

**ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА И
ФИКОБИЛИПРОТЕИНОВ В УСЛОВИЯХ НАКОПЛЕНИЯ
ГЕРМАНИЯ (IV) В БИОМАССЕ ЦИАНОБАКТЕРИИ *SPIRULINA
PLATENSIS* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА СРЕДЕ С ГЕРМАНИЙ -
СОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

¹Джур Светлана, ²Бульмага Валентина, ²Зосим Лилиана, ¹Рудь Людмила,
¹Чепой Лилиана, ¹Кирияк Татьяна, ²Гуля Аурелиан, ¹Рудик Валерий

¹*Институт Микробиологии и Биотехнологии*

²*Молдавский Государственный Университет*

Referat

Au fost studiate modificările conținutului de proteine și ficobiliproteine în condițiile acumulării germaniului (IV) în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* la creșterea ei pe un mediu cu compuși ce conțin acest element. S-a stabilit, că în condițiile acumulării

germaniului de către cianobacteria *Spirulina platensis* la cultivarea ei în prezența unor compuși neorganici și organici ai acestui element, conținutul de proteină în biomasă prezintă niveluri (cu mici variații) în limitele controlului. Compușii organici $\text{Me}_2\text{Ge}(\text{F})\text{-P}(\text{HMe})_2$, $\text{ArP}=\text{C}(\text{PhCH}=\text{CHCHO})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ și Me_2GeCl_2 la o concentrație a lor de 10 mg/l contribuie la creșterea cu 13,0-15,0% a conținutului de proteine în biomasă de spirulină. Pentru ficobiliproteine este caracteristică o creștere a conținutului lor în biomasă. Cel mai mare conținut de ficobiliproteine, cu 25,5-36,2% s-a determinat în cazul compusului $\text{ArP}=\text{C}(\text{Te})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$, precum și în prezența concentrațiilor de 30 mg/l GeO_2 și 10 mg/l GeSe_2 .

Cuvinte cheie: *Spirulina platensis*, compuși ai germaniului, acumularea, proteine, ficobiliproteine.

Depus la redacție 24 iunie 2020

Adresa pentru corespondență: Djur Svetlana, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova, e-mail: djurlana@hotmail.com

Введение

Недостаточная обеспеченность населения микроэлементами является очень серьезным фактором, отрицательно влияющим на состояние здоровья населения и особенно детей. Вследствие этого необходима пищевая коррекция микроэлементного статуса путем широкого использования в повседневном, а также профилактическом и лечебном питании продуктов, обогащаемых микроэлементами, и биологически активных добавок к пище (БАД) – дополнительных источников этих микроэлементов. К сожалению, во многих случаях для производства БАД специализированных продуктов применяются неорганические соли микроэлементов, обладающие, во-первых, в большинстве случаев относительно невысокой усвояемостью и, во-вторых, сравнительно низким пределом допустимой концентрации, что повышает опасность их токсического действия при возможных передозировках [20]. Так как в повседневной жизни человек потребляет микроэлементы в основном в органической форме в составе растительных и животных продуктов, использование в пищевых целях органических соединений для большинства микроэлементов представляется более оправданным, чем применение их неорганических соединений. Поэтому, как никогда актуален поиск новых пищевых источников микроэлементов со сбалансированным составом природного происхождения.

Одним из таких пищевых источников органических форм микроэлементов является цианобактерия *S. platensis*, благодаря легкой усвояемости, биохимическому составу и способности во время роста аккумулировать микроэлементы из питательной среды, включая их в состав своих макромолекул [8, 11-12]. Биоконпоненты *S. platensis* обладают фармакологическими свойствами - это микро- и макроэлементы, свободные аминокислоты, пептиды, каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты, витамины и т.д. [3, 9-10]. В то же время спирулина представляет собой очень удобную матрицу для встраивания микроэлементов. Одним из важнейших полезных свойств спирулины является антиоксидантное действие, которое может быть существенно усилено путем включения в ее состав биодоступного германия [12].

