

Artículo Original

**Comparación nutricional entre dos cepas de *Arthrospira maxima*
de origen geográfico incierto**

**Parra, José^{*1.}, Torres, Alexia^{2.}, Rojas-Tortolero, Diego^{*1.}, Arredondo-Vega, Bertha O.^{3.},
Sena, Lucia^{1.}, Perdomo, Trigal^{1.}, Fernandez-Gómez, Rodolfo^{1.}**

¹Fundación Instituto de Estudios Avanzados, Centro de Biotecnología.
Dirección de Área de Energía y Ambiente. Carretera Nacional Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas,
Baruta, Estado Miranda, Caracas 1015-A, Venezuela.

(* Autor de correspondencia: jparra@idea.gob.ve, drojas70@gmail.com)

²Universidad Simón Bolívar, Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos.

³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Programa de Acuicultura.

Resumen

El género *Arthrospira* ha sido reconocido por sus especies usadas como fuentes naturales de proteínas, ácidos grasos esenciales, carbohidratos, vitaminas, minerales y pigmentos. Este trabajo expone la composición proximal, mineral, vitamínica, perfil de aminoácidos, perfil de ácidos grasos, digestibilidad proteica *in vitro* como también compuestos antioxidantes y propiedades reológicas de dos cepas de *A. maxima* de origen geográfico incierto (*A. maxima* Lefevre 1963/M-132-1 y *A. maxima* LB2342). Adicionalmente, debido a dudas acerca de la procedencia geográfica se aplicó la técnica ERIC-PCR para verificar que en efecto estas cepas pertenecen a la misma especie. Los resultados de esta investigación demuestran que si bien ambas cepas pertenecen a la misma especie, existen diferencias relevantes en la composición nutricional entre *A. maxima* cepa LB2342 y cepa Lefevre 1963/M-132-1 respectivamente en cuanto al contenido de fibra total (15,08 - 21,97 g/100g); hierro (236,93 - 128,74 mg/100g); calcio (123,54 - 307,81 mg/100g); magnesio (294,32 - 627,79 mg/100g); zinc (35,58-83,62 mg/100g); clorofila *a* (1.432,87 - 958,76 mg/100g); B₁ (3,81 - 4,64 mg/10g); B₁₂ (0,18 - 0,26 mg/100g); polifenoles (209,80 - 407,79 mg/100g); ácido palmítico (30,90 - 48,70 mg/100g) y ácido γ -linoléico (29,04 - 13,93 mg/100g). Dichas diferencias pudiesen deberse a la distinta procedencia geográfica, sin embargo, estos resultados indican que es indispensable caracterizar en profundidad las diversas cepas, aun cuando taxonómicamente se les considere como iguales (pertenecen a la misma especie) para la producción de biomasa con una composición nutricional específica requerida para el desarrollo de productos en la industria alimenticia. Los patrones del ERIC-PCR permitieron agrupar las cepas *A. maxima* Lefevre 1963/M-132-1 y *A. maxima* LB2342 con un 93,52 % de similitud permitiendo reiterar, que ambas cepas pertenecen a la misma especie.

Palabras clave: *Arthrospira*, proteína, digestibilidad, ácidos grasos, hierro.

Abstract

Various species of the *Arthrospira* genus have been used as a natural source of proteins, essential fatty acids, carbohydrates, vitamins, minerals and pigments. This work shows the proximal, mineral, antioxidant compounds and vitamin composition, as well as fatty acid and amino acid profiles of two *A. maxima* strains of unknown origin (*A. maxima* Lefevre 1963/M-132-1 y *A. maxima* LB2342). In vitro protein digestibility is also reported, along with the rheological properties of both strains. Moreover, due to some doubts related to their geographic origin, an ERIC-PCR technique was used to verify that both strains belong to the same species. Results from this work demonstrate that, even though both strains are within the same species, there are relevant differences among *A. maxima* LB2342 and Lefevre 1963/M-132-1, regarding their nutritional composition, as total fiber content (15,08 - 21,97 g/100g); iron (236,93 - 128,74 mg/100g); calcium (123,54 - 307,81 mg/100g); magnesium (294,32 - 627,79 mg/100g); zinc (35,58-83,62 mg/100g); chlorophyll *a* (1.432,87 - 958,76 mg/100g); B₁ (3,81 - 4,64 mg/10g); B₁₂ (0,18 - 0,26 mg/100g); polyphenols (209,80 - 407,79 mg/100g); palmitic acid (30,90 - 48,70 mg/100g) and gamma linoleic acid (29,04 - 13,93 mg/100g). These differences might be due to their distinctive geographic origin. Furthermore, these results indicate that it is important to characterize both strains, even though, taxonomically, they are considered equal (belonging to the same species) for biomass production, with a specific nutritional composition required for the development of food products. ERIC-PCR standards allowed grouping the strains *A. maxima* Lefevre 1963/M-132-1 and *A. maxima* LB2342 with a 93,52 % similitude, corroborating that both belong to the same species.

Keywords: *Arthrospira*, protein, digestibility, fatty acids, iron.

1. Introducción

El término “*Spirulina*” ha sido utilizado indistintamente para referirse a los géneros *Arthrospira* y *Spirulina*, así como también a las cianobacterias *Spirulina maxima* (Geitler, 1925), y *Spirulina platensis* (Geitler, 1932), sin embargo, desde 1989 se ha reconocido que estas dos especies pertenecen al género *Arthrospira* (A. Vonshak & Tomaselli, 2000). La identificación taxonómica de las especies de *Arthrospira* se dificulta debido a la variación morfológica en distintas condiciones ambientales. Tanto el problema de la diversidad genética, como de las relaciones filogenéticas de éstas cianobacterias ha sido dilatado y complejo. De hecho, se ha abordado estudiando características moleculares, morfológicas, ultraestructurales, fisiológicas y bioquímicas

(Viti et al., 1997; Scheldeman et al., 1999; Baurain et al., 2002; Manen & Falquet, 2002; Ballot, Dadheech, & Krienitz, 2004; Mühling, Belay, & Whitton, 2005; Mühling et al., 2005). A pesar que *A. maxima* y *A. platensis* han sido separadas en dos entidades taxonómicas diferentes, basadas en caracteres morfológicos y de distribución, persiste aun un debate sobre la clasificación de estas especies (Hindak, 1985; Komárek & Lund, 1990; Tomaselli, 1997; Komárek, 2000). El problema de la identificación precisa se torna más complicado debido a las distintas denominaciones que suelen usar los ceparios y colecciones alrededor del mundo y los datos que acompañan a dichas entradas (entiéndase colector, lugar de colecta, y otras características correspondientes a la

