

**STUDIUL ASPECTELOR BIOTEHNOLOGICE DE UTILIZARE A ALGEI ROȘII
PORPHYRIDIDIUM CRUENTUM (Näg) CNM-AR-01 ÎN CALITATE DE SURSĂ
DE ACID EICOSAPENTAENOIC**

**Liliana CEPOI, Ludmila RUDI, Inessa SOBOLEV*, Vera MISCU,
Iulia IAȚCO, Viorica CHELMENCIUC**

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

**Institutul de Tehnologii Alimentare al AȘM*

Polyunsaturated fatty acids (eicosapentaenoic and arachidonic acids) are investigated for the use of it in food and pharmaceutical industries. Microalgae *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01 strain is one of the potential sources of polyunsaturated fatty acids. Some complex compounds of Zn(II) with amino acids have been used as chemical stimulators for polyunsaturated fatty acids biosynthesis.

Introducere

Gama largă de acizi grași polienici esențiali, caracteristică multor specii de microalge și capacitatea acestora de a-și modifica profilul lipidic în dependență de schimbările condițiilor mediului de cultivare au determinat importanța lor ca obiecte ficobiotehnologice și utilizarea lor în producerea acizilor grași polienici deficitari [1-4].

Cele mai importante componente ale lipidelor din *Porphyridium cruentum* sunt acizii grași polienici cu catenă lungă: arahidonic (omega-6, C 20:4^{Δ5,8,11,14} și eicosapentaenoic omega-3, C 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}). Conform noii teorii privind ateroscleroza, deficitul alimentar al acidului eicosapentaenoic este unul dintre factorii ce declanșează procesele metabolice caracteristice acestei afecțiuni [5-6]. Recunoscuți ca sursă de acid eicosapentaenoic, peștii sunt incapabili să-l sintetizeze *de novo*, acesta fiind doar depozitat în grăsimi în urma consumării. Acidul eicosapentaenoic în grăsimea de pește este de proveniență algală.

Microalga *Porphyridium cruentum* trece ușor la nutriția mixotrofă [7-8], ceea ce facilitează dirijarea activității ei biosintetice. În rezultatul cercetărilor în vederea stimulării biosintezei acizilor grași polienici și în scopul măririi ponderii acidului eicosapentaenoic au fost propuse tehnologii de cultivare a microalgei în condiții de acumulare redusă a celulelor în suspensie [4,9], cultivarea în condiții de insuficiență de azot [10-11] și cultivarea microalgei în condiții de salinitate sporită [12]. Tehnologiile propuse reduc productivitatea microalgei.

De aceea, în scopul sporirii cantității acidului eicosapentaenoic în biomasa de *Porphyridium* pot fi propuse tehnologii de stimulare a productivității care ar induce, la rândul lor acumularea de acid eicosapentaenoic și tehnologii de intensificare propriu-zisă a biosintezei acidului eicosapentaenoic.

Cercetările orientate spre reglarea biosintezei la unele tulpini de cianobacterii (*Spirulina platensis*, *Nostoc linckia*) și de microalge (*Porphyridium cruentum*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*) au demonstrat capacitatea de stimulare a productivității și de reglare a activității biosintetice a unor compuși coordinați ai metalelor (Zn, Cu, Fe, Co, Mn, Mg) [7,13-14]. Printre elementele cu un impact semnificativ în procesele biosintetice la cianobacterii a fost menționat zincul care are cea mai vastă implicare în procesele biosintetice [15-16].

La microalgele diatomee *Phaeodactylum tricorutum* și *Thalassiosira pseudonana* a fost studiată activitatea carboanhidrazei și dependența ei de zinc. Rezultatele au demonstrat existența unui mecanism de concentrare și depozitare a carbonului în cazul concentrației mari de CO₂ în mediu și utilizarea maximală a carbonului sub forma de HCO₃⁻ [17]. În mod indirect s-a demonstrat importanța zincului în funcționarea normală a desaturazelor și, în special, a Δ-6-desaturazei [18], precum și faptul că conținutul suplimentar de zinc în celule previne oxidarea inițiată de Fe²⁺ a lipidelor prin stimularea sintezei superoxidismutazei [19].