Органический германий обладает широким спектром биологического действия: обеспечивает перенос кислорода к тканям организма, повышает его иммунный статус, проявляет антивирусную и противоопухолевую активность. Перенос кислорода, он предупреждает развитие кислородной недостаточности на тканевом уровне, уменьшает риск развития и так называемой кровяной гипоксии, возникающей при уменьшении гемоглобина в эритроцитах [1, 6, 16, 18, 21].

Во многих растениях, издавна применяемых в китайской и тибетской медицине, содержится повышенное количество германия [1]. Среди растений, способных адсорбировать германий и его соединения из почвы, лидером является женьшень. Кроме того, он содержится в чесноке, томатах (томатном соке), бобах, есть он в рыбе и морских продуктах [19]. Однако для обеспечения суточной потребности организма в германии необходимо выпивать, например, до 10 л томатного сока в день или съесть до 5 кг лососины, что нереально по физическим возможностям организма человека [17].

В некоторых странах Восточной Азии (Япония, Корея, Тайвань, Китай) германий широко потребляется из следующих источников: продукты с повышенным содержанием германия (женьшень, водяной орех, семя крушины, чеснок и окопник), пищевые добавки, содержащие органический германий и др. [1, 4, 15].

При получении биомассы, обогащенной германием, важно изучить как соединения, содержащие германий, влияют не только на условия накопления этого элемента в биомассе, но и на ее биохимический состав, в частности, на содержание белка и фикобилипротеинов. Содержание белка доходит до 70% в спирулине [14] и оно является одним из главных биохимических показателей физиологического состояния цианобактерии, а фикобилипротеины играют немаловажную роль в фотосинтетическом механизме клетки. Если содержание этих клеточных компонентов значительно снижается, то это говорит о токсичности культуры. А так как биомасса спирулины рассматривается в качестве полезного, сбалансированного по составу пищевого источника германия, предназначенного в первую очередь для использования в профилактических целях в составе БАД и фармацевтических препаратов, показатели этих биохимических компонентов должны быть в норме.

Таким образом, **целью** данной работы являлось изучение изменения содержания белка и фикобилипротеинов в условиях накопления германия в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis* при ее культивировании в присутствии германий - содержащих соединений различной природы.

Материалы и методы

Объект изучения: Штамм цианобактерии *Spirulina platensis* CNMN-SB-11 [13].

Процесс и условия культивирования. Культивирование осуществлялось на модифицированной минеральной среде Zarrouk в колбах Эрленмейера с объемом суспензии спирулины в питательной среде 100 мл. В среду были добавлены два неорганических соединения германия: GeO_2 и GeSe_2 и 7 органических соединений, содержащих германий: Me_2GeCl_2 - (FM-1), $\text{Me}_2\text{Ge}(\text{OMe})_2$ - (FM-2), $\text{ArP}=\text{C}(\text{Cl})\text{Ge}(\text{F})(\text{Tip})\text{t-Bu}$ - (FM-3), $\text{ArP}=\text{C}(\text{Te})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ - (FM-8),

ArP=C(SeSe)Ge(Tip)t-Bu – (FM-9), ArP=C(PhCH=CHCHO)Ge(Tip)t-Bu - (FM-10) и Mes₂Ge(F)-PHMes - (FM-11). Соединения были добавлены в среду в следующих концентрациях: 10, 20 и 30 мг/л в первый день культивирования. Для растворения органических соединений германия был использован изопропанол, поскольку они нерастворимы в воде. Такое же количество изопропанола было добавлено в контроль. Что касается неорганических соединений германия, то в случае GeO₂ была использована стандартная среда Zargrouk, а в случае GeSe₂ - среда Zargrouk с уменьшенным содержанием соды и сульфатов (2 г/л и 0,4 г/л соответственно).

