

ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ ÎN BIOMASA CIANOBACTERIEI *SPIRULINA PLATENSIS* PE DURATA CULTIVĂRII ÎN DEPENDENȚĂ DE ILUMINARE

Rudic V., Rudi L., Chiriac T., Codreanu S., Dumbrăveanu V., Djur S., Cepoi L., Miscu V., Cojocari A., Sadovnic D., Chelmenciu V.

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

În articol sunt prezentate rezultatele cercetărilor asupra dinamicii modificării activității antioxidante a extractelor hidric, hidroetanolic de 50% și etanolic obținute în baza biomasei de *Spirulina platensis*, cultivată în condiții de laborator în regim de iluminare continuă și 12/12 ore zi/noapte. Capacitatea de inhibiție a radicalului cation ABTS a extractelor hidric și etanolic este semnificativ mai înaltă în cazul biomasei crescute în condiții de iluminare continuă. În extractele hidroetanolice de 50% aceeași tendință se menține doar pe durata fazei exponențiale de creștere. Cea mai performantă capacitate antiradicalică față ABTS⁺ este caracteristică extractului etanolic obținut din biomasa de spirulină crescută în condiții de iluminare continuă (până la 70,14% inhibiție).

Capacitatea antiradicalică față de radicalul DPPH a extractelor hidroetanolic și etanolic din biomasa de spirulină crescută în regimuri diferite de iluminare este practic la același nivel, iar fluctuațiile observate pe parcurs sunt determinate de vârsta culturii. În cazul extractului hidric capacitatea de inhibiție a radicalului DPPH este de peste 6 ori mai înaltă în cazul când pentru extragere este utilizată biomasa crescută în condiții de iluminare continuă față de cea obținută la iluminare în regim fotoperiodic.

Cuvinte cheie: *Spirulina platensis*, activitatea antioxidantă, regim de iluminare.

Depus la redacție 22 septembrie 2015

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

Introducere

Biomasa microalgelor și cianobacteriilor prezintă o sursă valoroasă și deja recunoscută de substanțe cu efect antioxidant și antiradicalic. Astfel, biomasa acestor obiecte biotehnologice conține enzime antioxidante, carotenoizi, pigmenți ficobilinici, compuși fenolici ș.a, care se caracterizează prin diferite proprietăți și grad diferit de activitate biologică [3, 5, 7, 9, 11, 13, 14]. Produsele obținute din spirulină au demonstrat capacitatea de a inhiba proliferarea celulelor canceroase, precum și de a modela sistemul imun, efecte care au la bază proprietățile antioxidante ale spirulinei [1, 4].

Atât calitatea, cât și cantitatea compușilor antioxidanți în componența biomasei obiectelor ficologice poate varia în limite foarte mari în dependență de vârsta culturii, starea ei fiziologică, componența mediului nutritiv și condițiile fizice, în care se desfășoară procesul de cultivare. A fost demonstrat că pe durata ciclului de dezvoltare a culturilor statice de microalge și cianobacterii au loc fluctuații semnificative ale activității antioxidante sumare a biomasei și a diferitor tipuri de extracte din ea. Trecerea culturii de la o fază de dezvoltare la alta este marcată prin salturi ale valorilor obținute în cadrul testelor antioxidante și antiradicalice aplicate, iar cunoașterea perioadelor critice în componența fluxurilor tehnologice facilitează monitorizarea calității și asigură

obținerea unui produs sigur pentru consumul uman [10, 15].

Influența luminii asupra conținutului de componente antioxidante este evidentă, deoarece două grupuri de substanțe antioxidante au funcția primară de pigmenți fotosintetici – carotenoizii și ficobilinele. Acumularea mai intensă a carotenoizilor are loc în condițiile unei intensități sporite a luminii [2], iar conținutul ficobilinelor este determinat atât de intensitatea, cât și de calitatea luminii aplicate pentru iluminarea culturii [12].

Adaptarea la fotoperiodicitate prezintă un caracter evolutiv stabil pentru toate speciile de organisme, capabile de a realiza fotosinteza. În același timp, culturile tehnologice de cianobacterii și microalge sunt adaptate pentru condiții intensive, care includ iluminare continuă.

Scopul acestui studiu a constatat în stabilirea influenței regimului de iluminare (continuu sau fotoperiodicitate 12/12 ore zi/noapte) asupra activității antioxidante a extractelor din biomasa unei tulpini biotehnologice de spirulină - *Spirulina platensis* CNMN-CB-1.

