

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ЙОДА И КОБАЛЬТА НА СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОМАССЕ СПИРУЛИНЫ

А. В. КОТИНСКИЙ¹, Л. А. ЧЕРНУХИНА², Г. В. ДОНЧЕНКО², О. М. ПАЛИВОДА²,
Ю. В. КОСТЕНКО², С. П. СТЕПАНЕНКО², К. О. ПАЛИВОДА²

¹Украинский государственный университет пищевых технологий, Киев;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;

e-mail: dongv@biochem.kiev.ua

З метою пошуку оптимальних умов вирощування йодованої спіруліни досліджувався вплив додавання Γ та Co^{2+} до поживного середовища на кількість і якість її біомаси. Показано, що підвищення концентрації Γ в поживному середовищі від 0,6 до 6,0 мкМ призводить до накопичення цього іону в біомасі спіруліни, але не позначається на її продуктивності та вмісту білка. Подальше підвищення концентрації Γ гальмує ростові процеси і синтез білка. Знайдено, що дробне внесення Γ разом з Co^{2+} до кінцевих концентрацій відповідно 30 та 60 мкМ прискорює біохімічні процеси у клітинах спіруліни, в яких зростає вміст білка та біологічно активних сполук.

На підставі одержаних результатів запропоновано схему внесення мікроелементів Γ та Co^{2+} в поживне середовище для вирощування йодованої біомаси спіруліни з достатньою кількістю йодовмісних сполук білкової природи.

Знайдено, що використання іонів йоду різної концентрації в поживному середовищі не дозволяє одержувати біомасу спіруліни з достатньо великим вмістом йоду, а застосування значних концентрацій йоду призводить до пригнічення накопичення біомаси. На підставі даних літератури висловлено припущення, що додавання іонів кобальту в поживне середовище може інтенсифікувати процеси синтезу білків спіруліни і, зокрема, йодовмісних сполук білкової природи.

Доведено, що дробне внесення в поживне середовище іонів йоду та кобальту в певних співвідношеннях прискорює біохімічні процеси у клітинах спіруліни, інтенсифікує процес біосинтезу білка та призводить до значного накопичення йоду.

К л ю ч о в і с л о в а: спіруліна, йод, кобальт, біологічно активні сполуки.

Поиск и изучение новых нетрадиционных источников биологически активных веществ являются одним из актуальных направлений развития биотехнологии в развитых странах мира. В качестве продуцента этих веществ с успехом используется синезеленая микроводоросль *Spirulina platensis*. Она содержит уникальный комплекс необходимых организму человека компонентов, в частности способна синтезировать йодсодержащие соединения гормональной природы – тироксин и трийодтиронин, которые легко усваиваются человеческим организмом [1]. Собственно тироксин является одним из основных факторов биостимулирующего эффекта спирулины. Синтезируя в присутствии ионов йода тироксин и другие йодсодержащие биологически активные соединения, спирулина представляет собой перспективный объект в биотехнологии и поэтому исследования по интенсификации процессов биосинтеза этих соединений являются актуальными.

Обеспеченность населения Украины биологически эффективными йодопродуктами остается неудовлетворительной. Более 15 млн. ее населения находятся на территориях, эндемичных по йоду, получая с продуктами питания и водой в среднем всего 35–40 мкг йода в сутки на 1 человека вместо необходимых 150–200 мкг. Особенно тяжелые последствия недостаточности йода наблюдаются в регионах, которые пострадали вследствие аварии на ЧАЭС [2]. Поэтому проблема дальнейшего развития производства искусственно обогащенных йодсодержащих продуктов, а также получения продуктов из натурального йодсодержащего сырья является актуальной и требует своего решения. Таким сырьем может быть биомасса спирулины, которая содержит йод в связанном с белками виде.

Целью настоящей работы явилось изучение возможностей выращивания йодированной биомассы спирулины с определенным набором биологически активных веществ и йода.