На протяжении всего срока культивирования соблюдались следующие параметры: начальная плотность культуры (иннокулят) – 0,4-0,45г/л АСБ; температура 28-32°C, рН среды 8-10, освещение - 37-55 мкмоль фотонов / м²/с. Культура периодически перемешивалась на универсальной лабораторной мешалке типа WU-4 с частотой колебаний 2500 Гц. Продолжительность цикла культивирования - 144 часа.

Методы исследования:

Содержание белка в биомассе было определено спектрофотометрически по методу Лоури с использованием реактива Фолина - Чокальтеу [5].

Содержание фиколипидов было определено спектрофотометрически в водном экстракте, полученном из биомассы спирулины с использованием молярного коэффициента для фикоцианина и алофикоцианина [2].

Содержание германия в биомассе спирулины было определено спектрофотометрическим методом с использованием фенилфлуорона [7].

Все полученные экспериментальные результаты были статистически обработаны с применением описательных статистических инструментов, а расчет статистических показателей проводился с использованием возможностей MS Excel.

Тест Граббса применялся как тест на достоверность, а тест Стьюдента в качестве теста на значимость.

При анализе данных, представленных в статье, указываются те различия между полученными данными, для которых $P < 0,01$ или $P < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Введение в питательную среду нового химического соединения, может привести к существенному изменению биохимического состава биомассы цианобактерии, поскольку в зависимости от природы соединения, клетки спирулины могут активно накапливать и подвергать трансформации химические элементы из состава введенного соединения. Это может как улучшить, так и негативно сказаться на качестве полученной биомассы. Одним из главных биохимических показателей физиологического состояния цианобактерии является белок, поскольку его содержание достигает 70% [14].

На Рисунке 1 представлены результаты по содержанию белка и накоплению германия в биомассе *S. platensis* при ее культивировании в присутствии германий – содержащих соединений, различной природы.

Согласно полученным данным, органические соединения германия по - разному влияют на синтез белка клетками цианобактерии, проявляя как стимулирующий, так и ингибирующий эффект (рис.1А.).

