

УДК 577.342

И. А. ДРЕМУК, С. М. САВИНА, Е. В. ВЯЗОВ, К. О. АДАМЧИК, Н. В. КОЗЕЛ

**СОДЕРЖАНИЕ ГЛУТАТИОНА И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ
В КЛЕТКАХ *SPIRULINA PLATENSIS* ПРИ СВЕТОДИОДНОМ ОСВЕЩЕНИИ
С РАЗНЫМ СПЕКТРАЛЬНЫМ СОСТАВОМ**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск,
e-mail: irinadremuk@yandex.ru*

При выращивании *Spirulina platensis* под синим светом выявлено снижение количества восстановленного глутатиона, а также активности глутатионредуктазы и, как следствие, накопление окисленной формы глутатиона в клетках водоросли, что снижает устойчивость *Spirulina platensis* к стрессовым воздействиям и является одной из причин уменьшения ее продуктивности.

Ключевые слова: *Spirulina platensis*, антиоксидантная система, фотосинтетически активный свет, спектральный состав, светодиоды.

I. A. DREMUK, S. M. SAVINA, Y. V. VIAZAU, K. O. ADAMCHYK, N. V. KOZEL

**GLUTATHIONE CONTENT AND GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVITY IN *SPIRULINA PLATENSIS* CELLS
UNDER LED LIGHTING WITH DIFFERENT SPECTRAL COMPOSITIONS**

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: irinadremuk@yandex.ru*

Spirulina platensis grown under blue light showed a decrease in both reduced glutathione content and glutathione reductase activity and, as a result, accumulation of oxidized form of enzyme in its cells. This lowered *Spirulina platensis* stress tolerance and was one of the causes of its decreased productivity.

Keywords: *Spirulina platensis*, antioxidant system, photosynthetically active light, the spectral composition of the LEDs.

Введение. Ранее в экспериментах по изучению влияния узкополосного излучения красных и синих светодиодов и их совместного действия на динамику окислительных процессов в растениях огурца нами было показано, что светодиодное освещение с одной спектральной полосой (синей либо красной) оказывает существенное стрессовое воздействие на растительный организм, выражающееся в накоплении активных форм кислорода (АФК), в том числе пероксида водорода, а также в интенсификации процессов перекисного окисления липидов в листьях огурца [1]. Известно, что уровень АФК в растениях контролируется антиоксидантной системой, в состав которой входят низкомолекулярные соединения, из которых наиболее важными для растительной клетки являются аскорбат, токоферол, глутатион и каротиноиды, а также антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза (ГР), каталаза [2]. Среди перечисленных компонентов антиоксидантной системы растительной клетки важную роль играет глутатион, биологическая функция которого заключается в защите SH-групп белков от окисления, восстановлении H_2O_2 и других пероксидов, связывании свободных радикалов, а также поддержании пула восстановленного аскорбата. ГР – фермент, восстанавливающий дисульфидную связь окисленного глутатиона (GSSG) до его физиологически активной сульфгидрильной формы и, соответственно, поддерживающий необходимое для нормального функционирования антиоксидантной системы содержание в клетке восстановленного глутатиона (GSH).

Исследование функционирования антиоксидантной системы растительной клетки в условиях светодиодного освещения может дать представление о степени развития окислительного стресса в растениях, а также о характере протекания окислительных процессов и способности расти-

тельного организма сопротивляться стрессовому воздействию, что позволит оптимизировать спектральный состав осветителя. Оптимизация спектрального состава источников фотосинтетически активного света весьма актуальна при биотехнологическом производстве хозяйственно ценных видов водорослей, в частности *Spirulina platensis*.

Цель данной работы – выявление влияния светодиодного освещения разного спектрального состава на содержание восстановленного и окисленного глутатиона, а также на активность глутатионредуктазы в клетках *Spirulina platensis*.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали трихомную сине-зеленую водоросль *Spirulina (Arthrospira) platensis* (штамм IBCE S-2 из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси) [3]. Водоросль выращивали в течение 7 дней на среде Зарроука [4] в стеклянных колбах объемом 200 мл (рабочий объем 100 мл) в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре 25 ± 2 °С. Для выращивания *Spirulina platensis* использовали светодиодный осветитель, сконструированный в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [5], с различными комбинациями синего (450–465 нм), голубого (465–485 нм), желтого (590–595 нм) и красного (630–650 нм) светодиодов (потребляемая мощность одного светодиода около 1 Вт), а также люминесцентную лампу Philips PL-S 11W/827/2P с потребляемой мощностью 11 Вт, цветовой температурой 2700 К и светоотдачей 64 Лм/Вт в качестве контроля. Показатели интенсивности световых потоков лампы и светодиодного осветителя изначально были выравнены по энергии и составляли 5 мВт/см².

