

С.Г. Каракис¹, Л.М. Карпов¹, Е.Г. Драгоева¹, Т.И. Лавренюк¹,
В.А. Сагариц¹, В.С. Марченко²

¹ Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 68 79 32,
e-mail: karakis_sg@mail.ru

² Одесский региональный центр инноваций и инвестиций
пр. Шевченко, 4, Одесса, 65032, Украина

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БИОМАССЫ ШТАММОВ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

*Проведено сравнительное изучение биохимического состава биомассы родительского штамма *Arthrospira (Spirulina) platensis* дикого типа и полученных из него мутантных штаммов 198В и 27G с повышенным содержанием метионина в белках и биомассе. Установлено, что общее содержание белка, незаменимых аминокислот, с-фикоцианина, аллофикоцианина и хлорофилла *a* в биомассе мутантных штаммов выше, чем у штамма дикого типа. Штамм 198В отличается также повышенным содержанием каротиноидов. Выявленные отличия свидетельствуют о повышенной питательной ценности и антиоксидантной активности биомассы мутантных штаммов, что позволяет рассматривать их как перспективные источники БАВ и рекомендовать для дальнейшего изучения в качестве адаптогенов.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Spirulina spp.*, белок, аминокислоты, пигменты.

В условиях ухудшающейся экологической обстановки особую актуальность приобретает поиск новых препаратов биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения, способствующих более быстрой адаптации человеческого организма к меняющимся условиям окружающей среды.

Среди природных адаптогенов по эффективности и спектру положительного биологического действия на организм человека и лабораторных животных в неблагоприятных условиях окружающей среды выделяются цианобактерии из рода *Arthrospira (Spirulina)*: *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*, *Spirulina fusiformis* и некоторые другие [1, 11]. В биомассе этих цианобактерий содержится до 70 % белка с полным набором незаменимых аминокислот, до 11 % липидов, в составе которых имеется γ -линоленовая кислота, до 20 % углеводов, комплекс почти всех, необходимых для жизни человека витаминов, широкий спектр важнейших микроэлементов [9,13]. Благодаря своему уникальному составу биомасса спирулины обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим, иммуностимулирующим действием и способна корректировать возникающие под воздействием неблагоприятных внешних факторов изменения метаболизма [1,11]. Этими способностями обладает не только биомасса спирулины, но и отдельные ее компоненты, особенно такие как β -каротин, с-фикоцианин, аллофикоцианин, хлорофилл *a*, α -токоферол, фенолы и др. [11, 7].



Однако потенциальные возможности спирулины как источника ценных биологически активных веществ могут быть улучшены. Учитывая тот факт, что по содержанию метионина белок спирулины уступает таким лучшим пищевым белкам как яичный альбумин и казеин коровьего молока [2, 9, 13], нами были проведены селекционно-генетические исследования по созданию штаммов *S. platensis* с повышенным содержанием метионина [3, 4]. В результате проведенных работ создана коллекция мутантных штаммов *S. platensis* с измененными биохимическими свойствами (работы по селекции в 1985-1997 годах проводились под руководством И.И.Броуна). Среди полученных мутантов максимальное содержание метионина в биомассе наблюдали у штаммов 198В и 27G.

Цель данной работы — провести сравнительное изучение биохимического состава биомассы родительского штамма *Spirulina platensis* дикого типа и мутантных штаммов 198В и 27G для оценки перспектив их использования в качестве источников препаратов БАВ.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl. из коллекции культур цианобактерий Одесского национального университета имени И.И. Мечникова: родительский штамм *Moysse* дикого типа (ДТ) и полученные из него селекционно-генетическими методами мутантные штаммы 198В и 27G.

Для получения биомассы штаммы цианобактерий выращивали в среде Зарука [15] в условиях накопительной культуры при круглосуточном освещении лампами ЛД-40 и продувке воздухом. Культивирование штаммов проводили в стеклянных сосудах типа параллелепипеда размером 40 x 90 x140 мм с содержанием ростовой среды 400 мл при освещении 6-8 клк и $t = 35$ °С. Толщина клеточной суспензии между освещаемыми параллельными поверхностями была 40 мм. Начальный засев — 0,4 г/л сухой биомассы. После выхода культур в стационарную фазу роста биомассу собирали фильтрованием через мелкоячеистую сеть, тщательно промывали дистиллятом и лиофильно высушивали.