Materiale și metode

În calitate de *obiect* de studiu a fost utilizată tulpina biotehnologică *Spirulina platensis* CNMN-CB-11, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neputogene.

Cianobacteria a fost cultivată în condiții de laborator pe mediul nutritiv mineral SP-1 cu pH-ul inițial 8-9, în baloane Erlenmeyer cu volum de 1L în condiții de iluminare continuă și regim de fotoperiodicitate de 12/12 ore. Intensitatea luminii de 55 μmol fotoni/ m^2/s . Cultura a fost agitată zilnic, timp de 2 ore pe un agitator universal de laborator tip WU-4 cu viteza de 200 rotații/min. Durata cultivării a constituit 10 zile. Biomasa colectată a fost separată de mediul de cultivare prin filtrare și supusă demineralizării.

În baza biomasei colectate au fost preparate extracte. *Extragerea* a fost efectuată în raport m/v de 10mg biomasă/10ml solvent. În calitate de solvent au fost utilizate soluția hidro-etanolică de 50%, etanolul de 96% și apa distilată. Durata procesului de extracție a fost de 2 ore la temperatura camerei în condiții de agitare permanentă pe agitator de laborator WU-4 cu viteza de 260 rotații/min. Extractele obținute au fost separate de biomasă prin filtrare și păstrate la temperatura de 0°C. În extractele obținute a fost determinată activitatea antioxidantă prin aplicarea radicalilor non-biologici.

Determinarea activității antioxidante cu utilizarea radicalului ABTS [6]. Radicalul cation ABTS ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) cu persulfat de potasiu. Se prepară soluția stoc a reagentului ABTS de 7 mM în apă deionizată. Persulfatul de potasiu se adăugă în concentrația de 2,45 mM. Reagenții se amestecă în proporții de 1:1 pentru formarea radicalului ABTS. Reacția decurge la întuneric, la temperatura camerei timp de cel puțin 12-16 ore. Soluția de lucru a ABTS se prepară din soluția stoc astfel, ca absorbanta finală la 734 nm să fie de $0,70 \pm 0,02$. Reacția de decolorare decurge la temperatura camerei timp de 6 minute. Valoarea activității antioxidante se exprimă în % inhibiție radical.

Determinarea activității antioxidante cu utilizarea radicalului DPPH [8]. Radicalul DPPH (1,1 difenil-2-picril hidrazil de culoare violetă), utilizat în calitate de substrat,

este redus prin adiționare de atomi de hidrogen cu obținerea de 1,1 difenil-2-picril hidrazinei de culoare galbenă. Concentrația radicalului DPPH în soluția de lucru, precum și durata reacției a fost adaptată biomasei de spirulină. Reacția de decolorare decurge la temperatura camerei timp de 60 minute. Valoarea activității antioxidante se exprimă în % inhibiție a radicalului.

Rezultate și discuții

Cianobacteria *Spirulina platensis* a fost cultivată timp de 10 zile în condiții de laborator în regim de iluminare continuă și în regim de fotoperiodicitate de 12 ore. Pentru a urmări modificările în activitatea antioxidantă a biomasei de spirulină, au fost efectuate testele antioxidante ABTS și DPPH pentru trei tipuri de extracte obținute în baza biomasei de spirulină, colectată zilnic pe durata cultivării, la aceeași oră. Valorile testului ABTS determinate pentru extractele hidrice obținute din biomasa crescută în regim de iluminare continuă sunt superioare valorilor antioxidante determinate pentru același tip de extract din biomasa obținută în varianta experimentală cu iluminare periodică (Figura 1).

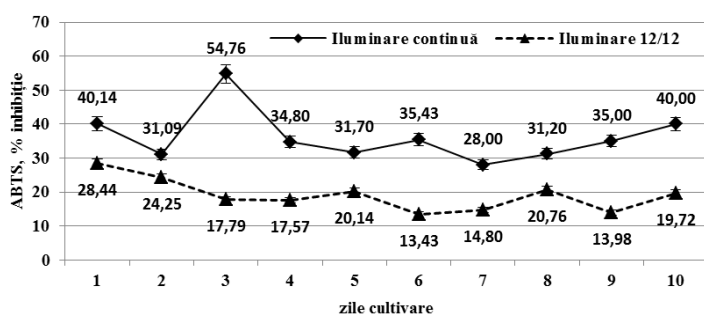


Figura 1. Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS^{•+}) a extractelor hidrice în baza biomasei de spirulină pe durata cultivării în condiții de laborator, în dependență de regimul de iluminare.