Продуктивность *Spirulina platensis* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензии при 560 нм на спектрофотометре Metertech SP-830 Plus (Тайвань) [6]. Определение GSSG и GSH проводили с помощью спектрофлуорометрического метода [7], модифицированного в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [8]. Активность ГР определяли по кинетике потребления НАДФН, которую регистрировали по уменьшению оптической плотности при 340 нм в течение 5 мин ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [9]. Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения, вычисленные в результате трех независимых опытов. Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 12.5.

Результаты и их обсуждение. *Spirulina platensis* выращивали с помощью светодиодов с полосоми испускания в красной и синей областях спектра. Попытка использовать именно такие светодиоды для культивирования водорослей не случайна, так как в фотосинтезирующих организмах в качестве основных пигментов-светосборщиков выступают хлорофилл и каротиноиды, которые наиболее эффективно поглощают свет в указанной области спектра. Именно этими критериями руководствуется большинство исследователей, применяя для выращивания растений разные комбинации только синих и красных светодиодов и исключая из спектра излучения зеленый свет [10, 11]. Для выращивания *Spirulina platensis* кроме классических красного и синего светодиодов и их комбинации (красный:синий – 2:1 по энергии излучения) нами использован также осветитель более сложной конструкции, в спектре излучения которого содержался дополнительно желтый и голубой свет (красный:желтый:голубой:синий – 3:3:1:1 по энергии излучения). Как показано нами ранее, такой вариант светодиодного освещения приводит к повышению синтеза в клетках *Spirulina platensis* светособирающего пигмента фикоцианина, который также является ценным антиоксидантом, что важно учитывать при культивировании водоросли в промышленных условиях для получения биомассы высокого качества [3]. Все использованные в работе варианты светодиодного освещения, за исключением синего, позволили добиться на 17–31 % более высокой продуктивности *Spirulina platensis* по сравнению с контрольным вариантом, выращенным под люминесцентной лампой (см. таблицу). При использовании синего света наблюдалось двукратное снижение продуктивности водоросли.

Изменение продуктивности *Spirulina platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль)

Показатель	Вариант освещения				
	Красный + желтый + голубой + синий (3:3:1:1)	Красный	Красный + синий (2:1)	Синий	Белый (контроль)
Продуктивность, мг/л	696,4 ± 21,6	782,2 ± 40,0	715,1 ± 19,7	322,8 ± 12,5	595,8 ± 34,3

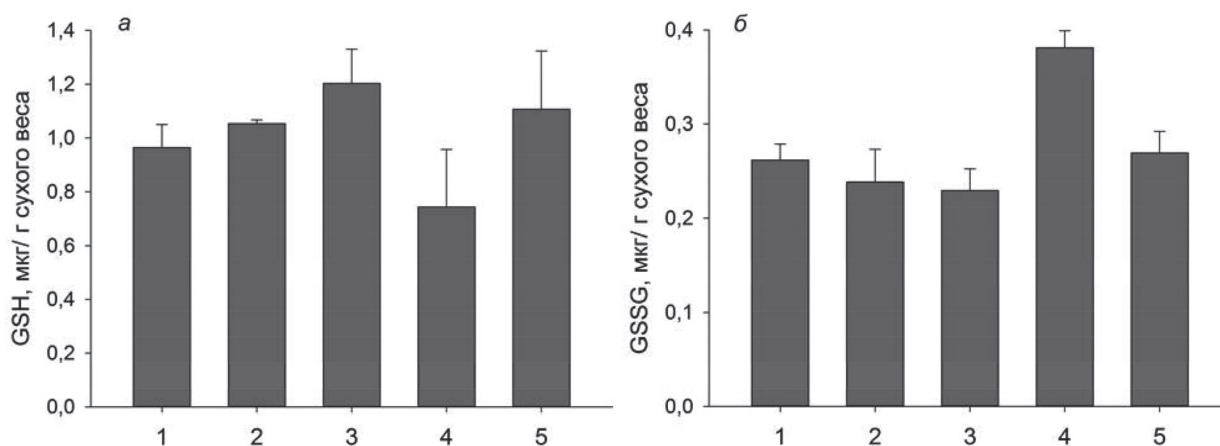


Рис. 1. Изменение содержания восстановленного (а) и окисленного (б) глутатиона в клетках *Spirulina platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль). Здесь и на рис. 2 варианты освещения *Spirulina platensis*: 1 – красный + желтый + голубой + синий (в соотношении 3:3:1:1 по энергии излучения), 2 – красный, 3 – красный + синий (в соотношении 2:1 по энергии излучения), 4 – синий, 5 – белый свет

Для анализа состояния антиоксидантной системы *Spirulina platensis* в условиях светодиодного освещения разного спектрального состава изучали изменение количества GSH и GSSG, а также активности ГР в клетках водоросли. Установлено, что соотношение GSH и GSSG существенно отличается от контроля только в варианте с использованием синего света (рис. 1, вариант 4). В этом варианте наблюдается истощение (на 33 % по отношению к контролю) пула GSH и повышенное накопление (на 42 % по отношению к контролю) его физиологически неактивной окисленной формы, что обычно приводит к негативному эффекту при окислительном воздействии. Отметим, что в варианте с использованием совместно синего и красного света (рис. 1, вариант 3), наоборот, количество GSH было несколько выше контроля (на 9 %), а GSSG – ниже на 14 %, что указывает не только на активацию антиоксидантной системы в клетках водоросли при таком воздействии, но и на наличие некоторого стрессового воздействия.