muestra). Por ejemplo, la cepa *Arthrospira maxima* LB2342 de CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste) de México resulta ser adquirida en la Colección de Cultivo de Algas en la Universidad de Texas en Austin, USA, en la cual descansa bajo el número 2342. En dicha colección se reconoce que el colector fue M. Lefevre en 1963 recibiendo de este el número M132/1 y que fue colectada en el Lago Natron (cabe destacar que el “Lago Natron” es un lago salado endorreico africano localizado en el Gran Valle del Rift, en Tanzania, en la frontera con Kenia). Otra información importante que se puede leer en la ficha es la lista de “relatives” o en este caso, clones en otros ceparios: CCAP 1475/9 (CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa, Ambleside, Cumbria, United Kingdom); y SAG B 84.79 (Culture Collection of Algae at Goettingen University, Alemania). Estas colecciones declaran el origen de la cepa en el Lago Chad, Chad, en el caso de CCAP y en el Lago Natron, Chad, en el caso de SAG, ubicando las coordenadas del lugar de colecta en 14°18'25.1"N 18°34'53.5"E, cabe destacar que todas las ubicaciones son ambiguas. El Lago Natron se encuentra separado del Lago Chad casi por 3000 km. de distancia. Por otro lado, entre las coordenadas declaradas en SAG (que efectivamente se encuentran en Chad) y el Lago Chad existen casi 400 km. de distancia y aparentemente en esa ubicación (o sus alrededores) no existe un lago, a menos que se esté haciendo referencia a uno de naturaleza efímera. Por otro lado, tenemos el mineral llamado Natron ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) que es un carbonato, al cual se podría estar haciendo alusión cuando se dice “Natron Lake” en idioma inglés, es decir, un lago carbonatado, en el cual existe o se extrae este mineral. Sin embargo, hacer esta alusión al mineral cuando se conoce un lago cuyo nombre propio es “Lago Natron”,

puede y de hecho lo hace, confundir acerca de la verdadera procedencia de la muestra. Por otro lado, contábamos también en nuestra colección con otra cepa, *Arthrospira* sp. (‘*platensis*’) Lefevre 1963/M-132-1 procedente de CCALA (Culture Collection of Algal Laboratory) de la República Checa (indicando su ficha que fue colectada en Chad, en un lago, y registrada originalmente como LEFEVRE 1963/M-132-1), reclasificada luego como *Arthrospira maxima* (Setchell & Gardner, 1917). En principio ambas cepas se suponían de distinta procedencia geográfica, luego se sospechó que pudiesen ser la misma cepa, a lo cual siguieron una serie de análisis que se presentan en este trabajo, hasta llegar al análisis genómico lo que consideramos una prueba bastante confiable para dilucidar nuestras dudas.

Aunque la explotación comercial y la formulación de alimentos suelen estar lejos de los problemas taxonómicos, es importante conocer las características de las cepas a ser cultivadas con este fin. Esto principalmente puesto que a pesar de que taxonómicamente se pudiese estar en presencia de la misma especie y, por tanto, suponer que las características en términos de la composición y otras características importantes con fines alimenticios son semejantes, pudiese resultar que cepas clasificadas bajo la misma denominación taxonómica presenten diferencias que resulten sustanciales desde el punto de vista nutricional. Es por esto y por las dudas explicadas anteriormente acerca de la procedencia geográfica, que se planteó tal comparación para evaluar su incorporación en el desarrollo de productos alimenticios.

2. Materiales y Métodos

2.1 Medio de Cultivo

Por las razones mencionadas en la sección anterior las cianobacterias: *Arthrospira maxima* LB2342 de CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste) de México y *Arthrospira* sp. (*platensis*) Lefevre 1963/M-132-1 de CCALA (Culture Collection of Algal Laboratory) de la República Checa (procedente de Chad), esta última reclasificada luego como *Arthrospira maxima*, fueron las seleccionadas para este trabajo de investigación. A pesar de este hecho, seguiremos haciendo la distinción *maxima* y "*platensis*" sólo con la intención de poder diferenciar claramente cada una de las mismas en las distintas determinaciones y pruebas aquí realizadas.

La biomasa se cultivó a una temperatura de 30 °C con burbujeo de aire de 2 L·min⁻¹ y una intensidad lumínica de 80 μE·m⁻²·s⁻¹ (F. Chen & Zhang, 1997) en Medio Spirulina SAG "*Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen*", (Schlösser, 1982), el cual es una modificación del Medio Aiba y Ogawa (Aiba & Ogawa, 1977) que mantiene la composición de macronutrientes, difiriendo solamente en los micronutrientes, siendo estos últimos preparados en dos soluciones separadas. El Medio Aiba y Ogawa es una reformulación del medio Zarrouk (Zarrouk, 1966), que introduce la solución amortiguada de carbonato/bicarbonato a fin de mantener un pH de 9,4.

2.2 Análisis Bromatológico

La determinación de humedad se hizo según la Norma Covenin Venezolana 1553-80 (NCV, 1980b), la de cenizas según la Norma Covenin Venezolana 1783-81 (NCV, 1981), la de proteína cruda según la Norma Covenin Venezolana 1195-80 (NCV, 1980a) y la de grasa cruda según la

Norma Covenin Venezolana 1726-97 (NCV, 1997). La fibra dietética soluble e insoluble se determinó por el método multienzimático de Prosky et al. (1984) y los carbohidratos disponibles se determinaron por diferencia de la fibra total con los carbohidratos totales.

La determinación de minerales se realizó por absorción atómica, con un equipo Perkin-Elmer modelo AAnalyst200, utilizando la metodología de la AOAC 985.35 (2005) y las vitaminas B₁, B₂, B₃, B₆ y B₁₂ vía HPLC por los métodos de Dalbacke & Dahlquist (1991) y Lam, Molcomb, & Fusaki (1984). La cuantificación de las ficobiliproteínas se realizó por las ecuaciones de Bennett & Bogorad (1973) a partir de las densidades ópticas de los extractos crudos, en los rangos de densidades ópticas de 0,05 a 1,00 donde todos los coeficientes de extinción son constantes y los espectros de absorción de las mezclas son estrictamente aditivos. La determinación de polifenoles se realizó según la metodología de Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós (1999). La extracción de la clorofila *a*, carotenoides y xantofilas se realizó según la metodología de la AOAC 940.03 (2005) y AOAC 970.64 (2005) respectivamente.

Las propiedades funcionales evaluadas fueron: la capacidad de absorción de agua por el método descrito por (Kite, Schock, & Leach, 1957), capacidad de absorción de grasa de acuerdo a Lin & Humbert (1974) y la capacidad gelificante, siguiendo la metodología de Coffmann & García (1977). La digestibilidad *in vitro* se determinó por el método multienzimático de Hsu, Vavak, Satterlee, & Miller (1977), el perfil de aminoácidos se determinó vía HPLC por el método de Rozan, Kuo, & Lambein (2000), la extracción de lípidos totales se realizó por el método de Bligh & Dyer (1959), la cuantificación por el

método de Marsh & Weinstein (1966), y la extracción de ácidos grasos (derivatización) por el método de Sato & Murata (1988). El análisis de los mismos se realizó en un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas marca Hewlett Packard Series G1800B. Previamente se realizó la curva de calibración con una mezcla de 28 estándares de ácidos grasos metil-esterificados.