În condiții de iluminare continuă se evidențiază ziua a doua și a treia de cultivare – în cea de a doua are loc o scădere cu 22,5%, iar în cea de-a treia – o creștere cu 76,1% față de ziua precedentă măsurării. În următoarele zile activitatea antiradicalică a extractelor hidrice față de ABTS^{•+} revine la valorile caracteristice culturii de spirulină (28-40% inhibiție). Variația inițială ale valorilor antioxidante pentru extractele hidrice obținute din biomasa de spirulină cultivată în regim de iluminare periodică, de asemenea, durează 3 zile, cu reducerea continuă a valorilor determinată și pentru ziua a 3-a. În următoarele 7 zile activitatea antioxidantă a extractelor oscilează în limita valorilor 13,47-20,76. Astfel, pentru cultura de spirulină, ca și pentru alte culturi ficologice de importanță biotehnologică [10,15], principalele modificări în activitatea antioxidantă au loc la etapa de adaptare a culturii (faza lag și de inițiere a creșterii).

Testul DPPH a permis de a stabili o diferență și mai profundă între capacitatea antiradicalică a extractelor hidrice din biomasa de spirulină obținută la iluminare continuă și în condiții de fotoperiodicitate. Astfel, condițiile de iluminare periodică au dus la o diminuare de până la 6,3 ori a capacității de inhibiție a DPPH (Figura 2). Diferența dintre valorile foarte mari ale testului DPPH pentru extractele din biomasa de spirulină cultivată în regim de iluminare continuă și valorile foarte mici ale testului pentru extractele în baza biomasei obținută în regim de iluminare periodică se păstrează în primele 4 zile, după care are loc o apropiere a valorilor estimate. La iluminarea continuă activitatea de inhibiție a DPPH se menține la nivel constant înalt timp de 4

zile, deci practic pe durata primelor faze de dezvoltare (lag, inițierea creșterii și parțial – faza de crește exponențială), pe când în condiții de iluminare periodică doar primele 24 de ore se caracterizează prin valoare ridicată a activității față de radicalul nonbiologic.

Începând cu cea de-a șasea zi de cultivare, care corespunde finelui fazei exponențiale de creștere valorile testului DPPH în probele experimentale obținute în regim de iluminare continuă sunt mai mici comparativ cu valorile probelor obținute în condiții de iluminare periodică.

Un tablou similar al decalajului de valori antioxidante se observă și pentru valorile testului ABTS a extractelor hidro-etanolice de 50% obținute din biomasa de spirulină din ambele serii experimentale (Figura 3).

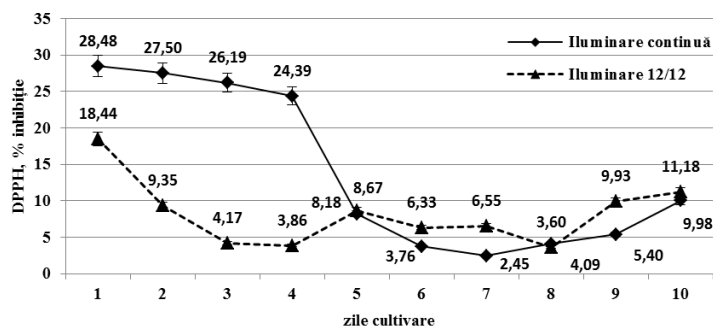


Figura 2. Activitatea antioxidantă (% inhibiție DPPH) a extractelor hidrice în baza biomasei de spirulină pe durata cultivării în condiții de laborator, în dependență de regimul de iluminare.

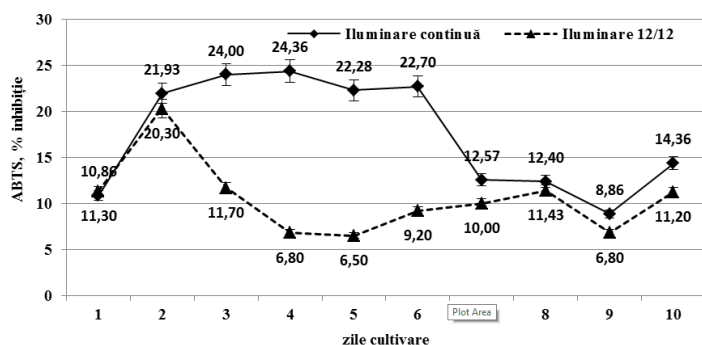


Figura 3. Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS⁺) a extractelor hidroetanolicе de 50% în baza biomasei de spirulină cultivată în condiții de laborator, în dependență de regimul de iluminare.

