

DINAMICA MODIFICĂRII COMPONENTEI BIOCHIMICE A SPIRULINEI PE DURATA CULTIVĂRII ÎN CONDIȚII DE LABORATOR ÎN DEPENDENȚĂ DE REGIMUL DE ILUMINARE

Rudic V., Rudi L., Chiriac T., Codreanu S., Dumbrăveanu V., Djur S., Cepoi
L., Miscu V., Ghelbet V., Chelmenciu V

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

În articol sunt prezentate rezultatele cercetărilor asupra dinamicii modificării componente biochimice a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis*, cultivată în condiții de laborator în dependență de regimul de iluminare. Au fost testate două regimuri de iluminare - continuă și periodică (12 ore lumină :12 ore întuneric), iar în biomasa obținută a fost monitorizat conținutul cantitativ al proteinelor, lipidelor, glucidelor, pigmentilor ficobilinici, carotenoizi, clorofilei. Productivitatea spirulinei în modele experimentale a fost similară, diferențele fiind observate în componența biomasei. Regimul de cultivare de tip periodic poate fi considerat mai puțin favorabil culturii de spirulină, chiar dacă este propriu mediului natural de creștere, fiind asociat cu reducerea cantității de proteină și creșterea conținutului hidraților de carbon în biomasă, precum și cu o acumulare mai pronunțată a produselor peroxidării lipidice, în special la finele perioadei de monitorizare. În condițiile regimului de iluminare continuă se menține un nivel stabil redus al produselor peroxidării pe toată durata cultivării, fiind o mărturie a condiției fiziologice normale în biomasa de spirulină.

Cuvinte cheie: *Spirulina platensis*, proteine, lipide, dialgehidă malonică, glucide, ficobiline, carotenoizi, regim de iluminare,

Depus la redacție 22 septembrie 2015

Adresa pentru corespondență: Rudi Ludmila, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova; e-mail: rudiludmila@gmail.com

Introducere

Cianobacteria *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) rămâne a fi unul dintre cele mai solicitate obiecte atât în aspect de producere ficologică, cât și al cercetărilor fundamentale. Biomasa de spirulină este consumată direct sau este utilizată în calitate de materie primă în industria alimentară, farmaceutică și cea cosmetică [2], fiind o

sursă excelentă de proteine, aminoacizi și acizi grași polinesaturați esențiali. Biomasa de spirulină conține un complex de minerale necesare unei funcționări metabolice impecabile a organismului. Produsele obținute în baza biomasei de spirulină au demonstrat efecte imunomodulatoare, antitumorale, antioxidante, antivirale și antibacteriene [1,2]. Biomasa de spirulină și produsele din ea au demonstrat eficiență în tratamentul obezității și diabetului, în intoxicații chimice și stări alergice [2, 7, 13, 14]. Producerea de biomasă de spirulină pentru diferite scopuri are la bază o multitudine de tehnologii intensive care asigură o producere cost eficientă de biomasă. La baza acestor tehnologii stau numeroase studii ce țin de modul și condițiile de cultivare a spirulinei, care influențează atât producerea de biomasă, cât și conținutul ei biochimic. Regimul termic și cel de iluminare sunt factori care reglează acumularea biomasei și a proteinelor. Astfel temperatura de 35°C este un factor de reținere pentru producerea de biomasă dar sporește acumularea hidraților de carbon și a lipidelor, în cazul cultivării pe un mediu îmbogățit cu azot [5]. Intensitatea luminii are influență majoră atât asupra cantității, cât și asupra calității biomasei de spirulină. Deviațiile de la optimul de iluminare sunt asociate cu scăderea productivității. Conținutul biochimic de asemenea se modifică. De exemplu, în condiții de iluminare excesivă se acumulează mai mulți carotenoizi, care au funcție de fotoprotecție, iar în condiții de iluminare redusă se mărește cantitatea pigmentilor ficobilinici, care îndeplinesc funcția de antene suplimentare de captare a cuantelor de lumină [9]. Alternarea fazelor de lumină/întuneric, de asemenea, influențează procesele de acumulare a biomasei și a compușilor specifici ai acesteia. La acest capitol datele din literatura de specialitate sunt foarte diverse și chiar contradictorii. În timp ce unii autori afirmă, că condițiile fotoperiodismului sunt benefice pentru spirulină [12, 15], alții afirmă, că cultivarea spirulinei în condiții naturale reduce din producerea de biomasă și valoarea ei nutritivă [3,11]. În opinia noastră varietatea rezultatelor este determinată de diversitatea culturilor cianobacteriene, care sunt utilizate în cercetare. Acest lucru sugerează necesitatea de a efectua cercetări de stabilire a efectului fotoperiodismului asupra proceselor de creștere și acumularea principiilor bioactive a fiecărei culturi ficologice în parte.