Содержание белка в биомассе определяли по методу Лоури [5], углеводов — антроновым методом [5], жиров — по методу Рушковского [6]. Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов определяли путем их экстракции из биомассы 96 % этанолом [12]. Содержание с-фикоцианина и аллофикоцианина определяли путем их экстракции из биомассы 20 мМ Na-ацетатным буфером (рН 5,5) и последующей спектроскопии экстрактов при OD_{650} и OD_{620} . Содержание пигментов в биомассе рассчитывали по формулам, представленным в работе [14].

Полный аминокислотный анализ биомассы (суммарное содержание свободных и связанных в белках аминокислот) проводили с помощью аминокислотного анализатора «Hitachi-836» после ее гидролиза 6N HCl в запаянных стеклянных ампулах при температуре 105 °С в течение 24 часов.

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены результаты общего биохимического анализа биомассы исследуемых штаммов *S. platensis*. Показатели биохимического состава штамма ДТ не противоречат данным, представленным в работах других исследователей [9,13]. В отличие от родительского штамма ДТ, мутантные штаммы характеризуются повышенным содержанием белков и пониженным содержанием углеводов. Штамм 198В имеет также пониженное содержание липидов. Очевидно, повышение синтеза белковой продукции у штамма 27G происходит в основном за

счет снижения синтеза углеводов, а у штамма 198В – за счет снижения синтеза как углеводов, так и липидов.

Таблица 1

**Общий биохимический состав биомассы штаммов *Spirulina platensis*
(% от веса сухой биомассы)**

№ п.п.	Штамм	Белки	Углеводы	Липиды
1	ДТ	60,5 ± 3,2	19,6 ± 3,1	6,3 ± 1,2
2	198В	71,4 ± 1,8	11,2 ± 1,8	2,1 ± 0,1
3	27G	78,1 ± 1,3	9,0 ± 0,8	5,4 ± 0,1

В таблице 2 представлены результаты полного аминокислотного анализа биомассы исследуемых штаммов. Согласно этим данным, у мутантных штаммов по сравнению со штаммом ДТ наряду с повышением суммы определяемых аминокислот наблюдается повышение содержания незаменимых аминокислот в биомассе. Так, содержание незаменимых аминокислот в биомассе у мутантов 198В и 27G в 1,5 и 1,7 раз выше, чем у штамма ДТ, соответственно. Изменения в композиции определяемых аминокислот у мутантных штаммов касаются существенным образом содержания метионина. Содержание метионина в сумме определяемых аминокислот у штаммов 198В и 27G в 1,6 и 1,4 раза выше, чем у штамма ДТ, соответственно. По содержанию метионина в биомассе (% от сухого веса биомассы) эти штаммы превосходят штамм ДТ в 2,2 раза.

Таблица 2

Содержание аминокислот в биомассе штаммов *Spirulina platensis*

Аминокислота	% от веса сухой биомассы			% от веса определяемых аминокислот		
	штамм			штамм		
	ДТ	198В	27G	ДТ	198В	27G
asp	4,97±0,14	7,28±0,05	6,60	9,72±0,14	10,33±0,08	8,08
thr*	2,78±0,09	4,00±0,01	4,61	5,44±0,04	5,67±0,09	5,64
ser	2,75±0,06	3,57±0,01	3,96	5,38±0,14	5,07±0,05	4,84
glu	7,71±0,15	9,78±0,31	11,39	15,08±0,43	13,89±0,24	13,95
gly	2,68±0,09	3,66±0,01	4,07	5,23±0,04	5,19±0,09	4,98
ala	4,50±0,26	5,81±0,21	8,16	8,80±0,18	8,24±0,17	10,00
val*	3,00±0,21	3,70±0,10	5,18	5,86±0,20	5,25±0,06	6,34
met*	1,48±0,12	3,20±0,06	3,26	2,90±0,12	4,54±0,01	4,00
ile*	2,43±0,18	3,65±0,16	4,44	4,74±0,16	5,18±0,14	5,43
leu*	4,84±0,19	6,93±0,00	7,49	9,47±0,09	9,84±0,15	9,17
tyr	2,51±0,12	2,92±0,05	4,26	4,91±0,07	4,14±0,01	5,22
phe*	2,47±0,11	3,36±0,25	3,44	4,84±0,03	4,77±0,43	4,21
lys*	2,54±0,13	3,81±0,08	3,92	4,96±0,06	5,41±0,04	4,80
his*	0,79±0,05	1,10±0,01	0,93	1,55±0,05	1,56±0,03	1,14
arg*	3,62±0,15	5,42±0,10	6,79	7,08±0,09	7,70±0,03	8,31
pro	2,07±0,06	2,27±0,19	3,17	4,05±0,05	3,21±0,22	3,88
Сумма	51,56±2,01	70,43±1,04	82,50	100	100	100
Сумма незаменимых	24,37	35,16	40,89	47,26	49,92	49,05

* – незаменимые аминокислоты



Особенно важным является тот факт, что в биомассе мутантных штаммов в повышенных количествах содержатся серусодержащие аминокислоты — метионин и серин, а также фенилаланин, который относится к фенольным соединениям. Роль этих аминокислот в функционировании системы антиоксидантной защиты уже установлена.