Astfel, în calitate de reglatori ai biosintezei acizilor grași polienici și pentru a spori productivitatea microalgei *Porphyridium cruentum* au fost selectați compușii coordinați ai zincului.

Material și metode

Obiectul de studiu. Tulpina *Porphyridium cruentum* (Näg)CNM-AR-01 (RHODOPHYTA) (Brevet MD Nr. 275) [20] a fost cultivată pe mediul nutritiv mineral VP₂ [21] cu următoarea componență chimică:

- Macroelementele, în g/l: NaCl–7,0; KCl–7,5; MgSO₄·7H₂O–1,8; NaNO₃–5,0; KBr–0,05; KI–0,05; K₂HPO₄–0,2; Ca(NO₃)·4H₂O–0,15.

- Soluția de microelemente 1,0 ml/l ce conține, în mg/l: FeCl₃·6H₂O–2,7; ZnSO₄·7H₂O–0,02; CuSO₄·5H₂O–0,05; MnSO₄·5H₂O–0,3; H₃BO₃–0,6; MoO₃–0,02; NaVO₃–0,05.

Cultivarea s-a efectuat cu menținerea următorilor parametri: pH-ul – 6,8-7,2, temperatura – 23-25°C, iluminarea – 2000-3000 lx, agitare lentă continuă și durata cultivării de 96 ore. Cantitatea de inoculum – 0,5-0,6 g/l în recalcul la BAU.

În calitate de stimulatori ai lipidogenezei au fost studiați 11 compuși coordinați ai Zn(II) cu glicina și α-stereozomerii alaninei și serinei de tipul [Zn(A)₂] și [Zn(A,B)], sintetizați de către dr. în chimie Ludmila Ciapurin, Institutul de Chimie al AȘM.

Metode de investigație. Productivitatea microalgei s-a determinat fotocolorimetric cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată (BAU) [22]. Această metoda permite reproducerea și mărirea preciziei determinării BAU a culturilor microalgale. În scopul înlăturării amestecurilor de săruri din biomasă a fost utilizată soluția izotonică de acetat de amoniu.

Determinarea cantitativă a lipidelor a fost realizată prin metoda colorimetrică, bazată pe determinarea produselor de degradare a lipidelor [23]. Extragerea lipidelor din biomasa microalgală a fost efectuată prin metoda Kates [24] și adaptată pentru cultura dată [7]. În calitate de solvent polar în sistemul de solvenți a fost utilizat alcoolul etilic. Timpul extragerii a fost redus la 60 min. Determinarea calitativă și cantitativă a acizilor grași a fost efectuată prin cromatografia gaz lichidă a esterilor metil ai acizilor grași [25].

Rezultate și discuții

Porphyridium formează rezerve energetice în baza polizaharidelor și a acizilor grași saturați și monoenici pe parcursul perioadei de creștere. În paralel cu acumularea biomasei are loc reducerea cantității substanțelor menționate, iar fracția acizilor grași polienici, care formează membranele, crește. Cu epuizarea substanțelor nutritive din mediul de cultivare microalga intensifică biosinteza acizilor grași de rezervă și, în special, a acidului arahidonic. Pentru a preîntâmpina acest fapt este evidentă rentabilitatea colectării biomasei de *Porphyridium* până la intrarea culturii în faza staționară.

Rezultatele obținute au demonstrat că după 96 ore de cultivare majoritatea compușilor au manifestat o acțiune inertă asupra productivității, care s-a situat la nivelul probei martor (90-105%) (Fig.1).