2.3 Identificación Molecular

Para realizar el análisis genómico se obtuvieron cultivos axénicos de ambas cepas de *Arthrospira* y se incluyó como control la cepa de *Spirulina subsalsa* utilizando la técnica descrita por Sena et al. (2011). El ADN genómico de cada una de las especies se extrajo a partir de 100 ml de los cultivos axénicos utilizando el método descrito por W. Chen & Kuo (1993) con las siguientes modificaciones: (1) Para a la extracción de ADN los cultivos se centrifugaron a 4.000 rpm por 6 minutos, se descartaron los sobrenadantes y resuspendieron los pellets con 5 ml de buffer TE (100mM Tris pH 7.4; 10mM EDTA pH 8.0) y se incubaron a -20°C toda la noche. Posteriormente se descongelaron y se dividieron en volúmenes de 1,5 ml en tubos eppendorf. Se centrifugaron a 11,000 rev/min durante 7 minutos (centrífuga modelo 5429 Eppendorf, Germany). (2) El buffer de lisis utilizado para la extracción de ADN genómico a los pellets obtenidos de los cultivos axénicos de las cianobacterias fue el reportado por Wu, Zarka, & Boussiba (2000). (3) La temperatura y tiempo de lisis fue de 40°C a 300 rev/min por 30 minutos y el ADN genómico se cuantificó en un biofotómetro (Eppendorf Biophotometer, USA).

Para la tipificación por la técnica ERIC-PCR se utilizaron dos pares de cebadores específicos descritos por Versalovic, Koeuth, Lupski, & Plaza (1991) ERIC (1)

5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA3' y ERIC (2)

5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC3', los cuales hibridan con las secuencias consenso repetitivas intergénicas presentes en la mayoría del genoma bacteriano. Esta técnica se llevó a cabo en tubos eppendorf de 0,2 mL donde se amplificó aproximadamente 100 ng de ADN de cada muestra en volúmenes de reacción de 25 µL que consistieron de 5 µL de solución tampón de la reacción 1X, 12,95 µL agua destilada estéril, 2,5 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), 0,2 mM de cada cebador y 0,8 µL de 5U/ µL de TaqADN polimerasa (Promega Madison USA). Las condiciones de la reacción utilizadas fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, asociación a los 50 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 6 minutos, con una extensión final a 72 °C durante 6 minutos al final de 35 ciclos.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,5% con buffer TBE 1X (Tris – Borato – EDTA) corridos a un voltaje de 80V y teñidos con bromuro de etidio (2µg/mL) durante un minuto. El gel se visualizó en el transiluminador ultravioleta (UVITEC-chemi, USA). En el gel se incluyó un marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen) de peso molecular de 100 - 12000 pares de bases. Los patrones de bandas generados por el ERIC-PCR fueron inspeccionados de manera visual de un gel de electroforesis construyendo una matriz de presencia/ausencia de bandas, el análisis de agrupación del patrón de bandas se realizó en base al coeficiente de Pearson transformados a distancia ($d = 1 - r$) utilizando el software MINITAB versión 16.1.1.

3. Resultados y Discusión

Los análisis sobre la composición bioquímica para las dos cepas de las cianobacterias cultivadas del género *Arthrospira* (*maxima* y "*platensis*") se observa en la Tabla 1. El contenido de proteínas fue de 69,75 % para *A. maxima* y de 61,06 % para *A. "platensis"* datos que coinciden con los valores de Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez (2006), quienes reportaron un rango entre 50 a 70 % en base seca. El contenido de cenizas fue de 9,89 % para *A. maxima* y de 10,96 % para *A. "platensis"*, resultados semejantes a los hallados por Belay (2008) quien los reporta entre el 7 y 13 %. El contenido de grasa para *A. maxima* fue de 5,28 % y para *A. "platensis"* fue de 6,01 %, valores que se corresponden con los que reporta A. Belay (2002) entre 6 y 8 %.

El contenido de carbohidratos totales, calculado por diferencia del 100% del análisis bromatológico, fue de 15,08 % para *A. maxima* y de 21,97 % para *A. "platensis"*, datos que concuerdan con los reportados por A. Belay (2002) entre el 15 y el 25 %. Las inclusiones citoplasmáticas semejantes a los gránulos de glucógeno depositados en el citoplasma que sirven

como fuentes de carbono y de energía según Fay (1983) explican el contenido de carbohidratos disponibles, los cuales fueron de 5,91 % para *A. maxima* y de 7,21 % para *A. "platensis"*, valores sustentados por Casu, Naggi, & Vercellotti, R. (1980) y Shekharam, Venkataraman & Salimath (1987).

Según Fay (1983) las células de *Arthrospira* poseen una pared celular multiestratificada envuelta por una cápsula de polisacáridos, la fibra dietética insoluble que estima este valor que se reporta en este trabajo fue de 9,18 % para *A. maxima* y de 13,23 % para *A. "platensis"*, respectivamente. Para Amha Belay (2008) el valor de la fibra es de 7,70 % pero no especifica el tipo referido, sin embargo, por su valor se puede pensar que es fibra dietética insoluble. El contenido de fibra dietética soluble obtenido para *A. maxima* fue de 0,48 % y para *A. "platensis"* de 1,53 %, resultado que concuerda con los valores reportados para los polisacáridos como la Immulina y el Calcio Spirulan (Ca-SP), que representan entre el 0,5% y el 2,0% en peso seco del contenido total de carbohidratos de estas microalgas según Pugh, Ross, Elsohly, Elsohly, & Pasco (2001).

Tabla 1. Análisis de composición en base seca de *A. maxima* vs. *A. platensis*

Contenido (g/100g)	<i>A. maxima</i>	<i>A. platensis</i>
Proteínas	69,75±0,02 ^b	61,06±0,01 ^a
Cenizas	9,89±0,28 ^a	10,96±0,19 ^b
Grasa	5,28±0,14 ^a	6,01±0,11 ^b
Carbohidratos Totales	15,08±0,77 ^a	21,97±0,45 ^b
Carbohidratos Disponibles	5,91±0,96 ^a	7,21±0,79 ^a
Fibra Total	9,66±0,19 ^a	14,76±0,14 ^b
Fibra Insoluble	9,18±0,10 ^a	13,23±0,08 ^b
Fibra Soluble	0,48±0,09 ^a	1,53±0,06 ^b

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Al observar los resultados de la Tabla 1, se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas en todos los resultados que comprenden el análisis bromatológico. Muchos de los datos encontrados en este trabajo se presentan dentro de los intervalos de variación reportados en la bibliografía, sin embargo, es importante resaltar que las diferencias entre ambas cepas se presentan a pesar de haber sido cultivadas en el mismo medio de cultivo, bajo las mismas condiciones, y haber sido clasificadas como la misma especie.