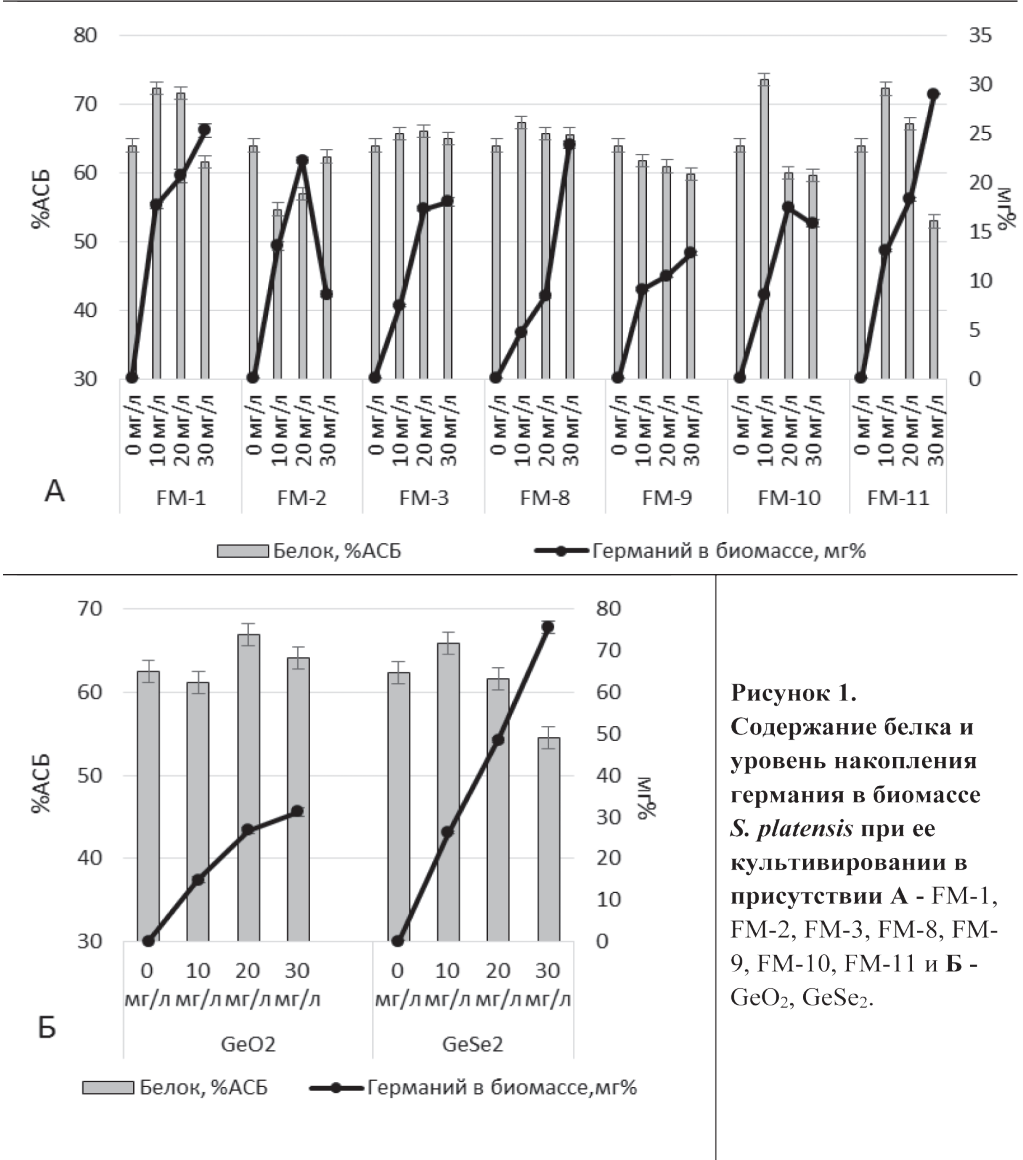


Рисунок 1. Содержание белка и уровень накопления германия в биомассе *S. platensis* при ее культивировании в присутствии А - FM-1, FM-2, FM-3, FM-8, FM-9, FM-10, FM-11 и Б - GeO₂, GeSe₂.

Накопление германия при этом, для большинства соединений зависит в первую очередь от вносимой концентрации. Так, при добавлении соединения FM-1 в концентрациях 10 и 20 мг/л наблюдается увеличение содержания белка на 13,0% и 11,9%, соответственно по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение концентрации FM-1 приводит к снижению количества белка до уровня контроля. Наибольшее содержание белка (72,32% АСБ), было отмечено при добавлении соединения FM-1 в концентрации 10 мг/л. При этом, накопление германия в присутствии данного соединения, увеличивается с ростом добавляемой концентрации в среду культивирования (от 17,7 мг% до 25,3 мг%).

Присутствие соединения FM-2 в среде при культивировании цианобактерии негативно сказывается на синтезе белка. Уровень его содержания во всех

вариантах ниже значения контроля (так при концентрации 10 мг/л количество белка в биомассе уменьшается на 14,5%). Наоборот, аккумуляция германия, увеличивается до достижения концентрации соединения в 20 мг/л. Дальнейшее увеличение концентрации приводит к снижению уровня накопления германия.

Добавление соединений FM-3 и FM-8 во всех изученных концентрациях, не способствует существенным изменениям в содержании белка по сравнению с контрольной пробой. При этом, содержание германия в биомассе спирулины тем выше, чем больше вводимая концентрация соединения.

