МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет

Кафедра биоинженерии

Реферат на тему:

«Биосинтез вторичных каротиноидов у микроводорослей»

Выполнила студентка 1-ого курса магистратуры

Бахарева Дарья Александровна

Москва

2022

Оглавление

[Введение 3](#_Toc101480710)

[1. Биосинтетические каротиноиды 4](#_Toc101480711)

[1.1. Химическое строение каротиноидов, их классификация 4](#_Toc101480712)

[1.2. Пути и основные этапы биосинтеза каротиноидов 5](#_Toc101480713)

[1.3. Вторичные каротиноиды и их значение для биотехнологии 6](#_Toc101480714)

[2. Получение каротиноидов 7](#_Toc101480715)

[2.1. Химический синтез каротиноидов 7](#_Toc101480716)

[2.2. Биосинтез каротиноидов 7](#_Toc101480717)

[**2.2.1. Высшие растения** 7](#_Toc101480718)

[**2.2.2. Бактерии** 7](#_Toc101480719)

[**2.2.3. Грибы** 8](#_Toc101480720)

[**2.2.4. Микроводоросли** 8](#_Toc101480721)

[3. Биотехнология каротиногенных микроводорослей 8](#_Toc101480722)

[3.1. Особенности биосинтеза каротиноидов у микроводорослей 8](#_Toc101480723)

[3.2. Двустадийное культивирование 9](#_Toc101480724)

[3.3. Открытые системы 9](#_Toc101480725)

[3.4. Закрытые системы (фотобиореакторы) 9](#_Toc101480726)

[3.5. Альтернативные подходы оптимизации синтеза каротиноидов 10](#_Toc101480727)

[Выводы 10](#_Toc101480728)

[Список литературы 11](#_Toc101480729)

# **Введение**

Каротиноиды – биологически активные вещества, обладающие мощным антиоксидантным эффектом. Данные вещества имеют важное прикладное значение и используются в пищевой промышленности для обогащения кормов животных и производства биодобавок, а также в косметической и фармацевтической промышленности.

Промышленное получение данных веществ – важная задача, которая требует решения. В данной работе рассмотрены особенности биосинтеза каротиноидов, а также тонкости биотехнологического получения данных веществ.

# **1. Биосинтетические каротиноиды**

## **1.1. Химическое строение каротиноидов, их классификация**

Каротиноиды – группа липофильных пигментов, поглощающих свет и встречающихся в различных организмах. В клетках фототрофных организмов каротиноиды выполняют фотозащитную функцию, предотвращая фотоокислительное повреждение клеток, и являются вспомогательными светособирающими пигментами. Кроме того, данные соединения обладают антиоксидантной активностью, способны инактивировать активные формы кислорода (АФК) и свободные радикалы (Römer, Fraser, 2005).

На данный момент известно более семисот пятидесяти соединений из группы каротиноидов (Takaichi, 2011). Данные пигменты делят на две большие группы: каротины – молекулы, состоящие из углерода и водорода и ксантофиллы – соединения, содержащие также и атомы кислорода в составе гидрокси-, эпокси- или кетогрупп. На рис. 1 представлены β-каротин (каротин) и астаксантин (ксантофилл).



Рис. 1. Примеры каротиноидов: А) β-каротин, Б) астаксантин (Solovchenko, Chekanov, 2014).

Каротиноиды, в зависимости от выполняемых функций, делят на две группы: первичные и вторичные. Первичные, или фотосинтетические каротиноиды, тесно связаны с фотосинтетическим аппаратом (ФСА), где они выполняют светособирающую функцию, а также участвуют в переходе триплетного хлорофилла в синглетное состояние, устраняют АФК и стабилизируют белково-пигментные комплексы (Lichtenthaler, 1987; Solovchenko, 2013; Ruban et al., 2007; Solovchenko, Merzlyak, 2008). К первичным каротиноидам относят β-каротин и ксантофиллы: лютеин, неоксантин, зеаксантин, виолоксантин и антераксантин (Takaichi, 2011). Вторичные каротиноиды не участвуют в фотосинтетических процессах и накапливаются вне тилакоидных мембран в специальных структурах, например, в пластоглобулах (внутри хлоропласта) и в цитоплазматических липидных глобулах при воздействии стрессовых факторов. Данные пигменты обычно представлены β-каротином и астаксантином и накапливаются в виде сложных эфиров жирных кислот (Minyuk, Solovchenko, 2018). Предполагается, что вторичные каротиноиды выполняют следующие функции: удаление избытка фотоассимилятов, подавление образования и деактивация АФК (Hu et al., 2008; Solovchenko 2013).

