

MICROBIOLOGIA ȘI BIOTEHNOLOGIA

CONȚINUTUL PIGMENȚILOR ȘI ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ LA *ARTHROSPIRA PLATENSIS* ÎN CONDIȚII DE STRES HIPOTERMIC

¹Cepoi Liliana, ¹Rudi Ludmila, ¹Chiriac Tatiana, ²Becze Anca,
²Simedru Dorina, ¹Rudic Valeriu.

¹Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

²Institutul de Cercetări pentru Instrumentație Analitică, ICIA, Chuj-Napoca, România

Rezumat

În articol sunt prezentate rezultatele cercetărilor orientate spre elucidarea influenței stresului hipotermic asupra conținutului de pigmenți și activității antioxidante la spirulina. Stresul hipotermic a fost indus în cultura staționară prin expunerea biomasei de spirulina, aflată la diferite etape ale ciclului vital, la temperatura de 4°C pentru o durată de 3 ore. Instalarea stresului a fost confirmată prin valorile crescute ale conținutului de dialdehidă malonică. Parametrii monitorizați au fost următorii: conținutul de β-caroten și mixoxantofilă, puterea de reducere a fierului, capacitatea antioxidantă (test ABTS). Frecvența colectării probelor a fost de 1 oră din momentul expunerii spirulinei la temperatura de 4°C. Au fost evidențiate modificări semnificative ale conținutului de β-caroten și mixoxantofilă, creșterea puterii de reducere a fierului și scăderea activității antioxidante (test ABTS). Intensitatea și direcția modificărilor observate depind atât de vârsta fiziologică a culturii, cât și de durata stresului hipotermic.

Cuvinte cheie: *Arthrospira platensis* (spirulina), stres hipotermic indus, β-caroten, mixoxantofilă, activitate antioxidantă

Depus la redacție: 09 noiembrie 2017

Adresa pentru corespondență: Rudi Ludmila, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM, str. Academiei, 1, MD-2028 Chișinău, Moldova; e-mail: rudiludmila@gmail.com

Introducere

Cianobacteria filamentoasă *Arthrospira (Spirulina) platensis* este un important obiect biotehologic cu aplicații industriale și medicale importante. Calitatea biomasei de spirulină, care este în mare măsură unică, determină numeroasele domenii în care aceasta servește ca materie primă de neînlocuit (industria alimentară, cosmetică, farmaceutică) [5,7]. Biomasa de spirulină este o sursă valoroasă de antioxidanți, iar extractele și preparatele în baza acestor compuși au acțiune benefică în cazul multor maladii asociate cu acumularea radicalilor liberi. Astfel, în cazul maladiilor neurodegenerative și cardiovasculare, precum și în cazul modificărilor metabolice, proprietatea produselor din spirulină de a ameliora statutul redox al organismului afectat este deosebit de pronunțată [9,13-14]. În același timp, în anumite condiții, în special în condiții de stres, biomasa de spirulină poate ea însăși să devină potențial periculoasă din cauza acumulării radicalilor liberi [2]. Stresul, indiferent de natura lui, induce schimbări importante la nivel molecular, care se manifestă în primul rând la nivel biochimic [3]. Condițiile de stres oxidativ sunt asociate cu modificarea substanțială a calității biomasei, care se obține în aceste condiții. Din cauza acumulării radicalilor liberi și a produselor degradării oxidative a compușilor macromoleculari, biomasa spirulinei se transformă din remediu benefic în sursă de potențial pericol.

Temperatura este unul dintre factorii fizici cu cel mai înalt impact asupra proceselor vitale în celulele vii. Creșterea sau scăderea temperaturii dincolo de limitele zonei optime duc inevitabil la modificări biochimice majore, determinate de schimbarea gradului de fluiditate a membranelor biologice și de nivelul de activitate a enzimelor implicate în procesele vitale. Unele dintre cele mai labile componente ale biomasei de spirulină, care reacționează prompt la condițiile de stres sunt pigmentii carotenoidici, implicați în reacțiile de reducere a radicalilor liberi [4, 8, 12, 15]. Condițiile de stres de asemenea, sunt asociate cu acumularea radicalilor liberi și a produselor finale ale degradării oxidative a macromoleculilor. Aceasta duce în mod inevitabil la modificarea activității antioxidante și antiradicalice a biomasei. Astfel, monitorizarea parametrilor, care reflectă statutul redox și nivelul modificărilor oxidative, poate fi un instrument eficient în procesul de apreciere a nivelului de siguranță a produselor ficologice.