Анализ активности ГР показал существенное снижение (на 43 % по отношению к контролю) активности этого фермента в варианте с использованием синего света (рис. 2, вариант 4), что объясняет накопление GSSG и снижение количества GSH. Однако отметим, что в целом общее содержание глутатиона в этом варианте снижалось по отношению к контролю и другим вариантам, что является следствием не низкой активности ГР, а либо активным потреблением этого антиоксиданта в защитных реакциях, либо нарушением его синтеза. В варианте с использованием совместно красного и синего света активность ГР была самой высокой – на 12 % выше контроля, что также согласуется с результатами анализа количества GSH и GSSG и, как было отмечено

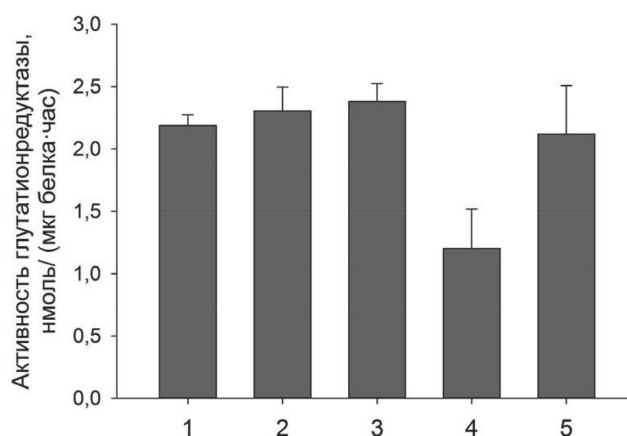


Рис. 2. Изменение активности глутатионредуктазы в клетках *Spirulina platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль)

выше, может указывать и на наличие некоторого стрессового воздействия на клетки водоросли при таком освещении.

Заключение. Таким образом, в варианте с использованием синего света выявлено снижение количества восстановленного глутатиона, а также активности глутатионредуктазы и, как следствие, накопление окисленной формы глутатиона в клетках *Spirulina platensis*, что снижает устойчивость водоросли к стрессовым воздействиям и является одной из причин уменьшения ее продуктивности. Остальные исследованные модификации спектрального состава не оказывали существенного влияния на указанные компоненты антиоксидантной системы *Spirulina platensis* и позволили добиться на 17–31 % более высокой продуктивности водоросли по сравнению с контролем.

Список использованной литературы

1. Вязов, Е. В. Содержание активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и проницаемость клеточных мембран в растениях огурца (*Cucumis sativus*) в условиях узкополосного освещения / Е. В. Вязов, Н. В. Шалыго // Вестн. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2013. – № 2. – С. 71–74.
2. Козел, Н. В. Антиоксидантная система листьев ячменя при фотоокислительном стрессе, индуцированном бенгальским розовым / Н. В. Козел, Н. В. Шалыго // Физиол. раст. – 2009. – Т. 56, № 3. – С. 351–358.
3. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников [и др.]. – Минск, 2011. – С. 24–26.
4. Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438) / S. Cheevadhanarak [et al.] // Stand. Genomic Sci. – 2012. – Vol. 6, N 1. – P. 43–53.
5. Доманский, В. П. Особенности выращивания *Spirulina Platensis* при использовании светодиодных источников света / В. П. Доманский, Н. В. Козел // Вестн. НАН Беларуси. – Сер. биол. наук. – 2013. – № 3. – С. 56–59.
6. Promotive Effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* / K. Sasaki [et al.] // J. of Fermentation and Bioengineering. – 1995. – Vol. 79, N 5. – P. 453–457.
7. Hissin, P. J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / P. J. Hissin, R. Hilf // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 74, N 1. – P. 214–226.
8. Спектрофлуориметрический метод определения окисленного и восстановленного глутатиона в растениях / Н. В. Шалыго [и др.] // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 264–270.
9. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes / T. Gechev [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59, N 4. – P. 708–714.
10. Фотосинтез и продуктивность растений картофеля в условиях различного спектрального облучения / Ю. Ц. Мартиросян [и др.] // С.-х. биология. – 2013. – № 1. – С. 107–112.
11. Фотохимическая и фосфорилирующая активность хлоропластов и мезоструктура листьев китайской капусты при выращивании под светодиодами / О. В. Аверчева [и др.] // Физиол. раст. – 2010. – Т. 57. – С. 404–414.

Поступила в редакцию 26.04.2016