## **1.2. Пути и основные этапы биосинтеза каротиноидов**

Этапы биосинтеза каротиноидов у водорослей наиболее подробно описаны для зеленых микроводорослей (рода *Chlorella, Chlamydomonas, Dunaliella* и *Haematococcus*) (Takaichi, 2011).

Основные этапы биосинтеза каротиноидов включают сборку углеродного скелета, десатурацию, циклизацию и гидроксилирование.

Сборка углеродного скелета. У зеленых микроводорослей предшественником каротиноидов является изопентилпирофосфат (IPP) – вещество, относящееся к изопреноидам. Существует два пути получения изопреноидов: мевалонатный (классический) путь, отмеченный у животных, архей, дрожжей, а также в цитозоле растительной клетки и альтернативный путь (глицеральдегид-3-фосфат-пируватный), характерный для бактерий и хлоропластов растений. В хлоропластах зеленых водорослей протекает глицеральдегид-3-фосфат-пируватный путь синтеза изопреноидов, в ходе которого образуется IPP (Ершов, 2005). Далее фермент IPP-изомераза преобразует полученный IPP в диметилаллилпирофосфат (DMAPP) – праймер для синтеза изопреноидной цепи. Далее происходит последовательное присоединение трёх молекул IPP к DMAPP по принципу “голова к хвосту”, что приводит к образованию геранилгеранилпирофосфата (GGPP). Затем две молекулы GGPP конденсируются “голова к голове” с помощью фермента фитоинсинтаза (PSY), образуется фитоин (Ершов, 2005).

Десатурация и циклизация. Молекула фитоина проходит через четыре реакции десатурации, катализируемые фитоиндесатуразой (PDS) и ζ- каротиндесатуразой (ZDS), что приводит к последовательному образованию фитофлюина, ζ-каротина, нейроспорина и ликопина. Считается, что пластидная терминальная оксидаза (PTOX) является кофактором десатураз у микроводорослей, что способствует защите клеток от окислительного стресса. Десатурация является лимитирующей стадией синтеза вторичных каротиноидов. Мембраносвязанные ферменты β-ликопинциклаза (LCY-β) и ε- ликопинциклаза (LCY-ε) образуют сложные комплексы с ферментами десатурации (PDS, ZDS) и участвуют в образовании β- и α- иононовых колец (синтез β- и α-каротинов) соответственно (Cunningham et al., 1996). При добавлении кето-группы в одно кольцо β-каротина образуется эхиненон, а при добавлении в оба кольца – кантаксантин, который является предшественником астаксантина. Ниже приведена схема биосинтеза астаксантина (рис. 2).



Рис. 2. Пути синтеза астаксантина из β-каротина (Lotan et al., 1995). Около стрелок указаны ферменты: BKT – β-каротинкетолаза CrtR-b – β- каротингидроксилаза.

## **1.3. Вторичные каротиноиды и их значение для биотехнологии**

Свободные радикалы и активные формы кислорода (АФК) образуются в организме при нормальном метаболизме, но стрессы, загрязнение воздуха, воздействие различных химикатов и ультрафиолета могут спровоцировать увеличение уровня окислителей. Свободные радикалы могут вызывать окислительное повреждение ДНК, белков и липидных мембран, что может являться причиной старения, атерогенеза и канцерогенеза (Papas, 2019).

Каротиноиды обладают антиоксидантным действием, что и обуславливает их полезные свойства. Согласно исследованиям, потребление пищи, богатой каротиноидами, способно предотвратить возникновение некоторых хронических заболеваний (Mares-Perlman et al., 2002) и определенных видов рака (Giovannucci, 2002)

Основными вторичными каротиноидами, используемыми в биотехнологии являются астаксантин и β-каротин (Rodriguez-Concepcion, 2018).

Астаксантин активно используется в различных отраслях промышленности: косметической, пищевой и кормовой, так как данный каротиноид обладает антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Животные не могут синтезировать астаксантин, поэтому единственный способ получения данного вещества – через пищу. Для млекопитающих астаксантин не обладает провитаминной активностью, они не способны превращать его в витамин А. Согласно исследованиям, антиоксидантные свойства астаксантина также проявляются в защите организма от фотоокисления, рака и язвы желудка, кроме того, данный каротиноид поддерживает работу печени, сердца и предстательной железы (Guerin et al., 2003).