Материалы и методы

Для исследований использовали культуру трихомной цианобактерии *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl., штамм ЛГУ-603. Морфологические признаки цианобактерии: ширина витков спирали – 26–36 мкм; расстояние между витками – 43–57 мкм; диаметр трихомов – 2,5–5,5 мкм; длина – до 250 мкм. Положение штамма в ботанической номенклатуре: тип – *Cyanophyta*; класс – *Hormogoneae*; порядок – *Oslillatoriales* Elenk, emend. Kondrat; род – *Spirulina* Turp.; вид – *Spirulina platensis* (Gom.) Geitl.

Культуру цианобактерии *Spirulina platensis* выращивали в разработанном нами горизонтальном плоскостном аэролифтном фотобиореакторе закрытого типа, который обеспечивает оптимальные условия культивирования [3]. Прототипом установки является плоскостной биореактор закрытого типа компании «B. Braum Biotech. International» [4].

Известно, что на процесс роста спирулины влияют такие основные факторы, как температура суспензии, освещенность и pH среды, а также концентрация биомассы в суспензии [5]. Ранее нами показано, что для получения наибольшего прироста биомассы спирулины в плоскостном аэролифтном фотобиореакторе закрытого типа культивирование следует проводить при температуре суспензии 33 °C [6].

Процесс культивирования спирулины проходил в накопительном режиме на протяжении 120 ч при температуре среды $33 \pm 1,5$ °C и концентрации среды Заррука – 50%, начальной плотности – 0,3 г/л, pH среды 10,0–0,5 и при постоянной аэрации суспензии воздухом. Необходимое искусственное освещение получали с помощью ламп типа ДРЛ-250 и ДРЛ-400.

Соединения йода – KI и кобальта – $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ в среду культивирования вносили дробно.

В процессе культивирования определяли количество абсолютно сухой биомассы (АСБ), содержание белка – биуретовой реакцией [7], йода – согласно ГОСТ 26185-84 [8]. Содержание фикоцианинов в биомассе спирулины определяли по методу [9], а хлорофилла – по методу Годнева

[10], содержание каротиноидов – методом [11] в нашей модификации.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований изучали влияние интенсивности освещения на процесс аккумуляции йода клетками спирулины. Культивирование проводили при трех уровнях освещенности: 5,0; 8,0 и 11,0 клк. В начале культивирования в питательную среду вносили 0,2 мг/л KI, что соответствует 1,2 мкМ йода. Как видно из табл. 1, увеличение освещения с 5,0 до 8,0 клк при температуре 33 °C приводит к увеличению массы спирулины на 22,4% и содержания белка на 7%. Наибольшее количество йода накапливается также при освещенности 8,0 клк. При других уровнях освещенности содержание йода было значительно ниже. Выход биомассы спирулины и содержание белка также были максимальными при освещенности 8,0 клк. При повышении уровня освещенности культуры до 11,0 клк происходит угнетение роста биомассы и снижение содержания белка в клетках, что сопровождается значительным снижением йодаккумуляционной способности спирулины. Это можно объяснить угнетением фотосинтетического аппарата клеток микроводоросли интенсивным освещением. Отсюда следует, что содержание йода в биомассе зависит от интенсивности освещенности среды культивирования. Поскольку наибольшая фотосинтетическая активность спирулины при культивировании в закрытом фотобиореакторе наблюдается при температуре суспензии 33 °C и освещенности 8,0 клк, дальнейшие исследования проводили при этих параметрах.

Следующим этапом работы явилось изучение процесса аккумуляции йода клетками спирулины в зависимости от его концентрации в среде культивирования. Согласно полученным данным (табл. 2), повышение количества KI с 0,6 до 6,0 мкМ в среде культивирования приводит к заметному повышению содержания йода в биомассе спирулины, не влияя на синтез белка и продуктивность биомассы. Внесение в среду культивирования 15 и 30 мкМ йода в виде KI приво-

Т а б л и ц а 1. Накопление йода в биомассе спирулины в % к сухой биомассе (СБ) при внесении в среду культивирования 0,2 мг/л KI при различных уровнях освещенности, $M \pm m$, $n = 5-7$, $t = 33$ °C

Освещенность, клк	Биомасса, г/л	Содержание белка, % СБ	Содержание йода, % СБ
5,0	$1,83 \pm 0,03$	$52,3 \pm 1,05$	$0,0047 \pm 0,0002$
8,0	$2,24 \pm 0,05^*$	$56,2 \pm 1,08$	$0,0080 \pm 0,0005^*$
11,0	$2,06 \pm 0,03$	$50,3 \pm 1,03$	$0,0050 \pm 0,0004$

*Различия достоверны по отношению к показателям при освещенности 5,0 клк, $p < 0,05$. Здесь и в табл. 2–5 СБ – сухая биомасса.