Tal como se presenta en la Tabla 2, el contenido de minerales analizados para las cepas de *Arthrospira* en estudio evidencia que en el caso de *A. maxima* se obtuvo el doble en el contenido de hierro con respecto a la cepa de *A. "platensis"* y lo contrario en el contenido de calcio, magnesio y zinc donde *A. "platensis"* fue superior a la cepa de *A. maxima*. Según Amha Belay (2008), 100 g de estas

cianobacterias aportan 1,45 mg de zinc, 468 mg de calcio, 319 mg de magnesio, 961 mg de fósforo y 87,4 mg de hierro que para los valores reportados en este trabajo fueron superiores exceptuando el contenido de calcio. Nuevamente se puede observar el fenómeno de diferencias estadísticamente significativas en los contenidos de todos los minerales de las dos cepas estudiadas. En este caso se debe poner especial atención en que no existe un patrón dominante sino que existen valores que alternan sus máximos entre ambas cepas. Esto hace pensar que, sobre todo en las aplicaciones industriales que pudiesen requerir producciones de minerales diferenciales, se debe caracterizar totalmente a las cepas disponibles. Ahora bien, si se piensa en la utilización industrial, haciendo especial énfasis en su importancia como fuente de hierro, es claro que conviene más elegir *A. maxima* en lugar de *A. "platensis"* a pesar de que taxonómicamente ambas sean equivalentes.

Tabla 2. Contenido de minerales y vitaminas en base seca de *A. maxima* vs. *A. platensis*

Elemento	<i>A. maxima</i>	<i>A. platensis</i>
Sodio	1.055,47±19,33 ^b	659,57±18,10 ^a
Potasio	2.125,60±23,34 ^b	1.369,08±19,28 ^a
Fósforo	1.300,53±18,43 ^a	1.384,85±16,85 ^b
Hierro	236,93±1,74 ^b	128,74±1,03 ^a
Calcio	123,54±2,97 ^a	307,81±4,31 ^b
Magnesio	294,32±6,71 ^a	627,79±10,77 ^b
Zinc	35,58±0,63 ^a	83,62±2,72 ^b
Cobre	2,03±0,01 ^b	1,46±0,02 ^a
B₁ (Tiamina)	3,81±0,48 ^a	4,65±0,31 ^b
B₂ (Riboflavina)	4,80±0,57 ^a	4,10±0,57 ^a
B₃ (Niacina)	12,30±0,76 ^a	13,00±0,76 ^a
B₆ (Piroxidina)	5,32±0,80 ^a	5,11±0,43 ^a
B₁₂ (Cianocobalamina)	0,18±0,04 ^a	0,26±0,03 ^b

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

Según Amha Belay (2008) cada 100 g de *Arthrospira* contienen 0,50 mg de Tiamina (B₁), 4,53 mg de Riboflavina (B₂), 14,90 mg de Niacina (B₃), 0,93 mg de Piroxidina (B₆) y 0,16 mg de Cianocobalamina (B₁₂). En comparación de estos valores, los contenidos de Tiamina (B₁) y Piroxidina (B₆) reportados en este trabajo en la Tabla 2 son al menos cinco veces más altos, para ambas especies, a excepción del contenido de Cianocobalamina (B₁₂) que en *A. platensis* fue aproximadamente el doble de lo reportado en la bibliografía con respecto de *A. maxima*. Los valores reportados para esta cepa fueron semejantes a los publicados por Amha Belay (2008).

Los resultados obtenidos en este trabajo de compuestos con potencial antioxidante, se presentan en la Tabla 3. En ellos se muestra que el contenido de polifenoles de *A. platensis* es 94,37 % más alto que el de *A. maxima*, situación que se invierte con respecto al contenido de clorofila a en un 49,45 % más elevado en *A. maxima* comparado con *A. platensis*. Con respecto al contenido de ficocianina y carotenoides totales fueron semejantes en ambas especies y muy cercanos a los valores publicados por Amha Belay (2008) en 17,2 % y 504 mg/100g respectivamente. De forma similar a los casos anteriores, se observan diferencias que pudiesen resultar de interés entre las cepas si se estuviese interesado en la producción de polifenoles.

Tabla 3. Composición de antioxidantes de *A. maxima* vs. *A. platensis* (en base seca)

Contenido (mg/100g)	<i>A. maxima</i>	<i>A. platensis</i>
Ficocianina	15.656,03±281,18 ^a	17.680,75±185,16 ^b
Carotenoides	533,52 ±2,95 ^a	547,68±1,31 ^b
Clorofila a	1.432,87±0,24 ^b	958,76±6,87 ^a
Polifenoles	209,80±2,86 ^a	407,79±11,46 ^b

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (P<0.05)

Tabla 4. Propiedades funcionales de *A. máxima* vs. *A. platensis* (P<0.05)

Muestra	Absorción de agua (g agua/g muestra)	Absorción de grasa (g aceite/g muestra)	Capacidad gelificante (g agua/g muestra)
<i>A. maxima</i>	7,26±0,10 ^a	4,41±0,04 ^b	8 %, 12 % y 14%
<i>A. platensis</i>	3,26±0,01 ^b	1,43±0,05 ^a	12 % y 14%

Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas (P<0.05)

Las cianobacterias *A. maxima* y *A. platensis* por su alto contenido de proteínas 69,75 y 61,06 % respectivamente, presentan buenas propiedades funcionales en términos de: capacidad de absorción de agua, capacidad de absorción grasa y capacidad de gelificación, como se observa

en la Tabla 4. Los resultados de este trabajo muestran que la menor concentración en la que se presenta gelificación para *A. maxima* fue al 8%, mientras que para *A. platensis* su concentración mínima de gelificación fue del 12%. Esto pudiera deberse al hecho de que *A. maxima* tiene un

mayor contenido de proteínas en comparación con *A. "platensis"*. Según Kinsella & Melachouis (1976) y Sathe, Deshpande, & Salunkhe (1982) la concentración de proteínas es la variable más importante en la formación y en la firmeza del gel donde una alta proporción de proteínas globulares contribuyen en este proceso, debido a que los aminoácidos polares están expuestos hacia la fase acuosa favoreciendo la solubilidad, emulsificación y propiedad espumante.

El contenido de aminoácidos esenciales para ambas especies como se observa en la Figura 1 fue similar a los que reporta Cohen (2002) en base a 16g de proteína, sin embargo, en comparación con estos patrones es deficiente en lisina, cisteína y

metionina, pero Ciferri (1983) aboga que como fuente proteína aunque sea inferior a las requeridas en base a los aminoácidos esenciales, es superior a todas las proteínas vegetales. Se observa además que ambas cepas poseen perfiles bastante similares, es decir, no se aprecian grandes diferencias en sus perfiles aminoácidos. En lo concerniente a digestibilidad proteica *in vitro* para *A. maxima* y *A. "platensis"* los valores obtenidos en este trabajo fueron 96,42 y 94,60 % respectivamente evidenciando una notable semejanza, por lo cual se puede decir que además de su elevado contenido de proteínas, estas son de buena calidad con una alta biodisponibilidad coincidiendo con Dillon & Phan (1993).