Каротиноид β-каротин также имеет широкое применение: в пищевой промышленности в качестве красителя, компонента БАДов и провитамина А, в кормовой промышленности и для производства косметических средств (Solovchenko, Chekanov, 2014).

# **2. Получение каротиноидов**

## **2.1. Химический синтез каротиноидов**

Химический синтез каротиноидов имеет ряд недостатков, связанных со сложной очисткой от стереоизомеров и используемого катализатора, а также низкой биологической активностью, биодоступностью полученного продукта и маленьким выходом (Solovchenko, Chekanov, 2014; Ben-Amotz, Levy, 1996). Кроме того, химические производства могут наносить вред окружающей среде (неметаболизируемые отходы производства).

## **2.2. Биосинтез каротиноидов**

### **2.2.1. Высшие растения**

Каротиноиды оказывают множество положительных эффектов на организм человека и животных, поэтому являются ценными веществами. Первоначально их получали путем экстракции из продуктов высших растений, таких как корнеплоды моркови и пальмовое масло (Tuman, 1997). Далее после выяснения путей биосинтеза каротиноидов и открытия ферментов, осуществляющих синтез данных веществ, при помощи метаболитической и генной инженерии были получены трансгенные растения с повышенной способностью синтезировать каротиноиды (Fraser, Bramley, 2004). Однако промышленные производства каротиноидов из высших растений имеют явные недостатки: длительный процесс роста биомассы, относительно низкий выход целевого продукта, необходимость больших площадей почвы для проращивания растительных организмов. В связи с этими трудностями необходимо рассмотреть альтернативные варианты промышленного синтеза каротиноидов.

### **2.2.2. Бактерии**

Для продукции каротиноидов в бактерию *Escherichia coli* были интегрированы гены, белки которых участвуют в процессе синтеза каротиноидов. Были достигнуты следующие значения выхода целевых продуктов в расчете на сухую массу: β-каротин – 6 мг/г, астаксантин – 1,4 мг/г и ликопин – 30 мг/г (Sandman, 2014).

### **2.2.3. Грибы**

Для грибов были предприняты аналогичные попытки интеграции генов, белки которых участвуют в биосинтезе каротиноидов. Например, для *Candida utilis* были получены следующие результаты (выход продукта в расчете на сухую массу): ликопин – 7,8 мг/г и β-каротин – 5,9 мг/г (Shimada et al., 1998).

### **2.2.4. Микроводоросли**

Каротиногенные микроводоросли – оксигенные фототрофные организмы, для которых характерно накопление большого количества каротиноидов внутри клетки. Обычно данные организмы способны существовать в условиях экстремальной температуры, дефицита питательных веществ и избыточного освещения (Solovchenko, 2013; Solovchenko, Chekanov, 2014; Chekanov et al., 2014; Kublanovskaya et al., 2020). Наиболее интересны для биотехнологии микроводоросли, накапливающие вторичные каротиноиды, так как первичные могут накапливаться только в определенном соотношении к другим фотосинтетическим пигментам, в то время как накопление вторичных не находится под контролем фотосинтетического аппарата клетки и может достигать до 6% от сухой массы клеток (Li et al., 2011). Примерами таких организмов являются *Dunaliella salina* (продуцент β-каротин) и *Haematococcus lacustris* (продуцент астаксантина) (Borowitzka, Borowitzka, 1990; Boussiba, Vonshak, 1991).

# **3. Биотехнология каротиногенных микроводорослей**

## **3.1. Особенности биосинтеза каротиноидов у микроводорослей**

Как уже было сказано раннее, каротиноиды микроводорослей разделяются на первичные и вторичные. Соответственно, для оптимизации их синтеза требуются различные условия. Так как первичные каротиноиды связаны с ФСА, для их накопления необходимы условия оптимальной освещенности, благоприятные условия для роста микроводоросли: наличие необходимых макро- и микроэлементов, питательных веществ, возможно применение мягких стрессовых условий, не нарушающих рост культуры и способствующих ее адаптации при помощи увеличения белков ФСА, в том числе и связанных с ними первичных каротиноидов (Solovchenko, Chekanov, 2014).

Биосинтез вторичных каротиноидов имеет другие особенности. Как правило, накопление данных соединений связано с различными стрессовыми факторами, которые негативно влияют на рост культуры. Например, высокая освещенность положительно сказывается на накопление таких каротиноидов, как астаксантин и β-каротин (с добавлением УФ), недостаток макроэлементов (азот и фосфор), осмотический стресс (повышение концентрации солей), субоптимальная температура при высокой освещенности, добавление источников органического углерода (для миксотрофных микроводорослей) также способствуют накоплению вторичных каротиноидов (Solovchenko, Chekanov, 2014). Также важно учитывать, что каротиногенез сопряжен с биосинтезом липидов, так как каротиноиды являются жирорастворимыми соединениями и накапливаются в олеосомах.