Decalajul valorilor antioxidante a fost determinat în intervalul dintre a doua și a șaptea zi de cultivare a spirulinei. Pentru cultura cu iluminare continuă în acest interval de timp se menține o activitate a extractului hidroetanolic de 21,93 – 24,35% inhibiție ABTS⁺, ceea ce este practic de 2 ori mai mult decât activitatea după 24 ore de la inoculare, care este foarte apropiată pentru biomasa obținută în condițiile ambelor regimuri de iluminare. Activitatea extractelor hidroetanolicе de 50% față de radicalul cation ABTS, obținute din biomasa crescută în condiții de fotoperiodicitate în intervalul de timp respectiv scade de la 20,3% la 6,5% inhibiție. La etapa de încetinire a creșterii și cea staționară valorile testului ABTS pentru extractele hidroetanolicе din biomasa ambelor serii experimentale sunt foarte apropiate.

Testul DPPH pentru extractele hidro-etanolice de 50% înregistrează diferențe neînsemnate între experiențe (Figura 4).

Primele trei zile de cultivare sunt de stabilizare a activității antioxidante, valorile testului DPPH devenind identice la ziua a 3-a. În următoarele două zile are loc

sporirea activității antioxidante cu 58% în probele obținute din biomasa cultivată în regim de iluminare continuă și cu 84% în probele obținute din biomasa cultivată în regim de fotoperiodism.

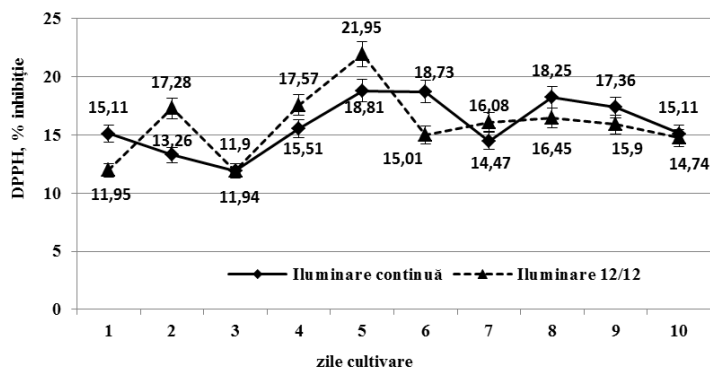


Figura 4. Activitatea antioxidantă (% inhibiție DPPH) a extractelor hidroetanolicе de 50% în baza biomasei de spirulină cultivată în condiții de laborator, în dependență de regimul de iluminare.

În extractele hidro-etanolice de 50%, obținute din biomasa crescută în regim de iluminare continuă activitatea antioxidantă sporită se menține și în ziua a 6-a cu reducerea ulterioară cu 23% spre ziua a 7-a. În extractele hidro-etanolice de 50%, obținute din biomasa crescută în regim de iluminare periodică activitatea antioxidantă scade deja în ziua a 6-a și reducerea este una semnificativă - cu 32%. În următoarele zile are loc menținerea valorilor antioxidante la nivelul zilei a 6-a. Valori similare ale testului antioxidant DPPH celor determinate în ziua a 6-a se mențin și pentru extractele obținute în baza biomasei rezultate din cultivarea în regim de iluminare continuă.

Aceleași teste au fost realizate și pentru extractele etanolice. În etanol de 96% se extrag componente antioxidante liposolubile, iar acest tip de extract are cel mai înalt nivel de activitate printre celelalte studiate și analizate în prezentul studiu. Valorile testului antioxidant ABTS în extractele etanolice obținute din biomasa de spirulină crescută în condiții de iluminare continuă în primele cinci zile de cultivare sunt de 1,7-2,4 ori mai mari decât în variantele respective a experienței cu aplicarea fotoperiodicității (Figura 5). Cea mai mică diferență între rezultatele celor două experiențe se observă pentru intervalul 6-8 zile de cultivare.