Таблиця 2. Біомаса спіруліни при різних концентраціях КІ в середі культивування ($M \pm m$, $n = 5-7$)

Содержание КІ в среде культивирования, мкМ	Біомаса спіруліни, г/л СБ	Содержание белка, % СБ	Содержание йода, % СБ
контроль	2,11 ± 0,05	55,80 ± 1,12	следи
0,6	2,24 ± 0,06	56,20 ± 1,08	0,0080 ± 0,0005*
3,0	2,38 ± 0,08	59,40 ± 1,03	0,028 ± 0,001*
6,0	2,47 ± 0,05*	61,80 ± 1,21*	0,0486 ± 0,002*
15,0	2,22 ± 0,04	60,70 ± 1,16	0,0906 ± 0,003*
30,0	1,95 ± 0,05	54,30 ± 1,34	0,112 ± 0,002*

*Розличчя достовірні по відношенню к показателям контролю, $p < 0,05$.

дит к некоторому снижению продуктивности культуры и содержания белка при значительном увеличении содержания йода.

Таким образом, нами показано, что использование только ионов йода различной концентрации в среде культивирования не позволяет получить биомассу спіруліни с достаточно большим содержанием йода, т.е. получить концентрированный источник органически связанного йода, а добавление значительных количеств йода приводит даже к угнетению роста биомассы.

Известно, что цианкобаламины принимают участие в синтезе белка, в восстановлении дисульфидных связей [12]. Исходя из этого, высказано предположение, что добавленные ионы кобальта в среду культивирования могут интенсифицировать процессы синтеза белков спіруліни и, в частности, йодсодержащих соединений белковой природы.

Поэтому следующим этапом исследований явилось изучение влияния на йодаккумуляционную способность спіруліни различных концентраций йода совместно с ионами кобальта в оп-

ределенных соотношениях.

Как видно из табл. 3, внесение в среду культивирования одновременно ионов йода (КІ) и кобальта $[Co(NO_3)_2]$ приводит к адаптации спіруліни к высоким концентрациям ионов йода. Так, внесение 30 мкМ ионов йода совместно с 30 или 60 мкМ ионов кобальта приводит к увеличению биомассы спіруліни на 34–40% и содержания белка на 7–23%. При этом содержание органически связанного йода увеличивается в 2 и более раза (для сравнения см. табл. 2).

Таким образом, можно утверждать, что одновременное внесение в среду культивирования ионов йода и кобальта в определенных соотношениях способствует адаптации клеток спіруліни к высоким концентрациям йода и кобальта и интенсифицирует процессы биосинтеза спіруліни. Можно предположить, что кобальт в присутствии ионов йода способствует синтезу некоторых ферментов, в частности пероксидаз, которые принимают участие в йодировании остатков тирозина, что приводит к повышению синтеза йодсодержащих соединений.

Таблиця 3. Продуктивность биомассы спіруліни при различных концентрациях йода и кобальта в среде культивирования ($M \pm m$, $n = 5-7$)

Соотношение $I^- : Co^{2+}$, мкМ	Біомаса, г/л	Содержание белка, % СБ	Содержание йода, % СБ
контроль	2,11 ± 0,05	55,8 ± 1,12	следи
3,0 : 3,0	2,45 ± 0,05	60,6 ± 1,06	0,0607 ± 0,002*
3,0 : 6,0	2,42 ± 0,06	60,2 ± 1,06	0,0633 ± 0,002*
3,0 : 12,0	2,49 ± 0,08	62,0 ± 1,05	0,0652 ± 0,002*
15,0 : 15,0	2,40 ± 0,05	66,7 ± 1,12	0,258 ± 0,004*
15,0 : 30,0	2,63 ± 0,05*	69,7 ± 1,18*	0,297 ± 0,004*
15,0 : 60,0	2,74 ± 0,06*	67,0 ± 1,18*	0,244 ± 0,003*
30,0 : 30,0	2,24 ± 0,05	69,0 ± 1,16*	0,358 ± 0,005*
30,0 : 60,0	2,50 ± 0,06*	68,5 ± 1,19*	0,500 ± 0,003*
30,0 : 120,0	1,79 ± 0,06	52,1 ± 1,05	0,088 ± 0,004*