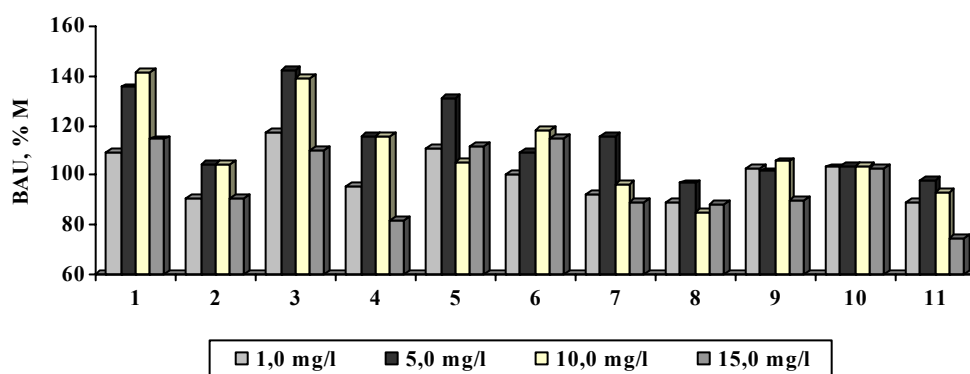


Fig.1. Influența compușilor coordinați ai Zn(II) cu α- stereozomerii alaninei și serinei și cu glicina asupra productivității la *Porphyridium*:

1 – [Zn(D-ala)₂]; 2 – [Zn(L-ala)₂]; 3 – [Zn(D,L-ala)₂]; 4 – [Zn(D-ser)₂];
5 – [Zn(L-ser)₂]; 6 – [Zn(D,L-ser)₂]; 7 – [Zn(D-ala, D,L-ser)]; 8 – [Zn(L-ala, D,L-ser)];
9 – [Zn(gly, D-ser)]; 10 – [Zn(gly, L-ser)]; 11 – [Zn(gly, D,L-ser)].

Un efect de reținere a acumulării de biomasă (81-89%M) în primele 4 zile s-a observat în probele în care s-a introdus o cantitate maximală de D-serinat de zinc. De asemenea, în probele suplimentate cu D, L-serinat, L-alaninatul de zinc, productivitatea a fost joasă, cu excepția probei suplimentate cu 5,0 mg/l compus coordi-

nativ, unde biomasa a ajuns la nivelul probei martor. Un efect identic a fost observat și în cazul glicinat D, L-serinatului de zinc, unde în probele cu 5,0 și 10,0 mg/l compus coordinativ productivitatea a fost de asemenea la nivelul probei martor. Un efect pozitiv evident a fost manifestat de compuşii zincului cu D-alanina și D, L-alanina, precum și de cei cu L-serina. D-alaninatul de Zn(II) (5,0-10,0 mg/l) a sporit productivitatea *Porphyridium* cu 35% și cu 41%, respectiv.

D,L-alaninatul de zinc a intensificat acumularea de biomasă în toate concentrațiile, valoarea maximă fiind cu 59% mai mare decât proba de referință în cazul suplimentării mediului cu 15,0 mg/l compus coordinativ. Compusul $[Zn(L-ser)_2]$ în concentrația de 5,0 mg/l a majorat productivitatea cu 31% față de martor.

Rezultatele obținute au demonstrat eficiența utilizării compuşilor coordinativi ai zincului cu aminoacizi în calitate de factori de sporire a productivității microalgelor.

În continuare a fost determinată suma lipidelor în biomasa de *Porphyridium cruentum* obținută pe mediile suplimentate cu compuşii coordinativi ai zincului cu aminoacizi (Fig.2).

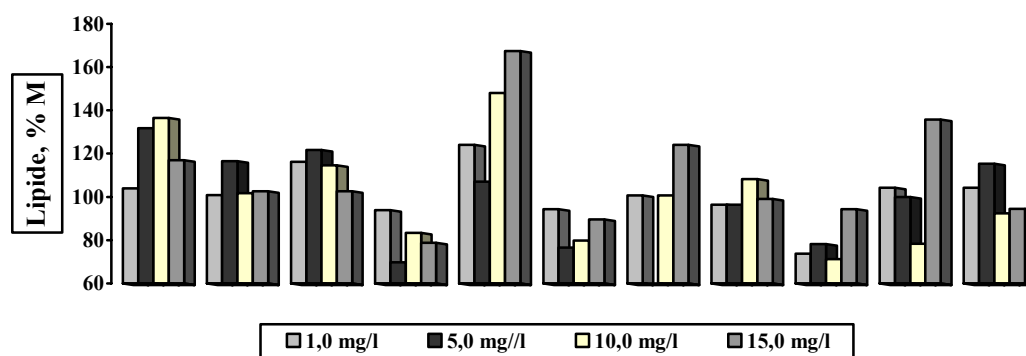


Fig.2. Influența compuşilor coordinativi ai Zn(II)* cu α -stereoizomerii alaninei și serinei și cu glicina asupra acumulării lipidelor la *Porphyridium*.
*variantele – a se vedea Fig.1.