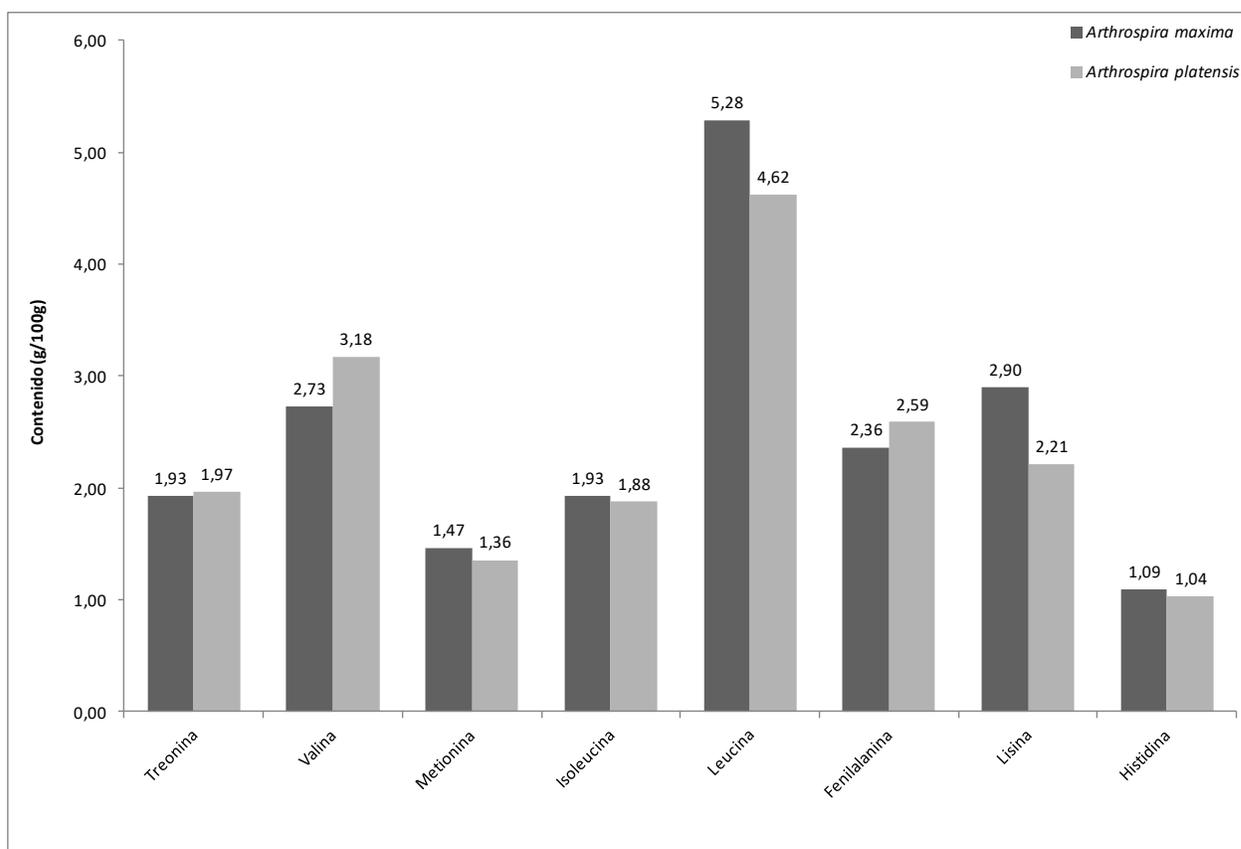


Figura 1. Contenido de aminoácidos (g/100g) de *A. maxima* vs. *A. platensis*.
Datos reportados en base de 8 % de humedad.

El perfil de ácidos grasos para ambas especies, tal como se observa en la Figura 2, concuerda con lo que Otleş & Pire (2001) reportaron, acerca de que estas cianobacterias contienen ácidos grasos esenciales como el ácido linoléico (C_{18:2})

$\Delta^{9, 12}$ y el ácido gammalinolénico (C_{18:3}) $\Delta^{6, 9, 12}$, lo que también coincide con Cohen (2002), el cual reporta que los ácidos grasos presentes que se encuentran en mayor proporción son el ácido palmítico, γ -linolénico, linoléico y oléico.