Scopul cercetărilor analizate în acest articol a prevăzut determinarea dinamicii acumulării componentelor structurale și funcționale în biomasa spirulinei, tulpina *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 cultivată în condiții de laborator în regim de iluminare continuă și periodică (12/12 ore zi/noapte).

Materiale și metode

Pentru cercetare a fost selectată tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 care a fost cultivată pe mediul nutritiv mineral SP -1 cu următoarea componență: macroelemente (în g/l): NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -2,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -0,6; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCl_2 -0,024; 1ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l(mediu): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015); FeEDTA-1ml/l;

Au fost respectați parametrii și condițiile de cultivare în laborator: cantitatea de cultură start (inoculum) – 0,4-0,45g/l BAU; temperatura de 23-25°C, pH-ul optim al mediului 8-9, intensitatea iluminării de 55 μmol fotoni/ m^2/s . Au fost aplicate două regimuri: fotoperiodism 12/12 ore zi/noapte și iluminare continuă. Cultivarea a fost efectuată în baloane Erlenmeyer, cu volum de lucru de 1 L; Cultura a fost agitată zilnic,

timp de 2 ore pe un agitator universal de laborator tip WU-4 cu viteza de 200 rotații/min. Durata ciclului de cultivare a fost de 10 zile. Prelevarea probelor de biomasă au fost efectuate zilnic la aceeași oră

Biomasa de spirulină obținută a fost separată de mediul de cultură prin filtrare, a fost supusă demineralizării și standartizată. În biomasa colectată a fost efectuată analiza biochimică. Conținutul de proteine a fost determinat spectrofotometric în baza produselor degradării bazice a proteinelor cu utilizarea reagentului *Folin-Ciocalteu* [10]. Lipidele au fost determinate cu aplicarea reagentului fosfo-molibdenic în baza principiului degradării acide a lipidelor [4, 8]. Conținutul total al hidraților de carbon în biomasa algală a fost efectuată prin metoda adaptată cu antron [16].

Pigmenții, obținuți prin extragere în apă (ficobilinele) și etanol (carotenoizii, clorofila) au fost determinați spectrofotometric. Gradul de oxidare a lipidelor a fost determinat în baza dialdehidei malonice (substanță reactivă a acidului tiobarbituric), rezultată în urma oxidării lipidelor [6].

Rezultate și discuții

Seriile experimentale de creștere a culturii de *Spirulina platensis* în condiții de iluminare continuă și de fotoperiodism (12/12 ore zi/noapte) au fost efectuate în condiții standard de laborator. Menționăm, că în cercetare este implicată o tulpină de importanță biotehnologică, adaptată la condițiile de cultivare de laborator, dar și cele industriale, iar mediul nutritiv este optimizat și asigură producerea maximală de biomasă cu un conținut biochimic echilibrat.

Spirulina este cultivată în primul rând pentru valoarea nutritivă și terapeutică a biomasei obținute. Din aceste considerente monitorizarea modificărilor cantitative ale principalelor componente, care în prezent sunt deja utilizate în diferite domenii, poate facilita elaborarea recomandărilor, orientate spre sporirea eficienței tehnologiilor aplicate. În cazul nostru aceste recomandări se referă la aplicarea fotoperiodismului în fluxul tehnologic și la perioada de recoltate a biomasei în dependență de domeniul în care va fi ea utilizată. Proteina este componentul majoritar al biomasei, constituind până la 70% din biomasa absolut uscată (BAU). Acumularea proteinei pe durata perioadei de cultivare în biomasa de spirulină crescută în condiții de iluminare continuă și în condițiile fotoperiodismului 12/12 ore zi/noapte sunt prezentate în Figura 1.