Scopul lucrării a fost de a investiga modificarea conținutului de pigmenți antioxidanți (β -carotenului și mixoxantofilei) și a statutului redox (nivelului dialdehidei malonice, activității antiradicalice și puterii de reducere a fierului) la spirulină în condiții de stres hipotermic.

Material și metode

Obiectul de studiu. Tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11, crescută în cultură staționară în condiții de laborator. Pentru cultivarea spirulinei a fost utilizat mediul nutritiv mineral cu următoarea componență: macroelemente (în g/l): NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -8,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -0,6; Na_2HPO_4 -0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCl_2 -0,024; 1ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l(mediu): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,08; MoO_3 -0,015); FeEDTA -1ml/l.

Cantitatea de inocul a fost de 0,4-0,45g/l BAU. Parametrii de cultivare au fost următorii: temperatura - 25-28°C, pH-ul optim al mediului - 8-10, iluminarea continuă ~ 37-55 μM fotoni/ m^2/s . Cultura a fost agitată zilnic, timp de 2 ore, pe un agitator de laborator universal tip WU-4 cu viteza de 260 rotații pe minut.

Variantele experimentale au inclus cultura la diferite faze ale ciclului de cultivare: 1) cultura de 24 ore ce corespunde fazei lag; 2) cultura de 3 zile ce corespunde începutului fazei creșterii exponențiale și 3) de 6 zile, spirulina la sfârșitul creșterii exponențiale și începutul fazei staționare. Cultura de spirulină a fost supusă stresului termic (temperatura de 4°C) pe durata de 1, 2 și 3 ore.

La finele experiențelor cultura de spirulină a fost separată de mediul nutritiv prin filtrare. Din biomasa obținută au fost preparate extractele hidrice și etanolice. Raportul amestecului extractant a fost de 10 mg biomasă nativă la 1 ml solvent (apa sau etanol). Extragerea s-a efectuat pe durata a 120 min prin agitare continuă la temperatura camerei. Extractele din biomasă au a fost separate de biomasă prin centrifugare și standardizate după substanța uscată.

Metodele de determinare a componenței biomasei și a statutului antioxidant.

Conținutul de pigmenți s-a determinat în baza absorbției extractelor la lungimile de undă specifice. Carotenul a fost extras în alcool etilic de 96%, iar absorbția a fost măsurată la 450 nm. Mixoxantofila a fost extrasă în soluție hidro-etanolică de 65%, iar absorbția măsurată la 508 nm [1].

Produsul final al peroxidării lipidelor (dialdehida malonică) a fost determinat spectrofotometric în cadrul testului cu acid tiobarbituric [6]. Puterea de reducere a fierului a fost stabilită în baza principiului de reducere a complexului ferocianurii ferice în ferocianura feroasă cu *albastru de Berlin* [3,10].

Activitatea antioxidantă a fost determinată în baza testului cu radicalul ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) [11]. Toate experiențele și măsurările au fost efectuate în trei repetări. Rezultatele experiențelor au fost prelucrate statistic.

Rezultate și discuții

Cultura staționară de spirulină a fost supusă stresului hipotermic (4°C) la diferite etape ale ciclului vital. Au fost selectate 3 perioade critice – faza lag, începutul fazei creșterii exponențiale și începutul fazei staționare, care se caracterizează prin faptul, că culturile microbiene sunt deosebit de sensibile față de acțiunea factorilor fizici. În scopul confirmării instalării unei stări de stres indus, în biomasa de spirulină a fost determinată cantitatea dialdehidei malonice (DAM) – unul din produsele finale ale peroxidării lipidelor și un indicator sigur al stresului oxidativ. Rezultatele obținute sunt prezentate în figura 1.

