианей после криоконсервации. Исследования показали, что содержание капсульных полисахаридов, как и внеклеточных растворимых полисахаридов, у ре-культивированных цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 снижалось пропорционально времени криоконсервации и в зависимости от используемого криопротектора (табл. 1.).

Таблица 1 – Содержание и состав экзополисахаридов у цианей *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после 1 года криоконсервации и ре-культивирования в течение 7 дней

Длительность криоконсервации	Криопротектор	Экзополисахариды		Процентное содержание уоновых кислот в экзополисахаридах		
		Капсульные (мг/г)	Внеклеточные растворимые (мг/л)			
<b><i>Spirulina subsalsa</i> PCC 9445</b>						
<b>Исходная культура</b>						
1 месяц	ДМСО	10 %	0,80 ± 0,01	37,43 ± 0,16	24,10 ± 0,13	
		15 %	0,69 ± 0,05	39,12 ± 0,13	24,45 ± 0,13	
	Глюкоза	10 %	0,65 ± 0,04	31,62 ± 0,31	19,40 ± 0,14	
		15 %	0,74 ± 0,05	40,20 ± 0,31	25,75 ± 0,35	
	Полгода	ДМСО	10 %	0,71 ± 0,03	32,81 ± 0,22	19,40 ± 0,13
			15 %	0,59 ± 0,03	26,93 ± 0,14	17,50 ± 0,14
Глюкоза		10 %	0,44 ± 0,01	22,90 ± 0,13	10,50 ± 0,01	
		15 %	0,60 ± 0,03	28,62 ± 0,11	20,80 ± 0,51	
1 год	ДМСО	10 %	0,54 ± 0,01	24,33 ± 0,13	16,85 ± 0,21	
		15 %	0,60 ± 0,005	20,23 ± 0,28	18,32 ± 0,22	
	Глюкоза	10 %	0,46 ± 0,008	16,79 ± 0,29	10,35 ± 0,12	
		15 %	0,55 ± 0,006	25,87 ± 0,27	17,41 ± 0,19	
<b><i>Arthrospira platensis</i> PCC 9223</b>						
<b>Исходная культура</b>						
1 месяц	ДМСО	10 %	0,47 ± 0,01	25,81 ± 0,51	21,70 ± 0,15	
		15 %	0,38 ± 0,10	29,80 ± 0,43	21,50 ± 0,16	
	Глюкоза	10 %	0,38 ± 0,15	28,06 ± 0,21	16,26 ± 0,11	
		15 %	0,50 ± 0,15	19,72 ± 0,12	22,95 ± 0,20	
	Полгода	ДМСО	10 %	0,44 ± 0,13	16,51 ± 0,23	17,22 ± 0,33
			15 %	0,23 ± 0,03	13,20 ± 0,21	16,00 ± 0,08
Глюкоза		10 %	0,18 ± 0,08	12,52 ± 0,21	9,04 ± 0,38	
		15 %	0,41 ± 0,03	11,51 ± 0,13	19,80 ± 0,25	
1 год	ДМСО	10 %	0,35 ± 0,05	9,50 ± 0,92	14,85 ± 0,12	
		15 %	0,20 ± 0,013	8,30 ± 0,36	16,22 ± 0,17	
	Глюкоза	10 %	0,16 ± 0,01	7,90 ± 0,35	7,03 ± 0,21	
		15 %	0,35 ± 0,013	10,80 ± 0,28	15,4 ± 0,23	
<b>Исходная культура</b>						
1 год	Глюкоза	10 %	0,28 ± 0,01	8,05 ± 0,57	8,08 ± 0,13	
		15 %	0,28 ± 0,01	8,05 ± 0,57	8,08 ± 0,13	

Полученные результаты исследования показали, что у штамма *S. subsalsa* PCC 9445 содержание экзополисахаридов, как капсульных, так и растворимых, соответственно в 1,7 раз и 1,45 раз выше, чем у *A. platensis* PCC 9223 (табл. 1.).