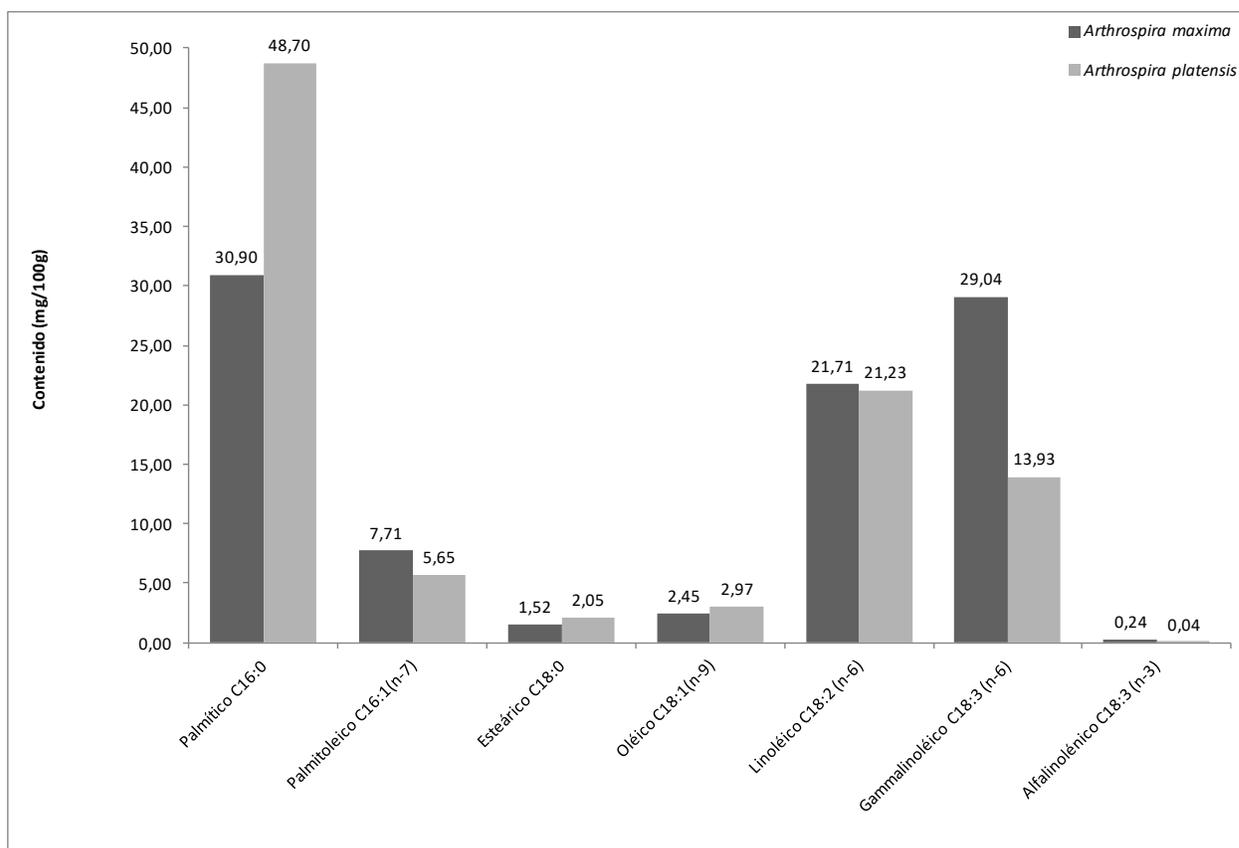


Figura 2. Contenido de ácidos grasos (mg/100g) de *A. maxima* vs. *A. "platensis"*.
Datos reportados en base de 8 % de humedad.

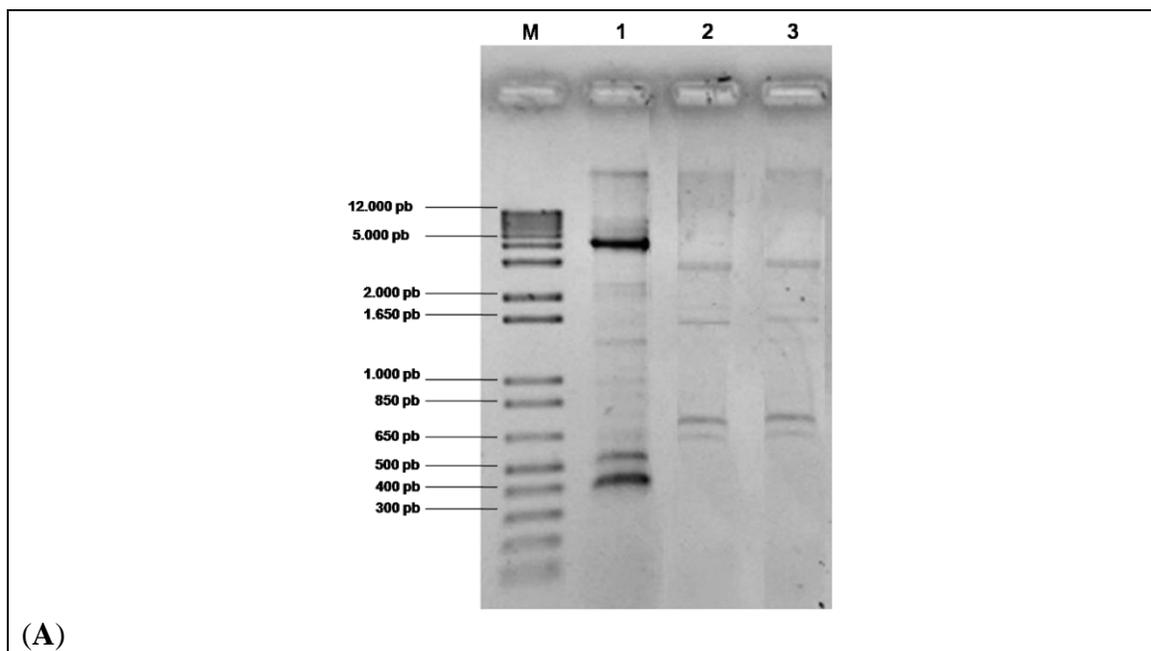
Cuando se analizan los resultados de la Figura 2, se pueden observar diferencias importantes entre las cepas en estudio, sobre todo en lo que respecta a los contenidos de ácido palmítico y γ -linolénico. Nuevamente estas diferencias sugieren distintas posibilidades de aplicación, si se requiere de producción diferencial. Por ejemplo, si se estuviese interesado en la producción de ácido gammalinolénico, se debería escoger *A.*

maxima, mientras que si el interés estuviese enfocado en el ácido palmítico la cepa a emplear sería *A. "platensis"*. Para Nichols & Wood (1968) la presencia de este ácido graso es una característica de identificación taxonómica de este género en particular, además según Ciferri (1983) algunos investigadores han mostrado que también hay presencia del ácido graso α -linolénico (C_{18:3}) $\Delta^{9, 12, 15}$, del cual se ha sido verificado su existencia como se observa

en la Figura 2 de este trabajo. Por estos hechos se justifica, al menos en principio, el interés en cepas que pudiesen producir ácidos grasos en proporciones diferentes. De esto último, se desprende entonces como requisito indispensable, el estudio a fondo no solamente de especies distintas, sino de cepas que, aunque pudiesen estar clasificadas taxonómicamente como iguales, tengan producción diferencial de ciertos ácidos grasos, como se evidencia en los resultados obtenidos en este trabajo.

La técnica de tipificación ERIC-PCR la cual utiliza cebadores que permiten hibridar con secuencias intergénicas repetitivas “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)” altamente conservadas según Versalovic et al. (1991), puede aplicarse a un amplio rango de microorganismos bacterianos inclusive cianobacterias (Rasmussen & Svenning, 1998), permitiendo obtener un patrón de bandas único “DNA fingerprinting” (huella genética). En la Figura 3 (A), se muestran

los patrones de bandas ERIC-PCR de las cepas *A. maxima* LB2342 y *Arthrospira* sp. (*platensis*) cepa Lefevre 1963/M-132-1 reclasificada como *A. maxima* y *Spirulina subsalsa*, las cuales presentaron de 6 a 16 bandas en un rango comprendido entre 400 y 5000 pb y fueron agrupados en dos clusters (1-2) como se muestra en el dendograma Figura 3 (B). En el cluster 2 se agruparon dos patrones que corresponden a las cepas *A. maxima* LB2342 y *Arthrospira* sp. “*platensis*” cepa Lefevre 1963/M-132-1 con un 93,52 % de similitud calculado en base a la distancia (coeficiente de correlación de Pearson), esta alta coincidencia (valores de similitud $\geq 85\%$ indican patrones de banda idénticos) permite inferir que ambas cepas pertenecen al mismo género y especie. Por otra parte, en el cluster 1 permaneció la cianobacteria *Spirulina subsalsa* 25,6% de similitud, la cual pertenece a una especie y género distinto.