На основе данных аминокислотного анализа биомассы штаммов можно предположить, что биомасса мутантных штаммов может быть более эффективной пищевой добавкой, используемой для балансировки белкового питания, чем биомасса штамма ДТ.

Учитывая тот факт, что многие пигменты цианобактерии *S. platensis* являются антиоксидантами и оказывают иммуномодулирующее и иммуностимулирующее действие на человека и лабораторных животных в условиях патологий и воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды [1,11], нами было проведено сравнительное изучение пигментного состава биомассы мутантных штаммов и штамма ДТ.

Согласно полученным нами данным (табл. 3), показатели пигментного состава биомассы штамма ДТ находятся в пределах показателей, представленных в литературе [9]. В то же время нами было установлено, что штамм 198В превосходит штамм ДТ по содержанию каротиноидов в 1,9 раза, хлорофилла *a* — в 1,4 раза, с-фикоцианина — в 1,7 раза, аллофикоцианина — в 1,6 раза. Также было найдено, что штамм 27G отличается от других изученных штаммов самым высоким содержанием фикобилипротеинов. В частности, содержание с-фикоцианина и аллофикоцианина у штамма 27G в 3,2 и 2,4 раза выше, чем у штамма ДТ, соответственно. На основе представленных выше данных можно предположить, что биомасса мутантных штаммов может обладать более сильным антиоксидантным и иммунокорректирующим действием, чем биомасса штамма ДТ.

Таблица 3

Содержание пигментов в биомассе штаммов *Spirulina platensis* (% от веса сухой биомассы)

Штамм	Каротиноиды	Хлорофилл <i>a</i>	С-фикоцианин	Аллофикоцианин
ДТ	0,22± 0,01	0,93± 0,04	5,59± 0,02	3,04± 0,39
198В	0,42± 0,02*	1,29± 0,07*	9,49± 0,06*	4,77± 0,16*
27G	0,19± 0,02	1,25± 0,06*	17,64± 0,46*	7,30± 0,48*

Примечание: * — разница со штаммом ДТ достоверна ($p < 0,05$)

В результате проведенных исследований установлено, что биомасса мутантных штаммов *Spirulina platensis* 198В и 27G отличается от биомассы штамма ДТ повышенным содержанием аминокислот, в том числе незаменимых, особенно — метионина. Улучшенный аминокислотный состав биомассы мутантных штаммов позволяет рассматривать их в качестве перспективных пищевых добавок для коррекции белкового состава пищевого рациона человека и домашних животных. В биомассе мутантных штаммов, в отличие от штамма ДТ, повышено содержание пигментов: с-фикоцианина, аллофикоцианина и хлорофилла *a*. Мутантный штамм 198В отличается также повышенным содержанием каротиноидов. Повышенное содержание в биомассе мутантных штаммов целого ряда природных антиоксидантов (метионин, серин, фенилаланин, с-фикоцианин, аллофикоцианин, каротиноиды, хлорофилл *a*) позволяет предположить, что она, в отличие от биомассы штамма

ДТ, будет обладать более сильным антиоксидантным действием при использовании ее в качестве пищевых добавок.