Содержание экзополисахаридов у обоих исследуемых цианей после криоконсервации с криопротектором в концентрации 15 % было ниже, чем при использовании 10 %-ной концентрации этого же криопротектора в независимости от времени хранения.

После кратковременного криоконсервирования (1 месяц) цианей *S. subsalsa* PCC 9445 в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание капсульных полисахаридов снижалось на 7,5 %, затем после полугодия и 1 года – криоконсервирования на 25 % и 32,1 % соответственно. В присутствии 10 %-ного ДМСО содержание капсульных полисахаридов снижалось более резко на 13,75 %, затем на 26,25 % и 24,4 %.

Содержание растворимых полисахаридов у *S. subsalsa* PCC 9445 после кратковременного криоконсервирования в присутствии 10 %-ной глюкозы снижалось на 7,5 %, затем после полугодия и 1 года криоконсервирования на 23,53 % и 30,9 % соответственно. В присутствии 10 %-ного ДМСО содержание внеклеточных полисахаридов не снижалось, но после полугодия и 1 года криоконсервирования снижалось на 28,05 % и 45,9 % соответственно.

Сравнение динамики снижения содержание экзополисахаридов у двух исследуемых видов показало, что у цианеи *A. platensis* PCC 9223 после кратковременного криоконсервирования в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание капсульных полисахаридов не снижалось, но после полугода и 1 года криоконсервирования снижалось на 12,76 % и 24,3 % соответственно. После кратковременного криоконсервирования в присутствии 10 %-ного ДМСО содержание капсульных полисахаридов снижалось на 19,14 %, затем на 51,06 % и 57,4 %, что значительно больше, чем у *S. subsalsa* PCC 9445.

Содержание растворимых полисахаридов *A. platensis* PCC 9223 после криоконсервирования также было значительно ниже, чем в случае *S. subsalsa*. Так, после кратковременного криоконсервирования *A. platensis* в присутствии 10 %-ной глюкозы снижалось на 23,59 %, затем после полугода и 1 года криоконсервирования на 55,4 % и 58,2 % соответственно. В присутствии 10 %-ного ДМСО после кратковременного криоконсервирования содержание растворимых полисахаридов не снижалось, но после полугода и 1 года криоконсервирования снижалось на 48,85 % и 67,8 % соответственно.

Таким образом, результаты исследования показали более высокое содержание экзополисахаридов у *S. subsalsa* PCC 9445, в сравнении с *A. platensis* PCC 9223. Также были выявлены значительные различия между исследуемыми видами цианей, особенно после длительной (1 год) криоконсервации (табл. 1.).

Так после ре-культивирования в течение 7 дней, штамм *S. subsalsa* PCC 9445 имел меньший процент снижения содержания экзополисахаридов, что может быть объяснено видовыми особенностями.

Было показано, что выращивание цианей сразу после оттаивания на питательной среде в присутствии криопротектора глюкозы (10 %) помогает клеткам этого штамма быстрее восстанавливаться после криоконсервирования.

Следует отметить, что содержание экзополисахаридов у цианей после ре-культивирования в течение 30 дней восстанавливалось до уровня исходной культуры.

**Состав экзополисахаридов цианей после криоконсервации.** С целью химической характеристики экзополисахаридов определяли содержание ацетила и пирувата у исходных культур и ре-культивированных цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223, которые были криоконсервированы в присутствии 10 %-ных растворов ДМСО и глюкозы в течение 1 года (табл. 2.).