* Розличчя достовірні по відношенню к контролю, $p < 0,01$.

Таблиця 4. Схема дробного внесення солей йода і кобальта в процесі культивування спіруліни

Дробне внесення солей, мг/л										Всього внесено мікроелемента, мкмоль	
1-е сутки		2-е сутки		3-и сутки		4-е сутки		5-е сутки		йод	кобальт
KI	Co(NO ₃) ₂	KI	Co(NO ₃) ₂	KI	Co(NO ₃) ₂	KI	Co(NO ₃) ₂	KI	Co(NO ₃) ₂		
0,83	0,92	0,166	0,178	0	0	0	0	0	0	3,0	6,0
0,83	0,92	1,66	1,83	2,49	2,74	0	0	0	0	15	30
0,83	0,92	1,66	1,83	2,49	2,74	2,49	2,74	2,49	2,74	30	60

Однако при значительных концентрациях ионов йода и кобальта, внесенных в среду культивирования однократно отдельно или вместе, происходит резкое снижение фотосинтетической активности спирулины: снижается количество биомассы и синтез белка. Поэтому была разработана схема дробного внесения указанных солей в процессе культивирования спирулины (табл. 4).

Сравнительный анализ выращивания спирулины при различных соотношениях ионов йода и кобальта в среде инкубации и дробном их внесении показал, что варьируя это соотношение, можно получить биомассу спирулины с определенным содержанием органически связанного йода. Именно разработанная нами схема дробного внесения солей йода и кобальта позволила адаптировать спирулину к высоким концентрациям их в среде культивирования и повысить накопление биомассы спирулины в процессе роста. Наибольшее положительное влияние на фотосинтетическую активность спирулины оказывает внесение в среду культивирования 30,0 мкМ

йода и 60,0 мкМ кобальта.

Проведенный биохимический анализ биомассы спирулины, полученной при выращивании ее при условии дробного внесения в среду культивирования 30,0 мкМ ионов йода и 60,0 мкМ кобальта (табл. 5) показал, что одновременное внесение ионов йода и кобальта приводит к увеличению биомассы на 18%, синтеза белка на 22,7%, фикоцианина на 33,7%, в то же время содержание каротиноидов снижается на 54,2%.

Таким образом показано, что дробное внесение ионов йода и кобальта в определенных соотношениях в среду культивирования создает возможность получения биомассы со значительным содержанием органически связанного йода (до 0,5 % от сухой биомассы) и определенным набором биологически активных веществ.

Работа выполнена при поддержке Государственного Комитета Украины по делам семьи и молодежи за счет гранта Президента Украины для одаренной молодежи.

Таблиця 5. Состав биомассы спирулины, полученной при культивировании в присутствии ионов йода и кобальта

Показатели	Данные литературы [13–16] без ионов йода и кобальта	Условия культивирования			
		без ионов йода и кобальта (контроль)	внесение ионов йода, 30,0 мкМ	внесение ионов кобальта, 60,0 мкМ	дробное внесение 30,0 мкМ йода и 60,0 мкМ кобальта
Накопление биомассы, г СБ/л	0,6–2,0	2,11 ± 0,05	1,95 ± 0,05	2,27 ± 0,03	2,50 ± 0,06
Белок, % СБ	48–65	55,80 ± 1,12	54,30 ± 1,34	55,00 ± 1,04	68,10 ± 1,43
Хлорофилл, % СБ	0,50–1,15	2,16 ± 0,09	2,2–7,0 ± 1,1	1,93 ± 0,08	1,88 ± 0,14
Фикоцианин с, % СБ	3,84–15,00	17,40 ± 1,07	18,7 ± 1,1	15,30 ± 1,03	23,30 ± 1,02
Каротиноиды, % СБ	0,12–0,46	0,24 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,36 ± 0,05	0,11 ± 0,02
Витамин С, мг% СБ	5–170	87,4 ± 0,6	97,6 ± 0,4	90,3 ± 0,6	94,0 ± 0,5
Витамин В ₁₂ , мкг % СБ	98–175	9,13 ± 0,07	9,87 ± 0,05	14,96 ± 0,06	16,40 ± 0,05
Йод, % СБ	0,006–0,03*	следы	0,112 ± 0,004	следы	0,500 ± 0,005