Таким образом, выявленные отличия в биохимическом составе биомассы мутантных штаммов и штамма ДТ позволяют рассматривать мутантные штаммы в качестве перспективных источников новых препаратов БАВ и рекомендовать их для дальнейшего изучения в качестве адаптогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинкова Л.П., Горобец О.Б., Батуро А.П. Биологическая активность спирулины // Микробиология, эпидемиология, иммунобиология. — 2001. — №2. — С.114 — 118.
2. Блок Р. и Боллинг Д. Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов. — М.: Издательство иностранной литературы, 1949. — С. 368-371.
3. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Сагариц В.А., Карпов Л.М. Особливості метаболізму мутантного штаму *Arthrospira (Spirulina) platensis* G-27 — надпродукта с-фікоціаніну // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — т. 10. — В. 7. — С. 44 — 50.
4. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Сагариц В.А., Карпов Л.М. Селекція мутантних штамів *Spirulina platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — т. 10, в. 3. — С. 55 — 62.
5. Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1984. — Т. 2. — С. 292 — 358.
6. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С.200 — 201.
7. Brown I.I., Karakis S.G., Filippova T.O., Sarkisova S.A., Levitskiy A.P. The physiological effects of phycocyanin crude extract obtained from the G-27 overproducing strain of *Spirulina platensis* // 2nd European Workshop. Biotechnology of microalgae. — 1995. — P.70 — 73.
8. Burton G.W., Ingold K.U. Beta-carotene: an unusual type of antioxidant // Science. — 1984. — 224. — P. 569 — 73.
9. Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism // Microbiol. Rev. — 1983. — 47. — P. 551 — 558.
10. Jaime I., Mendiola J.A., Herrero M., Soler-Rivas C., Santoyo S., Senorans F.J., Cifuentes A., Ibanez E. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD // J. Sep. Sci. — 2005. — V.28. — №16. — P.2111-2119.
11. Khan Z., Bhadouria P., Bisen P.S. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina* // Curr. Pharm. Biotechnol. — 2005. — №5. — P.373 — 379.
12. Litchenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // In: Packer L., Glazer N, editors. Methods in enzymology. — San Diego: Acad. Press. — 1987. — V.148. — P. 350 — 381.
13. Reed R. H., Warr S. R. C., Richardson D. L., Moore D. J. and Stewart W. D. P. Blue-green algae (cyanobacteria): prospects and perspectives // Plan. and Soil. — 1985. — V. 89. — P. 97 — 106.
14. Tandeau de Marsac N. [34] Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra // In: Packer L., Glazer N, editors. Methods in enzymology. — San Diego: Acad. Press. — 1988. — V.167. — P.318 — 328.
15. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. // Ph.D. Thesis, University of Paris. — 1966. — P. 85.



С.Г. Каракіс¹, Л.М. Карпов¹, О.Г. Драгоєва¹, Т.І. Лавренюк¹,
В.А. Сагаріц¹, В.С. Марченко²

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 32, e-mail: karakis_sg@mail.ru

² Одеський Регіональний центр інновацій та інвестицій, пр. Шевченка, 4, Одеса, 65032, Україна

БІОХІМІЧНИЙ СКЛАД БІОМАСИ ШТАМІВ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Реферат

Здійснено порівняльне вивчення біохімічного складу біомаси батьківського штаму *Arthrospira (Spirulina) platensis* дикого типу та отриманих із нього мутантних штамів 198В і 27G з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі. Встановлено, що вміст білка, незамінних амінокислот, с-фікоціаніну, алофікоціаніну, хлорофілу *a* в біомасі мутантних штамів вищий, ніж у штаму дикого типу. Штам 198В відзначався також підвищеним вмістом каротиноїдів. Виявлені відміни свідчать про високу поживну цінність та антиоксидантну активність біомаси мутантних штамів, що дає змогу розглядати їх як перспективні джерела препаратів БАР та рекомендувати їх для подальшого вивчення в якості адаптогенів.

К л ю ч о в і с л о в а: *Spirulina* spp., білок, амінокислоти, пігменти.

S.G. Karakis¹, L.M. Karpov¹, E.G. Dragoeva¹, T.I. Lavrenjuk¹,
V.A. Sagarcic¹, V.S. Marchenko²

¹ Odesa National Mechnikov University, Dvoryanskaya Str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, тел.: 8 (0482) 68 79 32, e-mail: karakis_sg@mail.ru

² Odesa Regional Centre of investment and innovation, Shevchenko Pr., 4, Odesa, 65032, Ukraine

BIOCHEMICAL BIOMASS CONTEST OF THE STRAIN OF *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Summary

Comparative analysis of biochemical composition of the wild strain *S. platensis* (Nordst.) Geitl. and its mutants, selected after chemical mutagenesis, has been carried out. It was found out that mutant strains 198B and 27G contain higher quantities of total protein, essential amino acids, *c*-phycocyanin, allophycocyanin and chlorophyll *a* than parental wild strain *S. platensis*. The strain 198B is also characterized by increased content of carotenoids. The revealed biochemical peculiarities of mutant strains suggest that strains 198B and 27G might serve as an additional source of essential amino acids as well as phycobiliproteins and carotenoids. That is why mutant strains 198B and 27G can be considered as the prominent resources of bioactive substance and recommended for further study of their adaptogenic activity.

К e y w o r d s: *Spirulina* spp., protein, amino acids, pigments.