Таблица 2 – Процентное содержание ацетатных и пируватных остатков в экзополисахаридах цианей *A. platensis* PCC 9223 и *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации в течение 1 года

Штамм	Соединения	Исходная культура	Криопротекторы в концентрации 10 %	
			ДМСО	Глюкоза
<i>S. subsalsa</i> PCC 9445	Ацетил	3,2 ± 0,02	3,10 ± 0,01	3,40 ± 0,04
	Пируват	3,0 ± 0,01	4,01 ± 0,02	4,20 ± 0,02
<i>A. platensis</i> PCC 9223	Ацетил	2,37 ± 0,01	2,34 ± 0,01	2,34 ± 0,03
	Пируват	2,43 ± 0,01	2,61 ± 0,01	2,60 ± 0,01

Было определено содержание ацетатных и пируватных остатков в выделенных экзополисахаридах цианеи *S. subsalsa* PCC 9445, которое составило 3,2 и 3,0 % соответственно от суммарного количества экзополисахаридов. Было показано, что аналогично уроновым кислотам, содержание ацетатных и пируватных остатков в экзополисахаридах *S. subsalsa* PCC 9445 несколько выше (на 0,63 % и 0,57 % соответственно), чем у цианеи *A. platensis* PCC 9223. В тоже время результаты исследования показали, что у *S. subsalsa* PCC 9445 после криоконсервации в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание ацетила повышалось на 6,26 %, а пирувата на 40 % в то время как присутствии 10 %-ного ДМСО содержание ацетила снижалось на 3,13 %, а пирувата повышалось на 33,67 %. В тоже время у *A. platensis* PCC 9223 после криоконсервации в присутствии 10 %-ной глюкозы понижалось содержание ацетила на 1,26 %, а пирувата повышалось на 7,4 %. В присутствии 10 %-ного ДМСО содержание ацетила также снижалось на 1,26 %, а пирувата повышалось на 6,99 %.

Как следует из табл. 2, содержание ацетильных групп у цианей после криоконсервации сохранялось на уровне исходной культуры. В тоже время количество пируватных групп в независимости от используемого криопротектора превышало значение исходных культур.

**Содержание уроновых кислот.** Ранее было показано, что в составе экзополисахаридов цианей, в том числе и *Arthrospira* sp., часто присутствуют уроновые кислоты (Moore, Tischer, 1964; Bertocchi et al., 1990; Filali Mouhim et al., 1993; Gloaguen et al., 1995), играющие важное значение в определении свойств экзополисахаридов (De Philippis et al., 2001; Friedrich, 2013). Также было показано, что присутствие в составе экзополисахаридов ацетильных и пировиноградных групп играют важную роль в определении некоторых физико-химических свойств экзополисахаридов цианей. Например, из-за липофильных фрагментов, таких как ацетильные группы, у экзополисахаридов присутствует эмульгирующие свойства. А в дополнение к уроновым кислотам анионный характер экзополисахаридов часто усиливается пируватными группами (De Philippis et al., 2001; Friedrich, 2013). Однако присутствие уроновых кислот, а также ацетильных и пировиноградных групп в составе экзополисахаридов достаточно редко определяется при характеристике цианей (Bertocchi et al., 1990). Данные показатели и ранее никогда не исследовались у *S. subsalsa*, а также для цианей при ре-культивирования после длительной (1 год) криоконсервации.

Содержание уроновых кислот исследовали у исходных культур цианей цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223, а также ре-культивированных после криоконсервации в течение разного периода (1 месяц, полгода и 1 год) и с использованием в роли криопротектора глюкозы и ДМСО в концентрациях 10 и 15 % (табл. 1.).

Было определено, что содержание уроновых кислот в выделенных экзополисахаридах цианей *S. subsalsa* PCC 9445 составляет 24,1 % от суммарного количества экзополисахаридов. Как и в случае общего содержания экзополисахаридов, содержание уроновых кислот у штамма *S. subsalsa* PCC 9445 в среднем 2,6 % выше, чем у *A. platensis* PCC 9223 (табл. 1.).

После краткосрочной криоконсервации цианей 10 %-ными растворами ДМСО и глюкозы содержание уроновых кислот сохранялось на уровне исходной культуры (табл. 1.). Но при более длительной криоконсервации содержание уроновых кислот снижалось для обоих штаммов, причем более значительно в случае использовании 15 %-ной концентрации криопротекторов.