* При специальном внесении в среду культивирования 10,0 мг/л KI.

EFFECT OF IODINE AND COBALT SALTS ON BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES CONTENT IN SPIRULINA BIOMASS

A. V. Kotinsky², L. A. Chernukhina¹, G. V. Donchenko¹, O. M. Palivoda¹, Yu. V. Kostenko¹, S. P. Stepanenko¹, K. O. Palivoda¹

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Ukrainian State University of Food Technologies, Kyiv;

e-mail: dongv@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

Production technology of iodinated spirulina biomass at vertical panel airlifted photobioreactor has been developed. The influence of different concentrations of iodine ions at certain combinations with cobalt ions on iodine-accumulative properties of spirulina has been studied.

It has been shown that it is possible to obtain spirulina biomass containing certain amount of organically bound iodine by varying cobalt and iodine ions combinations and by staged addition of ions to incubation medium. This technique of staged addition of iodine and cobalt salt allowed to adopt spirulina to their high amount in the incubation medium, to increase spirulina productivity during growth, and to produce biomass with large iodine content.

К е у w o r d s: spirulina, iodine, cobalt, biologically active substances.

1. *Передерий В. Г., Соловьева А. А.* // Проблемы питания и здоровья. 1996. № 3–4. С. 4–6.
2. *Сиваченко Т.* // Здоровье и питание. 2000. № 3. С. 16–17.

3. *А.с. 99031154/7200.* Україна, МКІ⁶ А 01631/02 Фотореактор для вирощування водоростей / О. І. Адаменко, І. О. Адаменко, І. М. Голодний та ін. Опубл. 15.02.2001. Бюл. № 1.
4. *Pulz O.* // Proceeding of the 1st European workshop on microalgai Biotech. 1992. P. 61.
5. *Yokogama E.* // Plant Cell Physiol. 1991. **32**. P. 827.
6. *Котинський А. В., Салюк А. І., Чернухіна Л. О., Нікулін О. Ф.* // Харчова та переробна промисловість. 2001. **1**. С. 19–21.
7. *Палладин А. В., Кирсенко О. В.* // Биохимия. 1961. **26**. С. 385.
8. *Количественное определение йода в морских водорослях и морской траве* // ГОСТ 26185-84. 1984. С. 22.
9. *Boussiba S., Richmond A.* // Arch. Microbiol. 1979. **120**. P. 155.
10. *Петров К. П.* Методы биохимии растительных продуктов. К.: Вища школа. 1978. 189 с.
11. *Дмитровский А. А.* / В кн.: Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю. М. Островского. Минск: Наука и техника. 1972. С. 131–175.
12. *Познанская А. А.* / В кн.: Витамины / Под ред. М. И. Смирнова. М.: Медицина. 1974. С. 264–302.
13. *Шнюкова Е. И., Мушак П. А., Тупик Н. Д.* // Альгология. 1994. **4**, № 3. С. 17–24.
14. *Тупик Н. Д., Лось С. И.* // Укр. бот. журн. 1975. **32**, № 2. С. 39–41.
15. *Денчикова Л. А., Скутару Ю. В., Рудик В. Ф.* // Альгология. 1998. **8**, № 3. С. 268–272.
16. *Саттыев Р., Каримова Х. М., Юсупов Э. Р., Зарипов Э.* Промышленное культивирование микроводорослей. М. 1985. С. 108–110.

Получено 30.10.2003