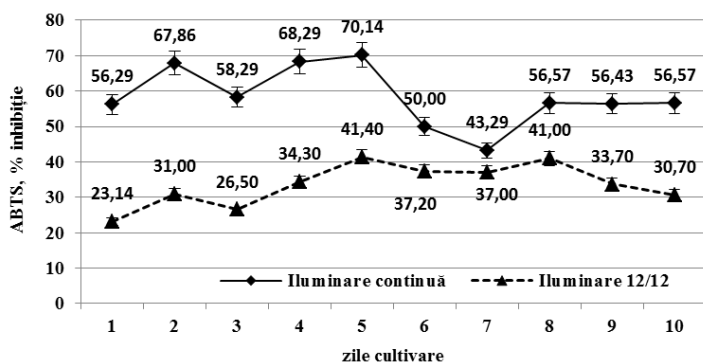


Figura 5. Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS) a extractelor etanolice în baza biomasei de spirulină cultivată în condiții de laborator, în dependență de regimul de iluminare.

Oscilațiile valorilor testului ABTS în primele trei zile de cultivare a spirulinei includ un spor al activității antioxidante în ziua a 2-a și o reducere la ziua a 3-a. Creșterea activității antioxidante este cu 34% pentru extractele etanolice din biomasa obținută în regim de iluminare continuă și cu 21% pentru extractele etanolice din biomasa obținută

în regim de iluminare periodică.

Reducerea activității antioxidante este cu 14% pentru ambele serii experimentale. În următoarele două zile (a patra și a cincea) are loc creșterea valorilor antioxidante cu 17% pentru extractele etanolice de 96% în baza biomasei obținute în regim de iluminare continuă și cu 56% pentru extractele etanolice din biomasa obținută în regim de iluminare periodică. Spre ziua a 5-a valoarea testului antioxidant pentru extractul etanolic de 96% din biomasa obținută în regim de iluminare continuă este de 70,14% inhibiție ABTS⁺⁺ și 41,4% inhibiție ABTS⁺⁺ pentru extractul etanolic din biomasa obținută în regim de iluminare periodică. La ziua a 7-a activitatea antioxidantă a extractelor etanolice în baza biomasei de spirulină obținută din prima serie experimentală este de 43,29%, după care valorile testului ABTS revin la valorile determinate în prima zi de cultivare cu menținerea lor până la finele perioadei experimentale. Valorile testului ABTS ale extractelor etanolice din spirulina crescută în condiții de fotoperiodicitate, stabilizate în ziua a 5-a se mențin în următoarele trei zile, după care are loc reducerea activității antioxidante până la valoarea de 30,7% inhibiție.

Testul DPPH pentru extractele 96% etanol a arătat oscilații asemănătoare ale valorilor pentru ambele cazuri experimentale indiferent de regimul de iluminare aplicat (Figura 6). Pe perioada primelor 3 zile valorile testului DPPH au o tendință de scădere moderată (mai pronunțată la cultura crescută în condiții de fotoperiodicitate), iar în următoarea zi are loc o reducere bruscă a nivelului de activitate față de radicalul DPPH de 3,2 – 3,8 ori față de valorile respective în zilele precedente, reducându-se de 4 ori la a 4-a zi, pentru a se menține la un nivel redus pe întreaga perioadă de cultivare. Cu toate că în zilele următoare % inhibiție DPPH crește, valorile testului DPPH sunt foarte mici comparativ cu cele determinate în primele zile ale perioadei de cultivare a spirulinei.

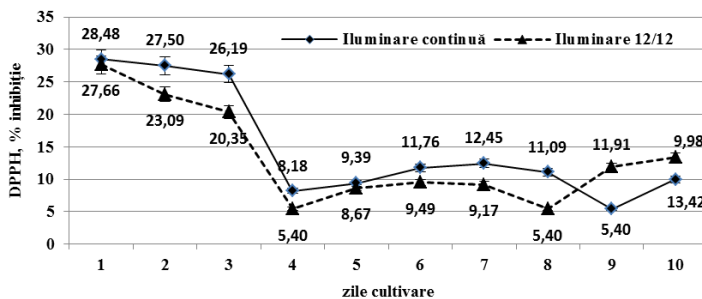


Figura 6. Activitatea antioxidantă (% inhibiție DPPH) a extractelor etanolice în baza biomasei de spirulină cultivată în condiții de laborator, în dependență de regimul de iluminare.