В связи с особенностями биосинтеза вторичных каротиноидов необходимо соблюдать баланс между процессом роста культуры (увеличение биомассы) и стрессовым воздействием для индукции вторичного каротиногенеза. Для достижения данной цели применяют двустадийное культивирование.

## **3.2. Двустадийное культивирование**

Для промышленного получения каротиноидов используют двустадийное культивирование, которое заключается в смене стадии активного прироста биомассы и стадии индукции вторичного каротиногенеза. Как изложено выше, накопление вторичных каротиноидов происходит в стрессовых для культур микроводорослей условиях, например, при повышенной освещенности, нехватке азота и фосфора или осмотическом стрессе. Данные условия не являются оптимальными для деления клеток. По этой причине культивирование делят на две стадии: первая – рост биомассы и вторая – индукция вторичного каротиногенеза (Aziz et al., 2020).

## **3.3. Открытые системы**

Культивирование в открытых системах проводят в специальных водоемах. Открытые системы культивирования микроводорослей являются выгодными с точки зрения экономики при нескольких условиях: низкой стоимости земельных участков, наличии бесплатного источника воды, подходящих условиях культивирования (достаточная освещенность) и культивировании штаммов, устойчивых к контаминациям и загрязнениям. Кроме того, прирост биомассы может быть нестабильным в связи с суточными и сезонными колебаниями солнечной освещенности (Solovchenko, Chekanov, 2014; Del Campo et al., 2007).

## **3.4. Закрытые системы (фотобиореакторы)**

Культивирование микроводорослей проводят в закрытых системах (биореакторах). Для обеспечения равномерного освещения культуру микроводорослей необходимо перемешивать, чтобы все клетки получали равное количество света, также для поддержания фотосинтеза проводят обогащение углекислым газом (толерантность к углекислому газу видоспецифична), кроме того, следует контролировать кислотность среды и температуру. Далее для индукции вторичного каротиногенеза создают недостаток азота и/или фосфора в среде.

Закрытые системы культивирования позволяют избежать проблем, возникающих при открытом культивировании, например, достигаются строго контролируемые условия культивирования, сводится к минимуму риск загрязнения и контаминации культуры. К минусам закрытых систем культивирования можно отнести высокую стоимость оборудования и технические сложности производства. Однако, в таких системах достигается более высокие продуктивность микроводорослей и прирост биомассы (Solovchenko, Chekanov, 2014).

## **3.5. Альтернативные подходы оптимизации синтеза каротиноидов**

Успехи в редактировании геномов позволили создать инструменты для генетической модификации микроводорослей. Ген фитоиндесатуразы у *Haematococcus* был успешно модифицирован, что привело к увеличенному накоплению астаксантина (Steinbrenner, Sandmann, 2006).

Коммерческое использование трансгенных микроводорослей затруднено в связи с низкой рентабельностью и возможной утечкой организмов из открытых систем культивирования.

# **Выводы**

Существующие на данный момент биотехнологические производства каротиноидов базируются в основном на культивировании микроводорослей – продуцентов одного типа каротиноидов и имеют ряд ограничений, связанных как со склонностью к контаминации, так и с низкой продуктивностью известных штаммов, и потерей биомассы клеток на стадии индукции каротиногенеза. По данным причинам следует рассмотреть штаммы микроводорослей, способные продуцировать одновременно несколько видов каротиноидов, изучить особенности метаболизма микроводорослей и рассмотреть новые подходы производства данных соединений, в том числе при помощи методов генной инженерии.