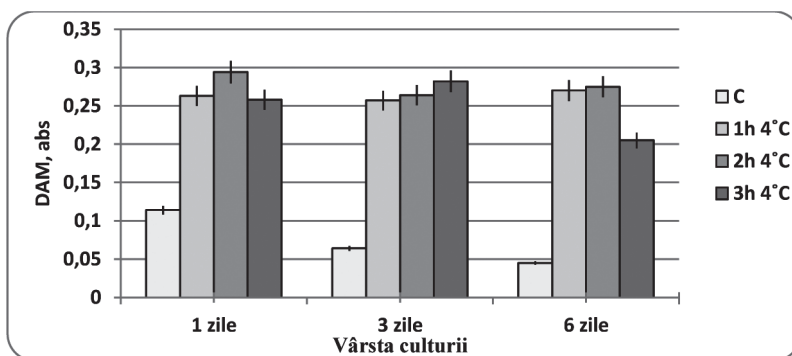


Figura 1. Modificarea conținutului dialdehidei malonice în biomasa spirulinei ca răspuns la stresul oxidativ indus de temperatura de 4°C (C-Martor).

În condiții optime de dezvoltare a spirulinei cel mai înalt nivel al dialdehidei malonice se înregistrează în faza lag, după care intensitatea peroxidării lipidelor scade, iar cel mai scăzut nivel DAM se înregistrează la începutul fazei staționare. Acest lucru se poate urmări ușor pe exemplul martorilor culturii de spirulină de 1, 3 și 6 zile. În cazul stresului hipotermic indiferent de vârsta culturii și durata stresului, cantitatea dialdehidei malonice în biomasă crește substanțial. Reieșind din valorile obținute, care se caracterizează prin uniformitate statistică, putem afirma, că intensitatea proceselor oxidative în condiții de stres hipotermic este foarte asemănătoare la diferite etape ale ciclului vital și la diferite intervale de acțiune a temperaturii joase. Doar în cazul culturii de spirulină aflată la începutul fazei staționare expuse stresului hipotermic cu durata de 3 ore conținutul DAM este cu aproximativ o pătrime mai mic comparativ cu celelalte variante experimentale de stres indus. Prin urmare, nivelul sporit al DAM care îl depășește pe cel din cultura martor de 1,3-4,5 ori, este o dovadă elocventă a faptului, că temperatura joasă, de 4°C este un factor, care induce stres oxidativ pronunțat în biomasa de spirulină. Condițiile de stres duc la modificarea majorității parametrilor biochimici. Conținutul de β -caroten în biomasa de spirulină, care a fost expusă stresului hipotermic pe durata a 1, 2 și 3 ore la diferite etape ale ciclului vital sunt prezentate în figura 2.

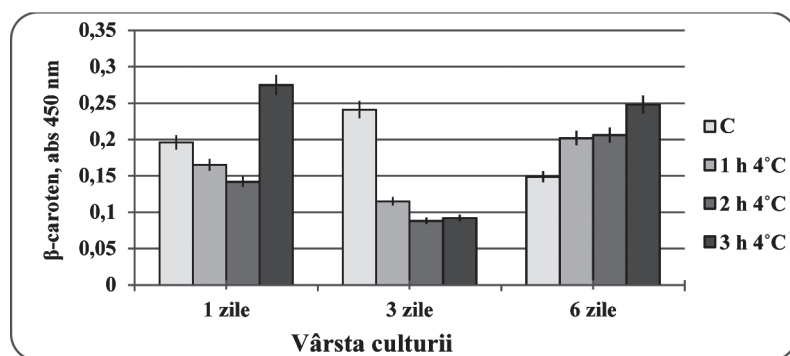


Figura 2. Modificarea conținutului de β -caroten în biomasa spirulinei ca răspuns la stresul hipotermic indus (4°C) (C-Martor).

În biomasa de spirulină aflată în faza lag (1 zi), stresul hipotermic a provocat scăderea conținutului de caroten cu 15 % după prima oră și cu 27 % după cea de-a doua oră comparativ cu valoarea caracteristică pentru martorul menținut la temperatura optimă. Menținerea în continuare a spirulinei în condiții de hipotermie duce la o creștere semnificativă a conținutului de caroten. Astfel, după 3 ore de stres hipotermic conținutul de β -caroten în biomasă atinge o valoare cu 40 % mai mare față de martor. Această vârstă este asociată cu adaptarea culturii după inoculare la condițiile noi, de aceea de cele mai multe ori stresul oxidativ într-o asemenea cultură tânără este asociat cu fluctuații ale tuturor parametrilor fiziologici și biochimici, fapt observat foarte bine pe exemplul carotenului.