Химическое соединение FM-9 отрицательно влияет на накопление белка: чем выше вносимая концентрация соединения, тем ниже содержание белка по сравнению с контролем. Меньшее снижение уровня содержания белка (на 3,5%) было отмечено при наименьшей концентрации (10 мг/л) FM-9. Накопление германия в присутствии этого соединения, наоборот растет с увеличением концентрации, хотя и не так значительно по сравнению с другими соединениями (12,8 мг% при концентрации 30 мг/л).

При добавлении соединения FM-10 в концентрации 10 мг/л наблюдается увеличение содержания белка (на 15% по сравнению с контролем), но дальнейшее повышение вводимой концентрации FM-10 отрицательно влияет на синтез белка, приводя к незначительному снижению его уровня на 7%, по сравнению с контрольной пробой. Для этого соединения, уровни накопленного германия увеличиваются с 8,6 до 17,5 мг% при концентрациях FM-10 10-20 мг/л. При концентрации 30 мг/л наблюдается снижение уровня аккумуляции германия в биомассе спирулины, который составляет 15,8 мг%.

Как видно из Рисунка 1А, накопление германия при добавлении соединения FM-11 прямо пропорционально вводимой концентрации германий - содержащего соединения. Содержание белка в биомассе повышается при концентрации 10 мг/л и составляет 72,3 % АСБ (что на 12,9% больше, чем в контроле). С дальнейшим повышением концентрации вещества в среде содержание белка в биомассе снижается. Так при концентрации вещества 30 мг/л, уровень белка ниже на 17,3% по сравнению с контролем и составляет 52,9 % АСБ.

В присутствии неорганических соединений германия (GeO_2 и GeSe_2), при повышении их концентрации в среде происходит увеличение уровня аккумуляции германия, а количество белка в биомассе меняется не так существенно, как в случае применения органических соединений (Рис 1Б). Минимальное накопление германия - 26,3 мг% происходит в присутствии GeSe_2 в концентрации 10 мг/л. В этих же условиях наблюдается незначительное увеличение количества белка в биомассе. При дальнейшем увеличении концентрации вещества происходит также повышение уровня накопления германия, в то время как количество общего белка снижается. Так, при добавлении селенида германия в концентрации 30 мг/л накопление германия в биомассе составляет 5,7 мг%, а количество белка уменьшается на 13 % по сравнению с контролем.

Таким образом, в условиях аккумуляции германия цианобактерией *Spirulina platensis* при ее культивировании в присутствии химических соединений этого элемента различной природы, содержание белка в биомассе сохраняется примерно на уровне контроля (с небольшой вариацией). Органические

соединения $\text{Mes}_2\text{Ge}(\text{F})\text{-PHMes}$, $\text{ArP}=\text{C}(\text{PhCH}=\text{CHCHO})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ и $\text{Mes}_2\text{GeCl}_2$ в концентрации 10 мг/л способствуют увеличению содержания белка в биомассе спирулины на 13,0-15,0 %, по сравнению с контролем. Что касается аккумуляции данного элемента в биомассе, то для большинства соединений (в пределах исследуемых концентраций), чем выше содержание германия в среде, тем больше его накапливается в биомассе. Исключение составляют органические соединения FM-2 и FM-10 – при добавлении которых, в концентрации 30 мг/л, количество накопленного германия снижается по сравнению с концентрацией 20 мг/л.

Влияние соединений, содержащих германий, на количество фикобилипротеинов в биомассе цианобактерии *S. platensis* и накопление германия представлено на Рисунке 2.

Добавление соединений FM-2 и FM-3 не влияет на содержание фикобилипротеинов. Их значения колеблются в пределах контроля, в то время как уровень содержания германия в биомассе спирулины растёт с 7,5 до 22,3 мг%.

Добавление соединения FM-1 также, как и в случае соединений FM-2 и FM-3, значительно не влияет на уровень фикобилипротеинов. Только в концентрации 10 мг/л наблюдается снижение содержания фикобилипротеинов на 18,7% по сравнению с контролем. Уровень накопления германия в биомассе спирулины растёт с увеличением в питательной среде концентрации этого соединения.