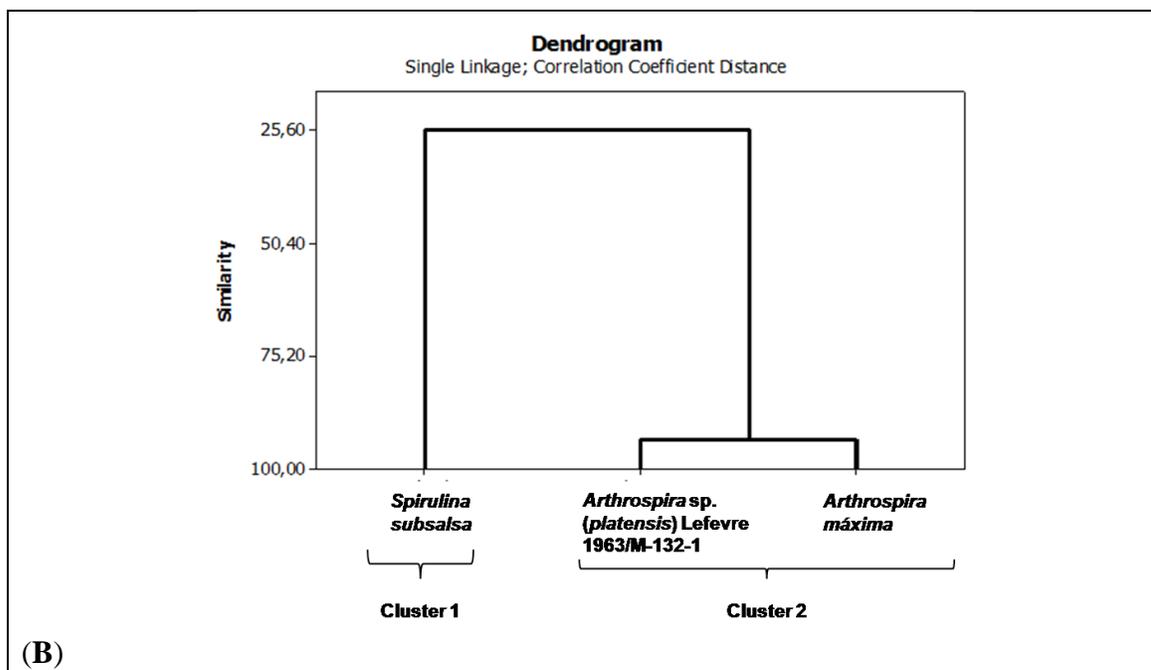


Figura 3. Patrones ERIC-PCR *Spirulina subsalsa*, *Arthrospira* “*platensis*” y *A. maxima*.
(A) Patrones de ERIC-PCR correspondientes a las cianobacterias filamentosas en gel de agarosa al 1,5 %. El carril M: Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder; 1: *Spirulina subsalsa*, 2: *Arthrospira sp. “platensis”* cepa Lefevre 1963/M-132-1 y 3: *A. maxima*.
(B) Dendrograma de similitud entre los patrones ERIC-PCR.

4. Conclusiones

El contenido elevado de proteínas en peso seco que se encontró en estas cianobacterias del género *Arthrospira* hace de éstas, una fuente muy rica en proteínas de origen vegetal de buena calidad. Así mismo se evidencia el contenido de ácidos grasos esenciales, minerales y fibra soluble e insoluble encontrándose adecuados para su uso como alimento humano o animal.

Sin embargo, al momento de escoger especies o cepas con fines de producción industrial (aun cuando las mismas hayan sido taxonómicamente clasificadas dentro de una misma especie), se debe hacer una meticolosa caracterización que permita que dicha selección optimice la producción de los compuestos objetivo. Esto se evidencia a lo largo de toda la cadena de resultados de este trabajo, pues a pesar de haber

escogido dos cepas clasificadas como una misma especie, los contenidos particulares de los diferentes compuestos y/o capacidades nos hacen pensar en diferentes aplicaciones (rendimientos), dependiendo del objetivo último.

Específicamente hemos encontrado diferencias importantes en el contenido de fibra (soluble e insoluble), minerales (hierro, calcio, magnesio y zinc), vitaminas (B₁ y B₁₂), compuestos con potencial antioxidante (polifenoles y clorofila *a*), algunas vitaminas (B₁ y B₁₂), ácidos grasos (palmítico y gammalinolénico) y en sus propiedades funcionales (absorción de agua, absorción de grasa y capacidad gelificante).

Es importante hacer notar que estas diferencias pudiesen presentarse a pesar de

que el crecimiento se realice en idénticas condiciones, como se ha evidenciado en este trabajo, en donde ambas cepas se crecieron en medios de cultivos y condiciones similares. En caso de una posible aplicación industrial sería necesario explorar las condiciones de cultivo que intensifican las diferencias aquí encontradas.

5. Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue financiado parcialmente por el Sub-proyecto BID-FONACIT N° 20006000537 “Desarrollo y optimización del cultivo de microalgas promisorias en la nutrición animal (aves, porcinos, peces y camarones) y creación de la Red Venezolana de Investigación en Microalgas”, Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología de Venezuela.

Open Access: *This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0) which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.*

6. Referencias

- Aiba, S., & Ogawa, T. 1977. Assessment of growth yield of a blue-green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 102(2): 179-182.
- AOAC 940.03. 2005. Chlorophyll in plants. In W. Horwitz & G. W. Latimer (Eds.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*.
- AOAC 970.64. 2005. Carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds. In W. Horwitz & G. W. Latimer (Eds.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*.
- AOAC 985.35. 2005. Mineral in infant formula, enteral products, and pet foods. In W. Horwitz & G. W. Latimer (Eds.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*.
- Ballot, A., Dadheech, P., & Krienitz, L. 2004. Phylogenetic relationship of *Arthrospira*, *Phormidium* and *Spirulina* strains from Kenia and Indian waterbodies. *Algol. Stud.* 113: 37-56.
- Baurain, D., Renquin, L., Grubisic, S., Scheldeman, P., Belay, A., & Wilmotte, A. 2002. Remarkable conservation of internally transcribed spacer sequences of *Arthrospira* (“*Spirulina*”) (Cyanophyceae, Cyanobacteria) strains from four continents and of recent and 30-year-old dried samples from Africa. *J. Phycol.* 38(2): 384-393.
- Belay, A. 2002. Mass culture of *Spirulina* outdoors: The Earthrise farms experience. In: Avigad Vonshak (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology* (pp. 131-158). London: Taylor & Francis.
- Belay, A. 2008. *Spirulina (Arthrospira): Production and Quality Assurance*. In: M. E. Gershwin & A. Belay (Eds.), *Spirulina in Human Nutrition and Health* (pp. 1-25). Boca Raton: CRC Press.
- Bennett, A., & Bogorad, L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *T. J. Cell Biol.* 58(2): 419-435.
- Bligh, E.G., & Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37(8): 911-917.