În cazul expunerii la stres hipotermic a culturii de spirulină aflată la începutul fazei exponențiale (ziua 3), conținutul de caroten este semnificativ mai jos (cu 50-60%) indiferent de durata expunerii la stres. Această vârstă fiziologică este caracterizată prin activitate vitală maximală, dar și prin vulnerabilitate pronunțată față de acțiunea

factorilor extrinseci. Prin aceasta se explică scăderea stabilă a nivelului de caroten în biomasa pe întreaga durată a stresului hipotermic.

Complet altfel se manifestă stresul hipotermic în cazul culturii de spirulină la începutul fazei staționare. În condiții optimale, la această etapă a ciclului vital în biomasa de spirulină se observă o scădere a conținutului de caroten, ceea ce poate fi observat la compararea probelor martor. Expunerea culturii la stres hipotermic este asociată cu o creștere pronunțată a cantității de caroten - cu 35% după prima oră și cu 66% după trei ore de expunere la temperatura de 4°C. Din cele expuse putem concluziona, că influența stresului hipotermic asupra conținutului de caroten în biomasa de spirulină este determinată de etapa ciclului vital, pe durata căreia cultura a fost expusă acțiunii temperaturii joase.

Un alt pigment specific cianobacteriilor este glicozidul mixoxantofila. Se presupune că mixoxantofila contribuie în mod semnificativ în stabilizarea structurilor membranare la cianobacterii, iar cantitatea pigmentului în biomasa este dependentă de temperatura mediului de cultivare. În figura 3 sunt prezentate rezultatele ce țin de modificarea conținutului de mixoxantofilă în biomasa de spirulină în condiții de stres hipotermic indus la diferite etape ale ciclului vital.

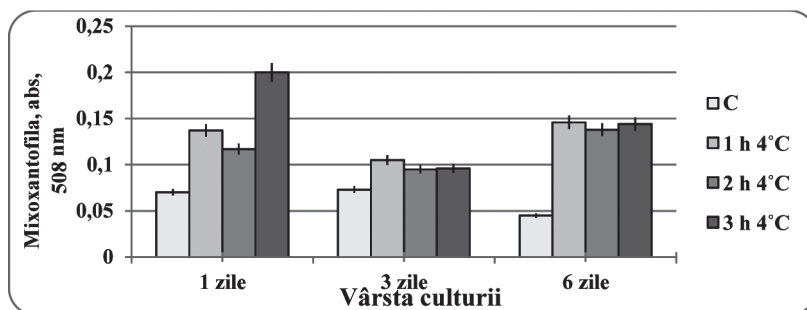


Figura 3. Modificarea conținutului de mixoxantofilă în biomasa spirulinei ca răspuns la stresul hipotermic indus de temperatura de 4°C (C-Martor).

Ca și în cazul carotenului, cele mai mari fluctuații valorice ale mixoxantofilei au fost înregistrate în biomasa de spirulină, care a fost supusă stresului hipotermic în faza lag. Astfel, conținutul de mixoxantofilă s-a dublat după prima oră de stres termic, iar după trei ore conținutul acestui pigment a crescut cu 185%. În biomasa expusă stresului hipotermic pe durata fazei de creștere exponențială (3 zile) conținutul de mixoxantofilă de asemenea creștere, dar valorile obținute sunt mult mai modeste. Astfel, după o oră de expunere la temperatura de 4°C cantitatea mixoxantofilei a crescut cu 40%, iar următoarele 2 ore de stres nu au indus alte modificări semnificative în acest parametru. Cantitatea de mixoxantofilă în biomasa de spirulină la trecerea în etapa staționară se micșorează în condiții normale, la fel ca și cea a carotenului. Astfel, în biomasa martorului menținut la temperatură optimă, conținutul de mixoxantofilă la începutul fazei staționare este de aproximativ 1,6 ori mai mică decât pe durata fazei de creștere exponențială. În condiții de stres hipotermic cu durata de până la 3 ore indus în cultura de 6 zile, conținutul de mixoxantofilă este de aproximativ 2,2 ori mai mare decât în biomasa probei martor.