Введение в среду соединений FM-8 и FM-9, во всех трех концентрациях, способствует повышенному синтезу фикобилипротеинов в биомассе спирулины (на 17,9 - 36,2% выше по сравнению с контролем). Наибольшее содержание фикобилипротеинов - 22,35% АСБ (на 36% выше, чем в контроле) было отмечено при добавлении FM-8 в концентрации 10 мг/л. С дальнейшим увеличением концентрации добавляемого соединения содержание фикобилипротеинов несколько снижается, но все равно достаточно высоко по сравнению с контролем. В присутствии соединения FM-9 максимальное содержание фикобилипротеинов - 20,6% АСБ (на 25,5% выше, чем в контроле) наблюдалось при концентрации 20 мг/л. Нужно отметить, что чем выше концентрация добавляемых соединений FM-8 и FM-9, тем выше содержание германия в биомассе спирулины, но в присутствии FM-8 при концентрации 30 мг/л, накапливается почти в два раза больше элемента, чем в присутствии FM-9 при той же концентрации (23,85 мг% и 12,81 мг%).

Органическое соединение германия FM-10 в концентрации 10 мг/л не влияет на содержание фикобилипротеинов, однако с увеличением его концентрации (20 и 30 мг/л) наблюдается ингибирование синтеза фикобилипротеинов, их содержание уменьшается на 25,6% и на 44,5% соответственно по сравнению с контролем. В данном случае, уровень аккумуляции германия увеличивается при добавлении соединения в концентрациях 10 и 20 мг/л, а с дальнейшим увеличением начинает снижаться.

Добавление химического соединения FM-11 способствует как аккумуляции германия в биомассе, так и синтезу фикобилипротеинов, особенно в концентрации 30 мг/л, содержание фикобилипротеинов при этой концентрации составляет 20,74 %АСБ, что на 26,4% выше, чем в контрольной пробе, а германия - 29,1 мг%.

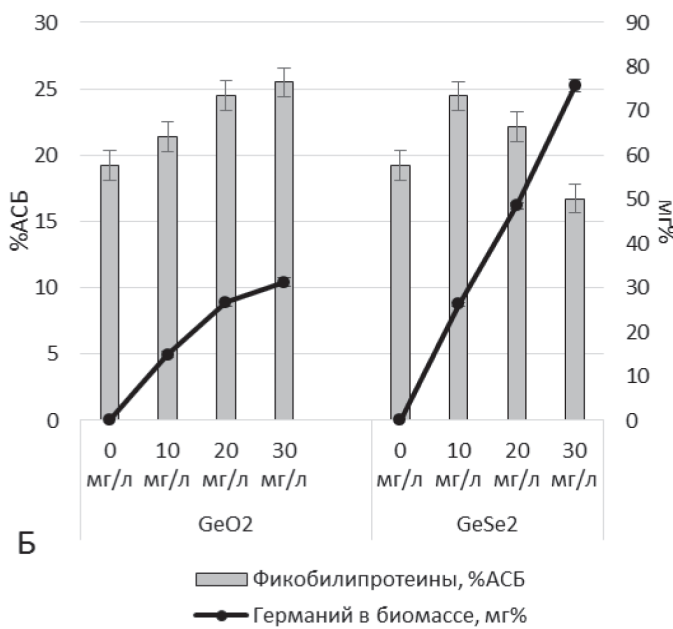
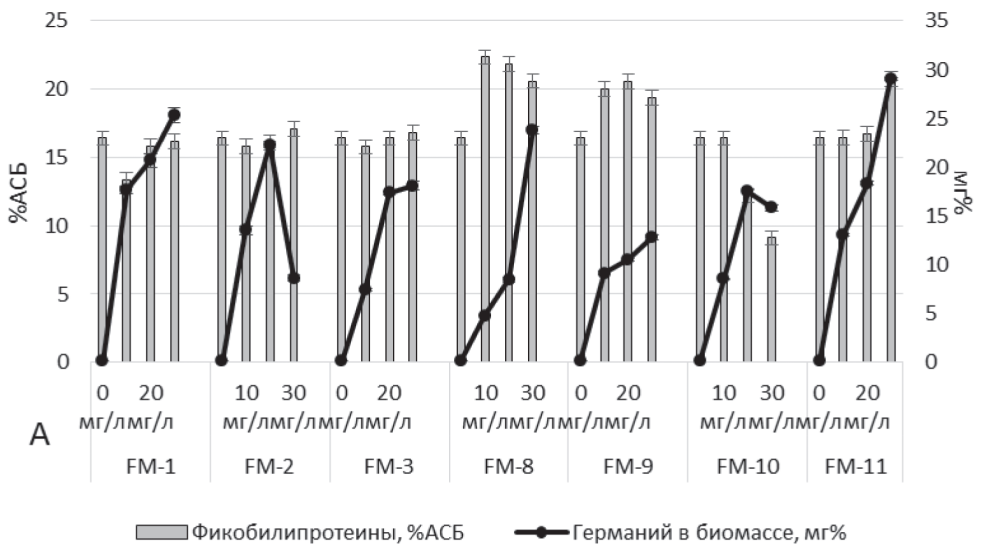