# **Список литературы**

1. Ершов Ю. В. Метилэритритолфосфатный (немевалонатный) путь биосинтеза каротиноидов // Усп. биол. химии. – 2005. – Т. 45. – С. 307 – 354.
2. Aziz M. M. A. et al. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review //Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2020. – Т. 119. – С. 109621.
3. Ben-Amotz A., Levy Y. Bioavailability of a natural isomer mixture compared with synthetic all-trans beta-carotene in human serum //The American journal of clinical nutrition. – 1996. – Т. 63. – №. 5. – С. 729-734.
4. Borowitzka L. J., Borowitzka M. A. Commercial production of β-carotene by *Dunaliella salina* in open ponds // Bull. Mar. Sci. – 1990. – Vol. 47, N 1. – P. 244 – 252.
5. Boussiba S., Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* // Plant Cell Physiol. – 1991. – Vol. 32, N 7. – P. 1077 – 1082.
6. Chekanov K., Lobakova E., Selyakh I., Semenova L., Sidorov R., Solovchenko A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia) // Mar. Drugs. – 2014. – Vol. 12, N 8. – P. 4504 – 4520.
7. Cunningham F. X., Pogson B., Sun Z., McDonald K. A., DellaPenna D., Gantt E. Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation // The Plant Cell. – 1996. – Vol. 8, N 9. – P. 1613 – 1626.
8. Del Campo J. A., García-González M., Guerrero M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives //Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – Т. 74. – №. 6. – С. 1163-1174.
9. Fraser P. D., Bramley P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids // Progress in lipid research. – 2004. – Т. 43. – №. 3. – С. 228-265.
10. Giovannucci E. Lycopene and prostate cancer risk. Methodological considerations in the epidemiologic literature // Pure and Applied Chemistry. – 2002. – Т. 74. – №. 8. – С. 1427-1434.
11. Guerin M., Huntley M. E., Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition //TRENDS in Biotechnology. – 2003. – Т. 21. – №. 5. – С. 210-216.
12. Hu C. C., Lin J. T., Lu F. J., Chou F. P., Yang D. J. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract // Food Chem. – 2008. – Vol. 109, N 2. – P. 439 – 446.
13. Kublanovskaya A., Solovchenko A., Fedorenko T., Chekanov K., Lobakova E. Natural communities of carotenogenic chlorophyte *Haematococcus lacustris* and bacteria from the White Sea coastal rock ponds // Microbial Ecol. – 2020. – Vol. 79, N 4. – P. 785 – 800.
14. Li Y., Zhou W., Hu B., Min M., Chen P., Ruan R. R. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: strains screening and significance evaluation of environmental factors // Bioresour. Technol. – 2011. – Vol. 102, N 23. – P. 10861 – 10867.
15. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Meth. Enzymol. – 1987. – Vol. 148. – P. 350 – 382.
16. Mares-Perlman J. A. et al. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview //The Journal of nutrition. – 2002. – Т. 132. – №. 3. – С. 518S-524S.
17. Minyuk G. S., Solovchenko A. E. Express analysis of microalgal secondary carotenoids by TLC and UV-Vis spectroscopy // Microbial Carotenoids. – New York, 2018. – P. 73 – 95.
18. Papas A. M. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. – Boca Raton: CRC press, 2019. – 672 p.
19. Rodriguez-Concepcion M., Avalos J., Bonet M. L., Boronat A., Gomez-Gomez L., Hornero-Mendez D., Zhu C. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health // Prog. Lipid Res. – 2018. – Vol. 70. – P. 62 – 93.
20. Römer S., Fraser P. D. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation //Planta. – 2005. – Т. 221. – №. 3. – С. 305-308.
21. Ruban A. V., Berera R., Ilioaia C., Van Stokkum I. H., Kennis J. T., Pascal A. A., Van Grondelle R. Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants // Nature. – 2007. – Vol. 450, N 7169. – P. 575 – 578.
22. Sandmann G. Carotenoids of biotechnological importance // Biotechnology of isoprenoids. – 2014. – С. 449-467.
23. Shimada H. et al. Increased carotenoid production by the food yeast Candida utilis through metabolic engineering of the isoprenoid pathway //Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – Т. 64. – №. 7. – С. 2676-2680.
24. Solovchenko A. E. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae // Rus. J. Plant Physiol. – 2013. – Vol. 60, N 1. – P. 1 – 13.
25. Solovchenko A., Chekanov K. Production of carotenoids using microalgae cultivated in photobioreactors // Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology. – Dordrecht, 2014. – P. 63 – 91.
26. Solovchenko A. E., Merzlyak M. N. Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants // Rus. J. Plant Physiol. – 2008. – Vol. 55, N 6. – P. 719 – 737.
27. Steinbrenner J., Sandmann G. Transformation of the green alga Haematococcus pluvialis with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis //Applied and environmental microbiology. – 2006. – Т. 72. – №. 12. – С. 7477-7484.
28. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions // Mar. Drugs. – 2011. – Vol. 9, N 6. – P. 1101 – 1118.
29. Tyman J. H. P. The chemistry of some natural colourants // Studies in natural products chemistry. – 1997. – Т. 20. – С. 719-788.