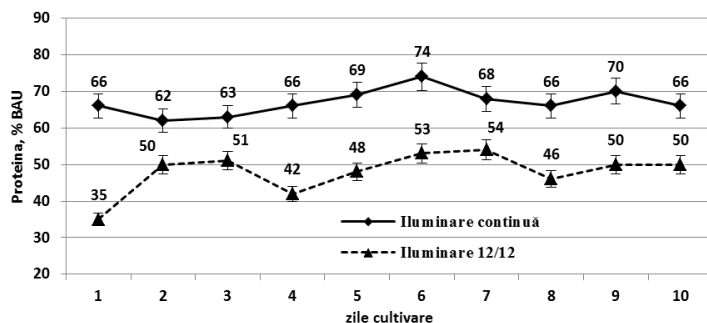


Figura 1. Dinamica acumulării proteinelor în biomasa spirulinei pe durata cultivării în condiții de laborator, în dependență de tipul iluminare.

Rezultatele obținute indică asupra unei diminuări esențiale a conținutului de proteină în biomasa de spirulină, crescută în condițiile iluminării periodice 12/12 ore. În dependență de etapa ciclului vital al culturii cianobacteriene această diferență este

de 19,3-36,4%. În condițiile regimului de iluminare continuă acumularea maximală a proteinelor în biomasa spirulinei corespunde zilei a 6-ea de cultivare (74% BAU). Biomasa de spirulină obținută în condițiile unui regim de iluminare periodică la aceeași etapă a ciclului vital a acumulat cu 28,4% proteină mai puțin. Dinamica procesului de acumulare a proteinei în cadrul celor două tipuri de iluminare este de asemenea diferită. În condițiile de iluminare continuă, începând cu ziua a doua a fost determinat un spor continuu a acumulării proteinei în biomasă care a finalizat la ziua a 6-a. În următoarele zile a avut loc o reducere a conținutului de proteină, care s-a menținut până la sfârșitul perioadei de cultivare. Cele mai semnificative oscilări ale conținutului de proteină revin primelor zile de cultivare a spirulinei în condițiile regimului de iluminare periodică. Creșterea conținutului de proteină în biomasă cu 43% reflectă procesul de adaptare a culturii la noile condiții, care sunt percepute de cultură ca stresante.

Astfel, pentru obținerea biomasei de *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 cu un conținut înalt de proteine este preferabil regimul de iluminare continuă.

Glucidele prezintă componente valoroase ale biomasei de spirulină, fiind utilizate în diferite domenii – de la industria alimentară până la cea farmaceutică. Conținutul de glucide în biomasa de spirulină cultivată în condiții de iluminare continuă și în condiții de fotoperiodism sunt reflectate în Figura 2. Biomasa de spirulină, obținută în condițiile regimului de iluminare periodică 12/12 ore zi/noapte acumulează cantități mult mai mari care le depășesc pe cele obținute în condiții de iluminare continuă de 2,1-3,1 ori. Mărirea nivelului de glucide are loc în cea de-a doua zi de cultivare, când conținutul lor crește de la 17 la 32% BAU. În condițiile unui regim de iluminare continuă nivelul glucidelor în biomasa de spirulină se menține la un nivel constant de 12-13%, caracteristic pentru cultura tipică.

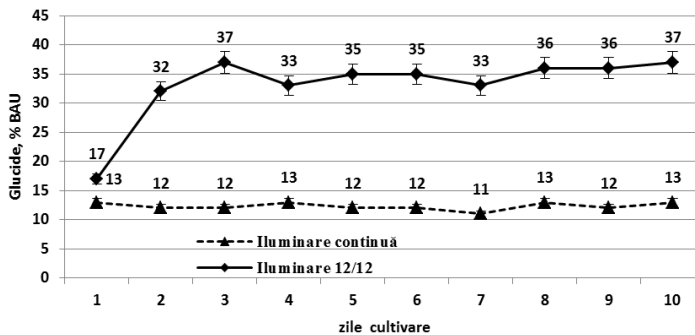


Figura 2. Dinamica acumulării glucidelor în biomasa spirulinei pe durata cultivării în condiții de laborator, în dependență de iluminare.