Рисунок 2.
Содержание фикобилипротеинов и накопление германия в биомассе *S. platensis* при ее культивировании в присутствии А - FM-1, FM-2, FM-3, FM-8, FM-9, FM-10, FM-11 и Б - GeO₂, GeSe₂.

Присутствие неорганических соединений (GeO₂ и GeSe₂) в среде в целом положительно влияет на синтез фикобилипротеинов (рису 2В). Аккумуляция германия в присутствии соединения GeO₂ повышается с увеличением концентрации вводимого соединения. Увеличение содержания германия происходит одновременно с повышенным синтезом фикобилипротеинов в биомассе спирулины. Максимальное содержание фикобилипротеинов 25,5% АСБ, что на 32,7% больше, чем в контроле, было отмечено при добавлении GeO₂ в концентрации 30 мг/л. При этом содержание германия составляет 31,2 мг%.

Что касается второго неорганического соединения - GeSe_2 , то при концентрации 10 мг/л наблюдается максимальное содержание фикобилипротеинов (24,48% АСБ, что на 17,8% выше контроля). С повышением вводимой концентрации селенида германия (IV), содержание фикобилипротеинов начинает уменьшаться. Так, при добавлении GeSe_2 в концентрации 30 мг/л, содержание фикобилипротеинов снижается на 13% по сравнению с контролем. При этом, накопление германия прямо пропорционально вводимой концентрации соединения: чем выше концентрация соединения, тем выше степень аккумуляции элемента. Максимальное содержание германия (75,7 мг%) в биомассе спирулины было отмечено при концентрации GeSe_2 в среде - 30 мг/л.

Таким образом, содержание фикобилипротеинов зависит от природы и концентрации химического соединения. Наибольшее содержание фикобилипротеинов (выше на 36,2%, 33,1% и 25,5%, чем в контроле) было отмечено при добавлении химического соединения $\text{AgP}=\text{C}(\text{Te})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ в концентрациях 10, 20 и 30 мг/л соответственно, аккумуляция германия при этом составляла 4,8 мг%, 8,5 мг% и 23,9 мг%. Стоит также отметить, что присутствие химических соединений $\text{Mes}_2\text{Ge}(\text{F})\text{-PHMes}$ (30 мг/л) и $\text{AgP}=\text{C}(\text{SeSe})\text{Ge}(\text{Tip})\text{t-Bu}$ (20 мг/л), приводит к увеличению содержания фикобилипротеинов на 26,4 и 25,5%, соответственно, по сравнению с контролем. При этом накопление германия в биомассе спирулины составляет 29,1 мг% и 10,5 мг%. В случае неорганических соединений германия, максимальное накопление фикобилипротеинов (на 32,7% выше, чем в контроле) было отмечено в присутствии GeO_2 в концентрации 30 мг/л. В присутствии GeSe_2 было отмечено максимальное содержание фикобилипротеинов (на 17,8% выше, чем в контроле) при концентрации 10 мг/л.