Condițiile de stres oxidativ indus mobilizează rezervele celulelor în scopul atenuării efectelor nocive care sunt provocate de acumularea excesivă a radicalilor liberi și pentru

a stopa procesele de peroxidare a lipidelor. Peroxidarea lipidelor este un proces în lanț, care este amplificat multiplu de prezența ionilor de fier. Aceștia se implică în reacția Fenton – principala reacție în care se formează radicalul hidroxil, recunoscut ca cel mai periculos pentru sistemele vii. Abilitatea celulelor de a micșora intensitatea reacțiilor de peroxidare poate fi apreciată prin determinarea puterii de reducere a fierului. Rezultatele obținute în cadrul testului de determinare a puterii de reducere a fierului, exprimate în echivalent mg de acid ascorbic sunt prezentate în figura 4.

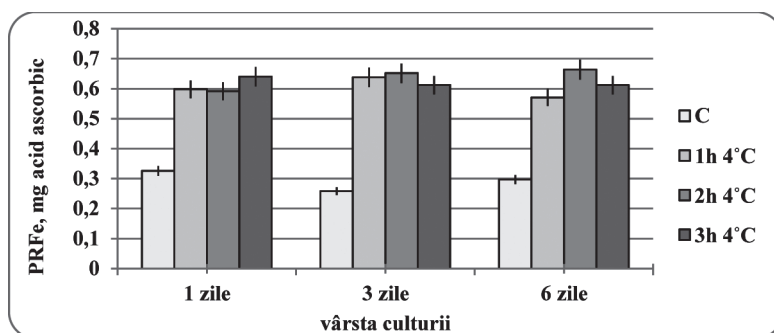


Figura 4. Modificarea valorilor puterii de reducere a fierului de către biomasa spirulinei ca răspuns la stresul hipotermic indus de temperatura de 4°C (C-martor).

Puterea de reducere a fierului în biomasa de spirulină în condiții optime este destul de stabilă pe durata ciclului vital, ceea ce este confirmat de valorile testului respectiv pentru martorii spirulinei de 1,3 și 6 zile. Biomasa expusă stresului hipotermic, de asemenea, se caracterizează prin uniformitatea valorilor puterii de reducere a fierului, indiferent de vârsta fiziologică și durata expunerii la temperatura de 4°C. Valorile testului în biomasa supusă stresului hipotermic sunt cu 90-120% mai mari față de cele înregistrate pentru probele martor.

Unul dintre mecanismele de bază de anihilare a radicalilor liberi este transferul de electroni de la o moleculă la alta, iar celulele vii posedă numeroase posibilități de a aplica acest mecanism pentru neutralizarea speciilor reactive periculoase. Testul ABTS permite de a aprecia capacitatea antioxidantă în sistemele vii, care este bazată pe transferul de electroni. Deoarece activitatea antioxidantă de acest gen este caracteristică atât componentelor hidrosolubile, cât și celor etanol-solubile ale biomasei, capacitatea de inhibiție a radicalului ABTS a fost măsurată pentru două tipuri de extracte din biomasa – hidric și etanolic. Rezultatele obținute sunt prezentate în figurile 5 și 6.

În condiții optime capacitatea de inhibiție a radicalului ABTS de către componentele etanol-solubile ale biomasei de spirulină variază în dependență de faza ciclului vital. La începutul fazei de creștere exponențială a culturii acest parametru are valori de 1,4 ori mai mari comparativ cu faza lag. La începutul fazei staționare capacitatea antioxidantă din nou se micșorează până la nivelul caracteristic fazei lag, sau și mai jos. În condiții de stres hipotermic activitatea antioxidantă a extractelor etanolice față de radicalul ABTS este scăzută comparativ cu martorul. Cea mai puternică scădere este caracteristică pentru cultura de 3 zile, unde în condiții de stres hipotermic avem o micșorare a capacității antioxidante cu 60% după prima oră, și cu încă 36% după 3 ore. În cazul expunerii la stres hipotermic a culturii aflate la începutul fazei staționare de asemenea, avem o scădere a capacității de inhibiție a radicalului ABTS de 2 ori după

3 ore de acțiune. Cea mai modestă diminuare a activității antioxidante a extractelor etanolice a fost înregistrată la expunerea stresului hipotermic a biomasei de spirulină aflate în faza lag - cu 30% față de martor.