Результаты исследования показали, что у *S. subsalsa* PCC 9445 после полгода и 1 года криоконсервирования в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание уроновых кислот снижалось на 13,69 % и 27,7 % соответственно. Аналогично у *A. platensis* PCC 9223 после полугодия и 1 года криоконсервирования в присутствии 10 %-ной глюкозы содержание уроновых кислот снижалось на 8,75 % и 29,1 % соответственно. При использовании в качестве криопротектора 10 %-ного ДМСО содержание уроновых кислот у обоих штаммов цианей было значительно меньшим и снижалось на 27,38 % и 24 % (*S. subsalsa*) и на 26,26 % и 25,3 % при криоконсервации в течение полугодия и 1 года соответственно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые было определено содержание синтезируемых экзополисахаридов у *S. subsalsa* PCC 9445, а также содержание в них уроновых кислот и ацетатных и пируватных остатков. Было показано, что по этим показателям *S. subsalsa* PCC 9445 превосходят штамм PCC 9223 *A. platensis*. Также полученные результаты исследования свидетельствуют о восстановлении биосинтетической активности в ре-культивированной культуре цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 после криоконсервации. Соотношение в содержании уроновых кислот, ацетильных и пируватных групп свидетельствует об отсутствии каких-либо нарушений состава синтезируемых экзополисахаридов.

## ЛИТЕРАТУРА

Петрухина Д.И., Лыков И.Н. 2016. Исследование эффективности сохранения цианобактерии *Spirulina subsalsa* после криоконсервации при -80 °С в присутствии глюкозы // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. Т. 6. № 4. С. 68–73.

Bertocchi C., Navarini L., Ceshro A. 1990. Polysaccharides from Cyanobacteria // Carbohydrate Polymers. V. 12. P. 127–153.

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids // Analytical Biochemistry. V. 54. № 2. P. 484–489.

De Philippis R., Sili C., Paperi R., Vincenzini M. 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review // Journal of Applied Phycology. V. 13. P. 293–299.

Filali-Mouhim R., Cornet J.F., Fontaine T., Fournet B., Dubertret G. 1993. Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis* // Biotechnology Letters. V. 15. № 6. P. 567–572.

Friedrich E.M. 2013. Charakterisierung und biologische Testung cyanobakterieller Exopolysaccharide von *Arthrospira platensis*, *Gloeothece membranacea* und *Phormidium* spec. PhD Thesis. Kiel: Christian-Albrechts-Universität. 140 p.

Gloaguen V., Wieruszkeski J.M., Strecker G., Hoffmann L., Morvan H. 1995. Identification by NMR spectroscopy of oligosaccharides obtained by acidolysis of the capsular polysaccharides of a thermal biomass // International Journal of Biological Macromolecules. V. 17. P. 387–393.

Hubálek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // Cryobiology. V. 46. № 3. P. 205–229.

McComb E.A., McCready R.M. 1957. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. Hydroxamic acid reaction // Analytical Chemistry. V. 29. P. 819–821.

Moore B.G., Tischer R.G. 1964. Extracellular Polysaccharides of Algae: Effects on Life-Support Systems // Science. V. 145. № 3632. P. 586–587.

Motham M., Peerapornpisal Y., Tongsriri S., Pumas Ch., Vacharapiyasophon P. 2012. High Subzero Temperature Preservation of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) and Its Ultrastructure // Chiang Mai Journal of Science. V. 39. № 4. P. 554–561.

Muhling M. 2000. Characterization of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. PhD Thesis. Durham: Durham University. 308 p.

Nicolaus B., Panico A., Lama L., Romano I., Manca M.C., De Giulio A., Gambacorta A. 1999. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria // Phytochemistry. V. 52. P. 639–647.

Nwodo U.U., Green E., Okoh A.I. 2012. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects // International Journal of Molecular Sciences. V. 13 № 11. P. 14002–14015.

Sloneker J.H., Orentas D.G. 1962. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide // Nature. V. 194. P. 478–479.

Takano M., Sado J.I., Ogawa T., Terui G. 1973. Freezing and Freeze-Drying of *Spirulina platensis* // Cryobiology. V. 10. № 5. P. 440–444.