În concluzie putem afirma, că regimul de iluminare modifică esențial dinamica modificării capacității antioxidante a extractelor din biomasa de spirulină. În cazul extractului hidric și celui etanolic capacitatea de inhibiție a radicalului cation ABTS este semnificativ mai înaltă în cazul biomasei crescute în condiții de iluminare continuă. În extractele hidroetanolicе de 50% aceeași tendință se menține doar pe durata zilelor 3-6 de cultivare care corespund fazei exponențiale de creștere. Cea mai performantă capacitate antioxidantă față de ABTS⁺⁺ este caracteristică extractului etanolic obținut din biomasa de spirulină crescută în condiții de iluminare continuă, aflată în faza creșterii exponențiale (până la 70,14% inhibiție).

Capacitatea antiradicalică față de radicalul DPPH a extractelor hidroetanolic și etanolic din biomasa de spirulină crescută în regimuri diferite de iluminare este practic la același nivel, iar fluctuațiile observate pe parcurs sunt determinate de vârsta culturii, și

nu de durata iluminării. În cazul extractului hidric capacitatea de inhibiție a radicalului DPPH este de peste 6 ori mai înaltă în cazul când pentru extragere este utilizată biomasa crescută în condiții de iluminare continuă față de cea obținută la iluminare în regim fotoperiodic.

Astfel, pentru a obține biomasa de spirulină cu un nivel înalt al activității antioxidante, și deci cu conținut înalt de componente antiradicalice, care acționează în baza mecanismului donor de electroni (cu valori mari ale testului ABTS) regimul preferabil de cultivare include iluminarea continuă. În acest caz în calitate de produs activ pot fi considerate toate 3 tipuri de extracte studiate. Pentru a obține produse cu activitate antiradicalică în baza mecanismului donor de protoni (cu valori înalte ale testului DPPH) biomasa de spirulină urmează a fi cultivată în regim de iluminare continuă, colectată la începutul fazei de creștere exponențială, iar în calitate de produs activ va fi considerat extractul hidric.

Bibliografie

1. Ahmed S. Gad, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats //Nutrition, 2011, V. 27 (5), p. 582-589.
2. Celekli A., Donmez G. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and b-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. //World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 22, p. 183-189.
3. Jaime L. et al. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD //Journal of Separation Science, 2005, V. 28 (16), p. 2111-2119.
4. Li-chen Wu et al. Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Spirulina* and *Chlorella* Water Extracts //J. Agric. Food Chem., 2005, 53 (10), p. 4207-4212.
5. Lin Wang et al. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction //Food Chemistry, 2007, V. 105, (1), p. 36-41.
6. Molyneux P.. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity //Sci. Technol., 2004, 2, p. 211-219.
7. Piñero Estrada J.E. et al. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract //Il Farmaco, 2001, V. 56, (5-7), p. 497-500.
8. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay //Free Radical Biology & Medicine, 1999, 10, p. 1231-1237.
9. Sadovnic D. et al. Activitatea antioxidantă a preparatului etanolic în baza biomasei de *Porphyridium cruentum* //V International Conference „Actual Problems in Modern Phycology”, Chișinău, Moldova, November 3-5, 2014, p. 89-94.
10. Sadovnic D. Tehnologii de obținere a preparatelor antioxidante și antiradicalice din biomasa algei roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01. Teza de doctor, Chișinău, 2014, 159 p.
11. Shin Yu-Mi et al. Quality characteristics and antioxidant activity of *Spirulina* added yogurt //Korean journal of food and cookery science. 2008, V. 24(1), p. 68-75.
12. Takano H. et al. Effects of intensity and quality of light on phycocyanin production by a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. NKBG 042902 //Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43 (6), p. 1014-1018
13. Takashi Hirata et al. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis* //Journal of Applied Phycology, 2000, V. 12(3), p. 435-439.
14. Valuta A. et al. Phycobiliprotein accumulation in cyanobacterium *Nostoc linckia* and modification of antioxidant activity //The Annals of Oradea University, Biology Fascicle”. 2015, Tom XXII, Issue: 1, p. 13-19.
15. Valuța A. Activitatea antiradicalică a extractelor din cianobacteria *Nostoc linckia* pe durata ciclului vital //Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științele vieții. 2013, nr. 3(322), p.154-167.