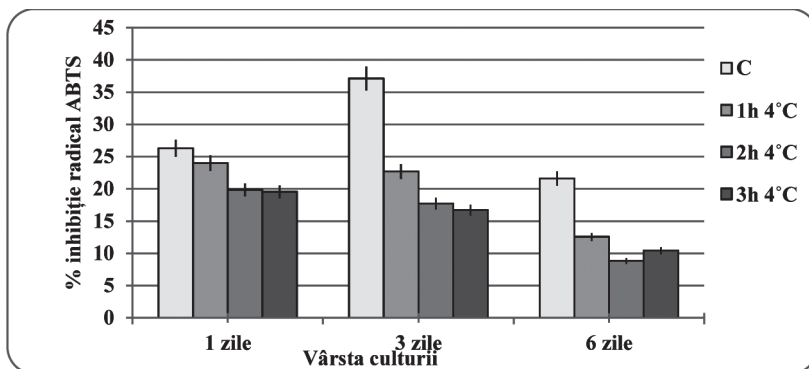


Figura 5. Modificarea valorilor testului antioxidant ABTS în extractele etanolice, obținute din biomasa spirulinei ca răspuns la stresul oxidativ indus de temperatura de 4°C (C-Martor).

În cazul extractelor hidrice, obținute din biomasa de spirulină supusă stresului hipotermic, reducerea valorilor testului ABTS a fost înregistrată în toate variantele experimentale (Figura 6).

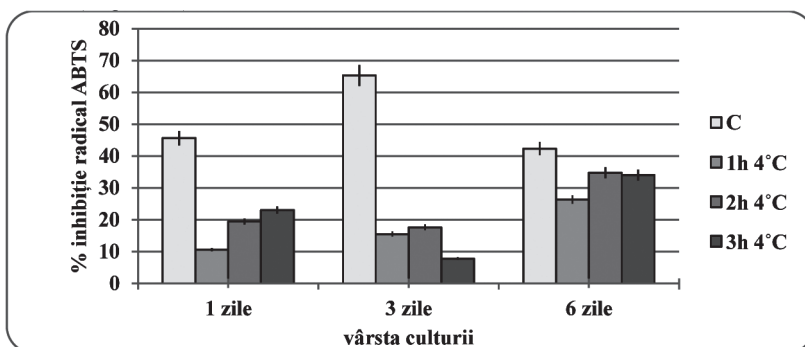


Figura 6. Modificarea valorilor testului antioxidant ABTS în extractele hidrice, obținute din biomasa spirulinei ca răspuns la stresul oxidativ indus de temperatura de 4°C (C-Martor).

Ca și în cazul extractelor etanolice, în condiții optime capacitatea de inhibiție a radicalului ABTS depinde de etapa ciclului vital la care se află cultura de spirulină, cel mai înalt nivel de activitate fiind înregistrat pentru începutul fazei de creștere exponențială. Condițiile de stres indus au dus la diminuarea capacității antioxidante a componentelor hidrosolubile a biomasei. Activitatea antioxidantă a extractelor hidrice obținute din biomasa spirulinei de o zi și care a fost supusă temperaturii de 4°C timp de o oră s-a redus de peste 4 ori, cu o următoare creștere, astfel că după 3 ore de stres hipotermic activitatea antioxidantă avea valori de 2 ori mai scăzute comparativ cu proba martor. La trecerea culturii de spirulină în faza staționară stresul hipotermic duce la diminuarea cu 20-55% a capacității de inhibiție a radicalului ABTS. Cea mai mare discrepanță între valorile testului ABTS pentru martor și pentru probele experimentale au fost atestate în

cazul culturii de spirulină aflată la începutul fazei de creștere exponențială (de 8 ori în cazul stresului hipotermic cu durată de 3 ore).