Выводы

Согласно полученным данным, в условиях аккумуляции германия цианобактерией *Spirulina platensis* при ее культивировании в присутствии химических соединений этого элемента различной природы, содержание белка в биомассе сохраняется примерно на уровне контроля (с небольшой вариацией). В случае фикобилипротеинов, наблюдается их повышенный синтез (до 36,2% больше по сравнению с контролем).

Список литературы:

1. Asai K. Miracle Cure: Organic Germanium. Tokyo. Japan Publications Inc. 1980.
2. Boussiba S., Richmond A. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. // *Arch. Microbiol.* 1980, 125:143-147.
3. Encarnação T. et al. Cyanobacteria and microalgae: a renewable source of bioactive compounds and other chemicals. // *Science Progress.* 2015, 98(2): 145 – 168.
4. Kamen B. Germanium. A new approach to immunity. Nutrition Encounter, Larkspur, CA, 1987.
5. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J. Biol. Chem.* 1951, 193(1):265.
6. Lukevics E, Ignatovich L. Biological activity of organogermanium compounds. // Rappoport Z (ed) *The chemistry of organic germanium, tin and lead compounds.* Wiley, Chichester, 2002, pp 1653–1683.
7. Marzenko, Z.; Balcerzak, M. Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis. E-book type: Imprint: Elsevier, 2000. 521 p.

8. Mazo V., Gmoshinski I., Shirina L. New food sources of essential trace elements-antioxidants. Miklosh, 2009. 208 p.
9. Nuhu A. Review Article Spirulina (Arthrospira): An Important Source of Nutritional and Medicinal Compounds. // Journal of Marine Biology. 2013, (1):1-8.
10. Rath B. Bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria: utility and applications. // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2012, 3(11): 4123-4130.
11. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chișinău, Știința, 1993, 140 p.
12. Rudic V. ș. a. Ficobiotehnologie-cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău, 2007. 365 p.
13. Rudic V. Tulpină de algă *Spirulina platensis* (Nordst) Geitl în calitate de sursă de substanțe biologice active. Brevet de invenție MD 4123. 29-02-2012.
14. Sadeghi S. et al. Anticancer and antibacterial properties in peptide fractions from hydrolyzed spirulina protein. // J. Agr. Sci. Tech. 2018, 20: 673-683.
15. Satge J. Some applications of germanium and its derivatives. // Main Group Metal Chemistry. 2004, 27(6): 301–307.
16. Sellappa S., Jeyaraman, V. Antibacterial properties of organic germanium against some human pathogens. // International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011, 2(1): 854–859.
17. Tao S., Bolger P. Hazard assesment of germanium suppliments. // Regulat Toxicol Pharmacol. 1997, 6(3): 211-219.
18. Zelinsky N.D. Biological activity of organogermanium compounds. (A Review). // Pharm. Chem. J. 2013, 46(11): 635-638.
19. Воронков, М.Г., Мирсков Р. Г. Четвёртое рождение германия. // Химия и Жизнь. 1982, 3: 54-56.
20. Зорин С.Н. Получение и физико-химическая характеристика комплексов эссенциальных микроэлементов с ферментативными гидролизатами пищевых белков. // Микроэлементы в медицине. 2007, 8(1): 53–55.
21. Лукевиц Э.Я., Гар Т. К., Игнатович Л. М., Миронов В.Ф. Биологическая активность соединений германия. Рига, 1990. 192с.