- Casu, B., Naggi, A., & Vercellotti, R.J. 1980. Consiglio Nazionale delle Ricerche. In: R. Materassi (Ed.), *Polisaccaridi di riserva della Spirulina platensis, estrazione e caratterizzazione* (pp. 145-153). Roma.
- Chen, F., & Zhang, Y. 1997. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enz.Microb. Technol.* 20(3): 221-224.
- Chen, W., & Kuo, T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21(9): 2260-2260.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47(4): 551-578.
- Coffmann, C.W., & García, V.V. 1977. Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. *Int. J. Food Sci. Technol.* 12(5): 473-484.
- Cohen, Z. 2002. The chemicals of *Spirulina*. In: Avicad Vonshak (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology* (pp. 175-204). Taylor & Francis.
- Dalbacke, J., & Dahlquist, I. 1991. Determination of vitamin B12 in multivitamin-multimineral tablets by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J. Chrom. A*, 541(C): 383-392.
- Dillon, J.C., & Phan, P.A. 1993. *Spirulina* as a source of proteins in human nutrition. In: F. Doumengué, H. Durand-Chastel, & A. Toulemont (Eds.), *Spiruline algue de vie* (pp. 103-107). Monaco: Bulletin de l'Institut Océanographique.
- Fay, P. 1983. *The Blue Greens (Cyanophyta - Cyanobacteria)* (Edward Arn). London.
- Geitler, L. 1925. Cyanophyceae. In: A. Pascher (Ed.), *Die Süßwasser-Flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz* (Vol. 12, pp. 1-450). Jena: Gustav Fischer.
- Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. In: L. Rabenhorst (Ed.), *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* (Vol. 14, pp. 673-1196). Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft.
- Hindak, F. 1985. Morphology of trichomes in *Spirulina fusiformis* Voronichin from Lake Bogoria, Kenya. *Algol.Stud.* 38-39: 201-218.
- Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., & Miller, G.A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci.* 42(5): 1269-1273.
- Kinsella, J.E., & Melachouis, N. 1976. Functional properties of proteins in foods: A survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7(3): 219-280.
- Kite, F.E., Schock, T.J., & Leach, H.W. 1957. Granule swelling and paste viscosity of thick boiling starches. *Baker's Digest*, 31(4): 42-46.
- Komárek, J. 2000. Problems in Cyanobacterial Taxonomy: Implication for most common toxin producing species. In: E. Viaggiu & B. Milena (Eds.), *Le fioriture di alghe tossiche nelle acque dolci: emergenza sanitaria e misure di controllo*. (pp. 6-43). Roma.
- Komárek, J., & Lund, J.W.G. 1990. What is '*Spirulina platensis*' in fact?. *Algol. Stud.* 58: 1-13.
- Lam, F.L., Molcomb, I.J., & Fusaki, S.A. 1984. Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, piridoxina, tiamina and riboflavina in multivitamin-mineral preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67(5): 1007-1011.

- Lin, M.J., & Humbert, E.S. 1974. Certain Functional properties of sunflower meal products. *J. Food Sci.* 39(2): 368-370.
- Manen, J.F., & Falquet, J. 2002. The cpcB-cpcA locus as a tool for the genetic characterization of the genus *Arthrospira* (Cyanobacteria): Evidence for horizontal transfer. *Int. J. Syst. Evol. Micro.* 52(3): 861-867.
- Marsh, J.B., & Weinstein, D.B. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7(4): 574-576.
- Mühling, M., Belay, A., & Whitton, B. 2005. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. *J. Appl. Phycol.* 17(2): 137-146.
- NCV. 1980a. Alimentos. Determinación de Nitrógeno. Método de Kjeldahl. 1195-80. *SENCAMER*.
- NCV. 1980b. Productos de Cereales y Leguminosas. Determinación de Humedad. 1553-80. *SENCAMER*.
- NCV. 1981. Productos de Cereales y Leguminosas. Determinación de Cenizas. 1783-81. *SENCAMER*.
- NCV. 1997. Aceites y Grasas Vegetales. Determinación de Grasa. 1726-97. *SENCAMER*.
- Nichols, B.W., & Wood, B.J.B. 1968. The occurrence and biosynthesis of gamma-linolenic acid in a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Lipids* 3(1): 46-50.
- Otleş, S., & Pire, R. 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 84(6): 1708-1714.
- Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., DeVries, J. W., Schweizer, T.F., & Harland, B.F. 1984. Determination of total dietary fiber in foods and food products and total diets: Interlaboratory Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 1044-1053.
- Pugh, N., Ross, S.A., Elsohly, H.N., Elsohly, M.A., & Pasco, D.S. 2001. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Medica.* 67(8): 737-742.
- Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia.* 31(9): 657-663.
- Rasmussen, U., & Svenning, M.M. 1998. Fingerprinting of Cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1): 265-272.
- Rozan, P., Kuo, Y.H., & Lambein, F. 2000. Free amino acids present in commercially available seedlings sold for human consumption. A potential hazard for consumers. *J. Agr. Food Chem.* 48(3): 716-723.
- Sathe, S.K., Deshpande, S.S., & Salunkhe, D.K. 1982. Functional properties of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) Proteins. *J. Food Sci.* 47: 503-509.
- Sato, N., & Murata, N. 1988. Membrane Lipids. *Methods.* 167: 251-259.
- Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Mühling, M., Whitton, B.A., Belay, A., Wilmotte, A. 1999. *Arthrospira* ('*Spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*, 172(2), 213-222.
- Schlösser, U.G. 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 95(1): 181-276.

- Sena, L., Rojas, D., Montiel, E., González, H., Moret, J., & Naranjo, L. 2011. A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. cyanobacteria. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 27(5): 1045-1053.
- Setchell, & Gardner, N.L. 1917. New Pacific coast marine algae I. In: N. L. Gardner (Ed.), *New Pacific coast marine algae* (pp. 377-416). Berkeley: University of California Publications in Botany.
- Shekharam, K.M., Venkataraman, L.V., & Salimath, P.V. 1987. Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue green alga *Spirulina platensis*. *Phytochem.* 26(8): 2267-2269.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Meth. Enzymol.* 299(A): 152-178.
- Tomaselli, L. 1997. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: A Vonshak (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology* (pp. 1-15). London: Taylor & Francis.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., & Plaza, O.B. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res.* 19(24): 6823-6831.
- Viti, C., Ventura, S., Lotti, F., Capolino, E., Tomaselli, L., & Giovannetti, L. 1997. Genotypic diversity and typing of cyanobacterial strains of the genus *Arthrospira* by very sensitive total DNA restriction profile analysis. *Res. Microbiol.* 148(7): 605-611.
- Vonshak, A., & Tomaselli, L. 2000. *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. In: B. A. Whitton & M. Potts (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space* (pp. 505-522). Netherlands: Springer.
- Wu, X., Zarka, A., & Boussiba, S. 2000. A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18(4): 385-392.
- Zarrouk, C. 1966. *Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler*. Université de Paris.