Ca și în cazul proteinelor, conținutul de lipide în biomasa de spirulină este mai joasă în cazul fotoperiodismului, dar diferența între cele două regimuri nu este atât de mare, încadrându-se pentru majoritatea zilelor în limitele de 9-24% (Figura 3). Pentru regimul de iluminare continuă acumularea maximală a lipidelor în biomasă corespunde zilei a 6-ea de cultivare. În aceeași zi biomasa de spirulină, obținută în condițiile unui regim de iluminare periodică a acumulat lipide cu 23% mai puțin, maximul de acumulare fiind determinat la ziua a 7-ea.

Conținutul de lipide nu a înregistrat oscilări mari pe durata cultivării cu excepția primelor 2 zile, care corespunde perioadei de acomodare. Variațiile minore începând cu ziua a cincea de cultivare în cantitatea lipidelor în biomasa de spirulină crescută în regim de iluminare continuă și de fotoperiodicitate reflectă starea de homeostazie a culturii. Cu

toate acestea este necesar de a confirma siguranța biomasei prin cuantificarea produselor peroxidării lipidice. Rezultatele testului de determinare a dialdehidei malonice sunt reflectate în figura 4.

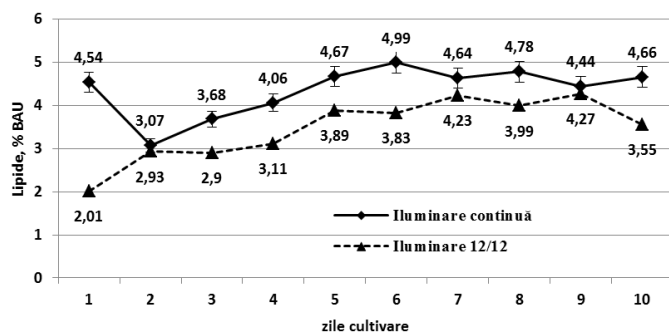


Figura 3. Dinamica acumulării lipidelor în biomasa spirulinei pe durata cultivării în condiții de laborator, în dependență de iluminare.

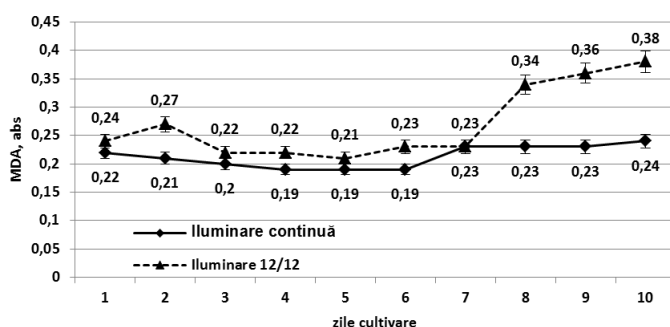


Figura 4. Dinamica acumulării radicalilor (testul DAM) în biomasa spirulinei pe durata cultivării în condiții de laborator, în dependență de iluminare.

În cazul aplicării regimului de iluminare continuă nivelul dialdehidei malonice DAM se menține la un nivel stabil jos pe toată durata monitorizării. În biomasa obținută în condiții de fotoperiodicitate pe durata primelor 7 zile de cultivare se înregistrează un nivel stabil jos al peroxidării lipidelor, dar începând cu ziua a 8 de cultivare se observă o creștere bruscă a DAM cu 47,8 – 58,3%, ceea ce indică asupra unei stări de stres oxidativ, exprimată prin degradarea oxidativă mai intensă a lipidelor.

Prin urmare cultura de spirulină nu prezintă pericolul acumulării radicalilor liberi în biomasă în primele 7 zile ale cultivării, atât în regim de iluminare continuă, cât și în condiții de fotoperiodism. Cultivarea spirulinei în regim de iluminare continuă, care este specific proceselor tehnologice intensive, este sigură din punct de vedere al pericolului de a manifesta potențial prooxidant.

Pigmenții ficobilinici, caracteristici cianobacteriilor au funcția de antene secundare pentru captarea energiei luminii și de protecție antioxidantă a celulelor. În figura 5 sunt prezentate datele cu referire la suma ficobiliproteinelor în componența biomasei de spirulină crescută cu aplicarea celor 2 regimuri de iluminare.

În cazul regimului de iluminare 12/12 ore zi/noapte în primele 3 zile de cultivare are loc creșterea pronunțată a cantității de ficobiliproteine, ceea ce este firesc pentru cultura trecută de la iluminare continuă la fotoperiodicitate. Prin acumularea accelerată a pigmenților ficobilinici încearcă să compenseze deficitul de lumină prin captarea mai intensă a acesteia pe parcursul fazei luminoase. În continuare cultura revine la conținutul normal al pigmenților respectivi, ceea ce poate fi o dovadă a adaptării spirulinei la noile condiții.