Astfel, s-a constatat o diminuare statistic semnificativă a activității antioxidante generale, bazate pe mecanismul transferului de electroni, în biomasa de spirulină supusă stresului hipotermic. Acest fenomen este prezent pe întreaga durată a ciclului vital, dar mai pronunțat devine la începutul fazei de creștere exponențială.

Concluzii

Stresul hipotermic provoacă modificări semnificative ale conținutului de caroten în biomasa de spirulină, iar intensitatea și direcția modificărilor depinde de vârsta culturii și durată acțiunii temperaturii joase. În faza lag și faza creșterii exponențiale se atestă o scădere a conținutului de caroten (cu excepția stresului de 3 ore în faza lag), iar în faza staționară o creștere a acestui parametru. Aceasta indică asupra rolului biologic diferit al carotenului la spirulină aflată la diferite etape ale ciclului vital.

Stresul hipotermic duce la creșterea conținutului de mixoxantofilă în biomasa de spirulină și la mărirea puterii de reducere a fierului, indiferent de etapa ciclului vital și durată de acțiune a temperaturii joase.

Capacitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS) a biomasei de spirulină scade semnificativ în condițiile stresului hipotermic, cea mai pronunțată reducere fiind caracteristică pentru cultura aflată în faza creșterii exponențiale.

Cercetările au fost efectuate cu suportul financiar al proiectului 16.800.13.16.05.18/RO din cadrul Programului de cooperare științifică și tehnologică între Academia de Științe a Moldovei și Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică și Inovare din România (ANCSI).

Bibliografie:

1. Delia B. Rodriguez-Amaya. A guide to carotenoid analysis in food. //SILSI PRESS. International Life Sciences Institute. One Thomas Circle, N.W. Washington, D. C. 20005-5802, USA. 2001. 64 p.
2. Deniz F., Saygideger S. D., Karaman S. Response to Copper and Sodium Chloride Excess in *Spirulina* sp. (Cyanobacteria). //Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2011, vol. 87, no 1, p.11-15.
3. Dorman HJD, Kosar M, Kahlos K, Holm Y, Hiltunen R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. //J. Agric. Food. Chem. 2013, 51:4563–4569
4. Gruszecki W. I., and Strzalka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. //Biochim. Biophys. Acta, 2005, 1740:108–115.
5. Herrero M. et al. Screening for bioactive compounds from algae. //Advanced Biofuels and Bioproducts. Ed. by J.W. Lee, Springer, New York, 2013, p.833-872
6. Hodges M., Forney F., Prange R. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. //Planta, 1999, 207: 604–611.
7. Hoseini S.M., Khosravi-Darani K., Mozafari M.R. Nutritional and Medical Applications of *Spirulina* Microalgae. //Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2013, 13: 1231-1237.
8. Kusama Y., Inoue S., Jimbo H., Takaichi S., Sonoike K., Hihara Y., et al. Zeaxanthin and echinenone protect the repair of photosystem II from inhibition by singlet oxygen in *Synechocystis* sp. PCC 6803. //Plant Cell Physiol., 2015, 56: 906–916.
9. Muga M.A., Chao J. C.J. Effects of fish oil and spirulina on oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic hamsters. // BMC Complementary and Alternative Medicine 2014, vol. 14. p.470.
10. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. //Jpn. J. Nutr. 1986, 44: 307-315.
11. Re R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. // Free Radical Biology & Medicine, 1999, v.10, p. 1231-1237.

12. Takaichi S., and Mochimaru M. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. //Cell. Mol. Life Sci., 2008, 64: 2607–2619.
13. Thaakur S., Sravanthi R. Neuroprotective effect of *Spirulina* in cerebral ischemia–reperfusion injury in rats. //Journal of Neural Transmission. 2010, vol. 117, no. 9, p. 1083- 1091.
14. Tobón-Velasco J.C. et al. Antioxidant effect of *Spirulina (Arthrospira) maxima* in a neurotoxic model caused by 6-ohda in the rat striatum. //Journal of Neural Transmission. 2013, vol.120, no. 8, p. 1179-1189.
15. Toth T. N., Chukhutsina V., Domonkos I., Knoppova J., Komenda J., Kis, M., et al. Carotenoids are essential for the assembly of cyanobacterial photosynthetic complexes. //Biochim. Biophys. Acta, 2015, 1847: 1153–1165.