În comparație cu acumularea biomasei, suma lipidelor a crescut mai lent, ceea ce confirmă activitatea biosintetică generală mare a microalgei. O cantitate mică de lipide s-a înregistrat la cultivarea *Porphyridium* în prezența glicinat D-serinatului de Zn(II) (la nivelul valorilor de 70-78% în comparație cu proba martor) și a D-serinatului de zinc – între 70 și 98%.

Cea mai mare acumulare de lipide s-a observat în cazul L-serinatului de zinc, care în concentrațiile de 10,0 mg/l și 15,0 mg/l a mărit cantitatea de lipide cu 48-67% față de martor. Compuşii $[Zn(L-ala)_2]$ și $[Zn(D,L-ala)_2]$ au stimulat într-o măsură mai mică lipidogeneza, suma lipidelor constituind până la 121% față de martor. D-alaninatul de zinc a fost eficient în concentrațiile de 5,0 mg/l și 10,0 mg/l și a indicat o acumulare de lipide mai mare cu 31-36%. Variantele menționate mai sus, care au demonstrat o stimulare concomitentă a productivității și a lipidogenezei la *Porphyridium*, au fost selectate pentru studiul ulterior cu determinarea cantitativă a acizilor grași (Fig.3).

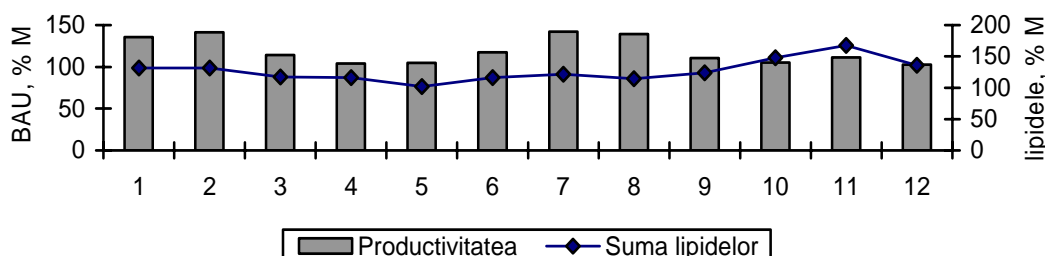


Fig.3. Corelarea dintre acumularea de biomasă (% M) și suma lipidelor (% M) la cultivarea *Porphyridium* în prezența unor compuşii ai Zn(II) cu aminoacizi:
1 – $[Zn(D-ala)_2]$ 5,0 mg/l; 2 – $[Zn(D-ala)_2]$ 10,0 mg/l; 3 – $[Zn(D-ala)_2]$ 15,0 mg/l;
4 – $[Zn(L-ala)_2]$ 5,0 mg/l; 5 – $[Zn(L-ala)_2]$ 10,0 mg/l; 6 – $[Zn(D,L-ala)_2]$ 1,0 mg/l;
7 – $[Zn(D,L-ala)_2]$ 5,0 mg/l; 8 – $[Zn(D,L-ala)_2]$ 10,0 mg/l; 9 – $[Zn(L-ser)_2]$ 1,0 mg/l;
10 – $[Zn(L-ser)_2]$ 10,0 mg/l; 11 – $[Zn(L-ser)_2]$ 15,0 mg/l; 12 – $[Zn(gly L-ser)]$ 15,0 mg/l.

Comparând datele obținute privind productivitatea și cantitatea de lipide după 96 ore de cultivare a *Porphyridium cruentum*, s-a observat că compușii: $[Zn(D-ala)_2]$ 15,0 mg/l; $[Zn(L-ala)_2]$ 5,0 mg/l; $[Zn(L-ala)_2]$ 10,0 mg/l; $[Zn(D,L-ala)_2]$ 1,0 mg/l și $[Zn(L-ser)_2]$ 1,0 mg/l au mărit aproximativ în aceeași măsură și productivitatea, și suma lipidelor. Probabilitatea obținerii unor cantități sporite de acid eicosapentaenoic în variantele date este mare, reieșind din faptul că sporirea productivității înaintea cerințe majorate față de sinteza componentelor celulare și, în primul rând, a componentelor membranare, ale căror principale elemente structurale sunt acizii grași polienici.