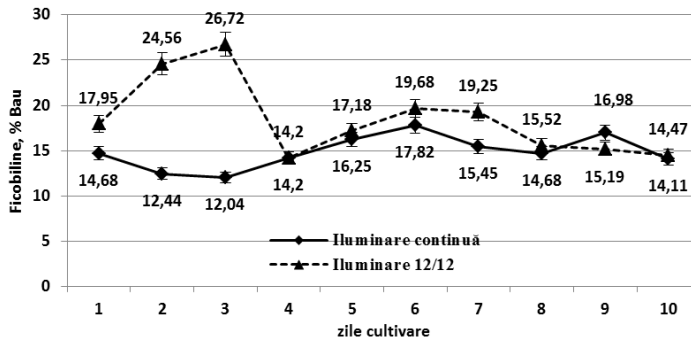


Figura 5. Dinamica acumulării ficobiliproteinelor în biomasa spirulinei pe durata cultivării în condiții de laborator, în dependență de iluminare.

Pentru biomasa cultivată în condiții de iluminare continuă are loc reducerea inițială ușoară (cu 18%) a cantității pigmentilor. În următoarele zile conținutul ficobilinelor este stabil cu oscilări specifice spirulinei.

Cantitatea carotenoizilor în biomasa organismelor fotosintetizante este determinată, în cea mai mare măsură, de intensitatea luminii și regimul de administrare a ei. Acest fapt este determinat de funcția dublă a acestora – fotosintetică și fotoprotectoare. Rezultatele cu referire la oscilarea conținutului de carotenoizi în biomasa de spirulină sunt prezentate în figura 6. Reducerea perioadei de iluminare reduce, respectiv și conținutul de carotenoizi în biomasă (Figura 6).

Conținutul de caroten în biomasa de spirulină crescută în condiții de iluminare periodică s-a redus cu 8,0-44,4% în dependență de ziua colectării. Începând cu ziua a treia de cultivare oscilațiile nivelului de carotenoizi în ambele experiențe sunt foarte asemănătoare, fiind specific un nivel mai redus al pigmentilor în biomasa crescută în condiții de fotoperiodicitate.

Din cele menționate mai sus putem afirma, că iluminarea periodică reduce cantitatea pigmentilor fotosintetici ai *Spirulina platensis* CNMN-CB-11.

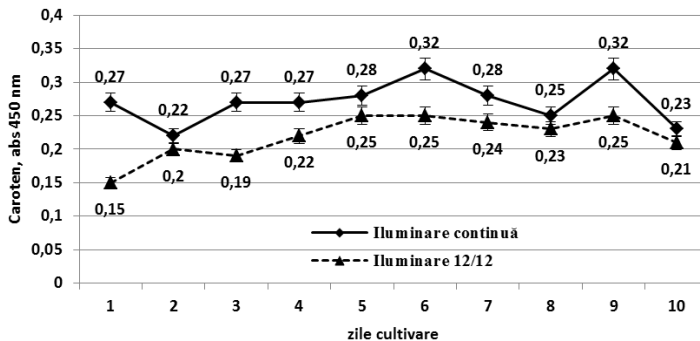


Figura 6. Dinamica acumulării beta-carotenului în biomasa spirulinei pe durata ciclului de cultivare în condiții de laborator, în dependență de iluminare.

Conținutul cloroflei în biomasă de asemenea este influențat de regimul de iluminare. În regim de fotoperiodism conținutul cloroflei s-a redus de 1,56 – 3,25 ori (Figura 7). În regim de iluminare continuă cantitatea de clorofilă în biomasă variază în limite mai mici, decât în regim de fotoperiodicitate. Comună este scăderea acestui parametru la finele perioadei de monitorizare cu 25,6% în cazul iluminării continue și cu 17,6 în cazul iluminării periodice.