În cazurile compușilor $[Zn(D,L-ala)_2]$ – 5,0 mg/l și $[Zn(D,L-ala)_2]$ – 10,0 mg/l, precum și în variantele cu utilizarea $[Zn(D-ala)_2]$ – 5,0 mg/l și a $[Zn(D-ala)_2]$ – 10,0 mg/l, creșterea productivității a fost superioară acumulării lipidelor. Deci, se poate presupune o activitate biosintetică mare a culturii ce asigură acumularea cantităților egale de acid arahidonic și eicosapentaenoic. În variantele în care s-au utilizat compușii $[Zn(L-ser)_2]$ – 10,0 mg/l, $[Zn(L-ser)_2]$ – 15,0 mg/l și $[Zn(gly L-ser)]$ – 15,0 mg/l a fost evidentă acumularea lipidelor pe un fon de productivitate la nivelul martorului. Această creștere a cantității de lipide poate fi considerată rezultatul lipidogenezei intensive cu acumularea lipidelor de rezervă. S-a presupus că în aceste probe se va înregistra o cantitate ridicată de acid arahidonic. Pentru a verifica presupunerile teoretice a fost efectuată analiza cromatografică a acizilor grași. Rezultatele sunt prezentate Figura 4.

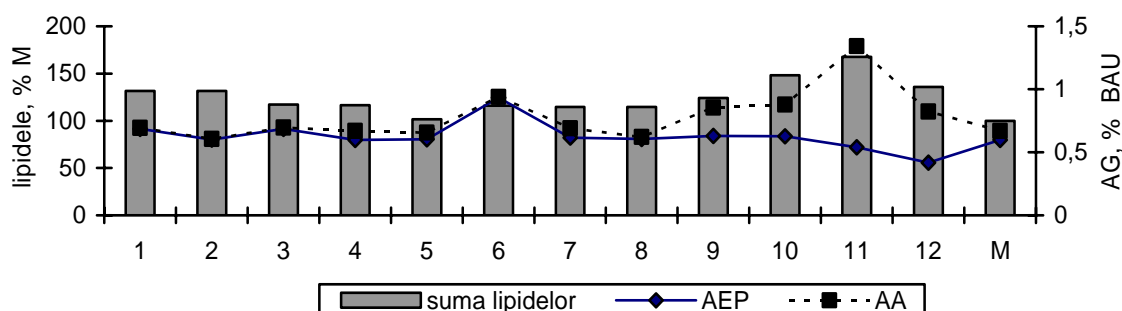


Fig.4. Raportul dintre suma lipidelor (% M) și cantitatea acizilor (% BAU) eicosapentaenoic (AEP) și arahidonic (AA) în biomasa de *Porphyridium* cultivat în prezența compușilor coordinați ai Zn(II)* cu aminoacizii.
*variantele – a se vedea Fig.3.

Presupunerea că în probele cu stimulare concomitentă a productivității și lipidogenezei (probele 3-6,9) cantitatea acidului eicosapentaenoic va fi majorată s-a adeverit pentru $[Zn(D-ala)_2]$ – 15,0 mg/l, $[Zn(D,L-ala)_2]$ – 1,0 mg/l și $[Zn(L-ser)_2]$ – 1,0 mg/l. În celelalte două cazuri cantitatea acidului eicosapentaenoic în biomasă a fost la nivelul martorului.

În ceea ce privește presupunerea că o productivitate net superioară acumulării de lipide se va solda cu un spor considerabil al cantității acidului eicosapentaenoic a fost justă doar pentru o singură variantă ($[Zn(D-ala)_2]$ – 5,0 mg/l), în celelalte trei cazuri (variantele 2,7 și 8), cantitatea acidului eicosapentaenoic rămânând la nivelul martorului.