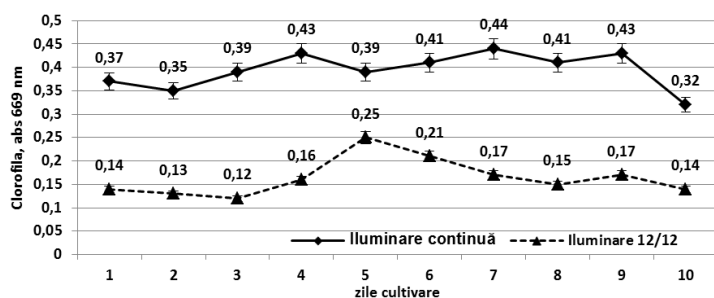


Figura 7. Dinamica acumulării clorofilei în biomasa spirulinei pe durata cultivării în condiții de laborator, în dependență de iluminare.

Concluzii

Tulpina biotehnologică *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 adaptată la regimul de iluminare continuă răspunde în cazul aplicării regimului fotoperiodic de iluminare (12/12 ore zi/noapte) printr-o reducere semnificativă a conținutului de proteine, lipide, carotenoizi și clorofilă și creștere a conținutului hidraților de carbon.

În baza nivelului de oxidare a lipidelor putem afirma, că biomasa obținută în regim de iluminare continuă este sigură pentru consum, în timp ce biomasa crescută în condiții de fotoperiodicitate începând cu ziua a 9-a acumulează o cantitate ridicată de produse ale degradării oxidative ale lipidelor și, deci, poate prezenta potențial prooxidant.

Cu toate că pentru tulpinile "sălbatică" de spirulină fotoperiodicitatea este un fenomen natural, la care pe parcursul evoluției filogenetice acestea s-au adaptat, pentru tulpina luată în studiu, care a fost selectată ca obiect biotehnologic, acest regim de iluminare este impropriu. În condiții de iluminare continuă are loc producerea unei biomase mai calitative, ceea ce se exprimă în primul rând prin conținutul înalt de proteine și nivelul jos de DAM.

Bibliografie

1. Beheshtipour H., et al. Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. //Eur Food Res Technol., 2012, 235 (4), p.719- 728.
2. Belay A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management.// J. Am. Nutraceut. Assoc., 2002, 5, p. 27-48.
3. Belén C.J., Coss R., Niell F.X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. //Aquaculture, 2003, 221 (1-4), p. 331–345.
4. Chabrol E., Charonnet R. Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides. //Presse Med., 1937, 45, p.1713-1714.
5. Colla L.M. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. //Bioresource Technology, 2007, 98(7), p. 1489–1493.
6. Hodges M., Forney F., Prange R. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. //Planta, 1999, 207, p. 604–611.
7. Hoseini S.M., Khosravi-Darani K., Mozafari M.R. Nutritional and Medical Applications of *Spirulina* Microalgae. Mini-Reviews. //Medicinal Chemistry, 2013, 13, p.1231-1237
8. Johnson K.R, Ellis G., Toothill C. The sulfophosphovanillin reaction for serum lipids: a reappraisal. //Clin. Chem. 1977, 23(9), p.1669–1678.
9. Kumar M., Kulshreshtha J., Singh G.P. Growth and biopigment accumulation of

cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. //Brazilian Journal of Microbiology. 2011;42(3)p.1128-1135.

10. Lowry O.H., et al.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. //J. Biol. Chem., 1951, 193, p.265–275.

11. Odobanto K., Aminigo R. E., Abu G.O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. //Bioresource Technology, 2007, 98 (11), p. 2207–2211

12. Pareek A.; Srivastava P., Optimum photoperiod for the growth of *Spirulina platensis*. //Journal of Phytological Research, 2011, 14(2), p. 219-220

13. Rudic V. BioR-studii biomedicale, toxicologice și clinice. Chisinău: Elena VI, 2007, 375 p.

14. Soheili M., Khosravi-Darani K. The potential health benefits of algae and micro algae in medicine: a review on *Spirulina platensis*.// Cur. Nutr. Food Sci., 2011, 7 (4), 279-85.

15. Мельников С.С., Самович Т.В., Мананкина Е.Е., Будакова Е.А. Влияние чередования световых и темновых периодов на продуктивность *Spirulina (Arthrospira) platensis (Nordst.) Geitler*. //Альгология, 2012, 22(2), с. 121-130.

16. Филиппович Ю., Егорова Т., Севастьянова Г. Практикум по общей биохимии. Москва: Просвещение. 1982, с. 284-286.