Variantele, în care s-a obținut o acumulare evidentă a lipidelor pe fonul productivității în limitele caracteristice creșterii și dezvoltării tulpinii utilizate de *Porphyridium*, după cum s-a și presupus, înregistrează un nivel sporit de acid arahidonic.

În variantele 1,3,6,7,9 și 10 cantitatea acidului eicosapentaenoic este mai mare decât în proba martor. În toate variantele enumerate compușii coordinați conțin în calitate de ligand stereozomerul D al alaninei. Valorile maxime ale acidului eicosapentaenoic de 0,684 și 0,933% BAU s-au înregistrat în cazul aplicării D- alaninatului de zinc în concentrația de 5,0 și 15,0 mg/l și a D,L- alaninatului de zinc în concentrația de 1,0 mg/l. În toate aceste variante a fost mare și cantitatea de acid arahidonic în comparație cu proba martor. O cantitate majorată de acid arahidonic se acumulează în variantele 6,9 și în cele menționate (10-12), conținutul maximal al lui constituind 1,341% BAU în cazul suplimentării mediului de cultivare cu L- serinatul de zinc în concentrația de 15 mg/l.

D-alaninatul de Zn(II) în toate concentrațiile aplicate s-a manifestat ca stimulator al sintezei lipidelor.

La cultivarea *Porphyridium* în prezența $[Zn(D-ala)_2]$ în concentrația de 5,0 mg/l a avut loc sporirea productivității cu 35% și a lipidelor cu 32%. S-a observat că în acest caz acumularea lipidelor nu a fost însoțită de micșorarea cantității acidului eicosapentaenoic și a decurs mai degrabă din contul acumulării de biomasă.

Prin urmare, compusul zincului cu D-alanina în concentrația de 5,0 mg/l poate fi utilizat pentru obținerea biomasei de *Porphyridium* bogată în acid eicosapentaenoic, ținându-se cont de nivelul înalt al acidului arahidonic în lipidele extrase, care este precursorul biosintetic al acidului eicosapentaenoic.

Concentrația de 10,0 mg/l a acestui compus este rentabilă din punctul de vedere al acumulării acidului eicosapentaenoic în biomasă, pentru care crește productivitatea cu 40% și conținutul lipidelor cu 36%. Astfel, compusul zincului cu D-alanina în concentrația de 10,0 mg/l poate fi utilizat în tehnologia cultivării microalgei în scopul obținerii biomasei cu conținut sporit de acid eicosapentaenoic.

Biomasa de *Porphyridium cruentum* cultivat în prezența compusului $[Zn(D,L-ala)_2]$ în concentrația de 1,0 mg/l a acumulat cea mai mare cantitate de acid eicosapentaenoic – 0,933% din BAU. Astfel nivelul înalt al acidului eicosapentaenoic, acumulat în 96 de ore de cultivare în condiții de stimulare relativ moderată a productivității, denotă perspectiva utilizării acestui compus în calitate de stimulator al sintezei acidului eicosapentaenoic.

Concluzii

✓ Compușii coordinațivi ai Zn(II) cu aminoacizii pot fi utilizați în biotehnologia cultivării *Porphyridium cruentum*.

✓ Compușii care au asigurat un spor maximal al productivității și lipidogenezei sunt de perspectivă pentru obținerea unei biomase de *Porphyridium* cu conținut sporit de acid eicosapentaenoic: din contul intensificării biosintezei acidului eicosapentaenoic sau din contul sporului de biomasă în care acidul eicosapentaenoic se află la un nivel optim.

Referințe:

1. Acien Fernandez FG., Alias CB., Sanchez Perez J.A. et al. Production ^{13}C poliunsaturated fatty acids from the microalga *Phaeodactylum tricorutum* // Journal of Applied Phycology. - 2003. - Vol.15. - P.229-237.
2. Carboro K., Guaratini T., Barros M., et al. Metabolites from algae with economical impact // Comparative Biochemistry and Physiology. - 2007. - Vol.146. - P.60-78.
3. Cohen Z., Khozin-Goldberg I., Adlerstein D., Bigongo C. The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae // Biochem Soc Trans. - 2000. - Vol.28. - P.740-743.
4. Otero A., Garsia D., Fabregas J. Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae // J. Appl. Phycology. - 1997. - Vol.19. - P.465-469.
5. Ristic V., Ristic G. Role and importance of dietary polyunsaturated fatty acids in the prevention and therapy of atherosclerosis // Atherosclerosis. - 2003. - Vol.56. - P.50-53.
6. Benatti P., Peluso G., Nicolai R., Calvani M. Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties // Journal of the American College of Nutrition. -2004. - Vol.23. - No4. - P.281-302.
7. Cepoi L. Particularitățile fiziologo-biochimice de cultivare a algei roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01 – sursă de substanțe bioactive: Autoreferatul tezei de doctor în științe biologice. - Chisinau, 1995. - 21 p.
8. Cohen Z., Didi SH., Heimer Y. Overproduction of γ -Linolenic and Eicosapentaenoic Acids by Algae // Plant Physiology. - 1992. - Vol.98. - P.569-572.
9. Faregas J., Garsia D., Morales E., Dominguez A., Otero A. Renewal rate of semicontinuous cultures of the microalga *Porphyridium cruentum* modifiens phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity // Journal of Fermentation and Bioengineering. - 1998. - Vol.86. - P.477-481.
10. Alonso D., Belarbi E.H., Fernandez-Sevilla E.H. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of microalga *Phaeodactylum tricorutum* // Phytochemistry. - 2000. - Vol.54. - P.461-471.
11. Klyachko-Gurvich G., Tsoglin L., Doucha J. et al. Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity // Physiologia Plantarum. - 1999. - Vol.107. - P.240-249.
12. Nuutila A., Aura A., Kiesvaara M., Kauppinen V. The effect of salinity, nitrate concentration, pH and temperature on eicosapentaenoic acid production by the red unicellular alga *Porphyridium cruentum* // Journal of Biotechnology. - 1996. - Vol.335. - P.245-255.
13. Blucowe D., Morby A. Zn(II) metabolism in procaryotes // FEMS Microbiology Reviews. - 2003. - Vol.27. - P.291-311.

14. Bulimaga V., Rudic V., Chiriac T., Ciapurina L. Utilizarea unor compuși coordinativi ai Zn(II) în calitate de stimulatori ai productivității și conținutului de ficobiliproteide la *Spirulina platensis* // Analele Științifice ale USM. - 2001. - P.105-110.
15. Chiriac T. Utilizarea unor compuși coordinativi de tipul [Zn(A)2] și [Zn(A,B)] în fotobiosinteză // Analele Științifice ale USM. - 2002. - P.179-181.
16. Buleandă M., Radu G., Tănase I. Aspecte privind interacția dintre cationii metalici și moleculele organice de interes biologic. - București, 1995. - 237 p.
17. Lane TW., Morel F. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* // Plant Physiology. - 2000. - Vol.123. - P.245-352.
18. Arnold LE., Pinkham SM., Votolato N. Does zinc moderate essential fatty acid and amphetamine treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder // J. Child. Adolesc. Psychopharmacology. - 2000. - Vol.10. - P.111-117.
19. Zago M.P., Verstraeten S.V., Oteiza P.I. Zinc in the prevention of Fe²⁺- initiated lipid and protein oxidation // Biological Research. - 2000. - Vol.33. - P.122-134.
20. Rudic V., Cepoi L. Tulpina algi roșii *Porphyridium cruentum* Nag. CNM-AR-01 – sursă de substanțe bioactive / Brevet nr.275 (MD). Publ. BOPI. - 1995. - Nr.9.
21. Rudic V., Cepoi L. Mediul de cultivare pentru alga roșie *Porphyridium cruentum* / Brevet nr.690 (MD). Publ. BOPI. - 1997. - Nr.3.
22. Rudic V., Cepoi L. Procedeu de determinare a masei biologice absolut uscate la *Porphyridium cruentum* / Brevet nr.571 (MD). Publ. BOPI. - 1996. - Nr.6.
23. Tietz N.W. Clinical Guide to Laboratory Tests, 1995, 3 rd ed. AACC Press.
24. Kates, M. Separation of lipid mixtures. Techniques of Lipidology, Elsevier, 1988. - 278 p.
25. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. - Ленинград, 1982. - 272 с.

Prezentat la 13.02.2008