

MICROBIOLOGIA I BIOTEHNOLOGIA**INFLUEN A STRESULUI OXIDATIV INDUS ASUPRA
COMPONEN EI I ACTIVIT II ANTIOXIDANTE
A BIOMASEI DE *SPIRULINA PLATENSIS*****Rudic V., Rudi L., Cepoi L., Chiriac T., Codreanu S., Sadovnic D.,
Chelmenciuc V., Miscu V., Didic I.***Institutul de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei***Rezumat**

Studiul de fa a fost efectuat in scopul eviden ierii ac iunii stresului oxidativ indus asupra activit ii antioxidante i con inutului de componente func ionale (proteine, -caroten, ficobiline, fenoli) din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. Pentru inducerea stresului oxidativ au fost utiliza i compu ii coordinativi ai cobaltului cu bazele *Schiff*. Conform rezultatelor ob inute, stresul oxidativ indus la spirulin este asociat cu diminuarea activit ii antioxidante si a componentelor principale din biomas .

Cuvinte cheie: *Spirulina platensis*, stres oxidativ, proteine, -caroten, ficobiline, fenoli, activitate antioxidant

Depus la redac ie 20 martie 2015

Adresa pentru coresponden : Rudi Ludmila, Institutul de Microbiologie i Biotehnologie al Academiei de tiin e a Moldovei, str. Academiei 1, MD-2028 Chi in u, Republica Moldova; e-mail: rudiludmila@gmail.com; tel. +373 22 725306

Introducere

Cianobacteria *Spirulina platensis*, unul dintre cei mai importan i produc tori de substan e bioactive, este i un obiect preferat pentru studiile fiziologice i biochimice, având o capacitate deosebit de adaptare i modificare a metabolismului la ac iunea factorilor externi [1]. Monitorizarea evolu iei proceselor biosintetice în biomasa de spirulin în corelare cu modificarea statutului antioxidant în condi ii de stres oxidativ prezint un interes v dit pentru tehnologiile de ob inere a produselor finale din biomasa de spirulin .

Pentru stimularea activit ii biosintetice a cianobacteriilor i microalgelor sunt pe larg utiliza i compu ii coordinativi, fiind demonstrat i capacitatea acestor compu i de a modifica statutul antioxidant al microalgelor [3, 7-9].

Scopul cercet rilor din prezentul studiu a constat în eviden ierea ac iunii stresului oxidativ indus prin aplicarea compu ilor coordinativi asupra componen ei i activit ii antioxidante a biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis*.

Materiale i metode

Cianobacteria *Spirulina platensis* a fost cultivat în condi ii de laborator pe mediul mineral optimizat [9]. Biomasa ei a fost determinat spectrofotometric cu aplicarea lungimii de und 620 nm [11]. *Activitatea antioxidant* a biomasei de spirulin a fost determinat cu utilizarea în calitate de substrat a radicalului DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) [2,5] i ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) [6].

Determinarea cantitativ a proteinelor s-a efectuat dup metoda Lowry, adaptat la obiectul dat de studiu [10]. *Determinarea cantitativ a ficobilinelor* s-a realizat prin metoda spectrofotometric . Absorban a extractelor a fost determinat la lungimile de und 565, 620 i 650 nm, iar concentratiile au fost calculate conform ecua iilor Gantt i Lipschultz [4]. *Cantitatea de fenoli* din biomas a fost determinat prin metoda colorimetric [11]. *Determinarea -carotenului în biomas* s-a efectuat în urma extragerii pigmen ilor din biomas cu alcool etilic, separarea de biomas prin centrifugare i citirea absorban ei la lungimea de und 450 nm. Con inutul -carotenului se calculeaz conform formulei $C = \text{Abs}_{450} \times 10^3 / 2620$, unde C = concentra ia -carotenului, mg/100g; Abs_{450} = absorban a extractului etanolic de -caroten la lungimea de und de 450 nm; 2620 – coeficientul de extinc ie specific a -carotenului în etanol [10]. .

Pentru inducerea stresului oxidativ au fost selecta i câ iva compu i coordinativi ai cobaltului cu bazele Schiff, solubili în ap i care au fost sintetiza i de colaboratorii Laboratorului Compu ilor Coordinativi al Institutului de Chimie A. M. În articol sunt nota i prin: [Co Schiff]7, [Co Schiff]8 , [Co Schiff]9, [Co Schiff]10, [Co Schiff]11. A fost utilizat o singur concentra ie a compu ilor, de 10 mg/l, selectat în experien ele anterioare [3, 7].

Rezultate i discu ii

Utilizarea speciei de cianofite *Spirulina platensis*, în calitate de organism model este determinat de con inutul foarte variat de substan e antioxidante în biomas i de un grad avansat de acomodare la ac iunea xenobioticelor.

În calitate de indicatori ai viabilit ii spirulinei supuse ac iunii compu ilor coordinativi au fost testate productivitatea, componentele biomasei (con inutul de protein , ficocianin , caroten i fenoli) i activitatea antioxidant .

Productivitatea este unul din indicatorii de baz ai ac iunii unor componente a mediului asupra celulelor bacteriene. În majoritatea cazurilor o cre tere a productivit ii este rezultatul unui efect de stimulare, iar diminuarea biomasei este rezultatul dezvolt rii condi iilor nefavorabile înmul irii.

Este foarte evident influen a inhibitoare a compu ilor [Co Schiff]8 i [Co Schiff]11, prezen a în mediul de cultivare a c rora a redus productivitatea spirulinei cu 39 i 47% respectiv. Pentru compu ii [Co Schiff]7, [Co Schiff]9 i [Co Schiff]10, productivitatea spirulinei a fost determinat la nivelul probei control i a constituit 0,94-1,09 g/l biomas (Figura 1).

Sinteza proteinei a fost afectat esen ial de to i compu ii aplica i (Figura 2). În cazul compu ilor [Co Schiff]7 i [Co Schiff]10, cantitatea de proteine s-a redus cu 39,44 i 38,23% i a constituit 34,17 i 34,83 % biomasa absolut uscat . Compu ii [Co Schiff]9 i [Co Schiff]11, suplimenta i la mediul nutritiv, au redus sinteza proteinelor cu 49,19 i 54,23%. Compusul [Co Schiff]8 s-a manifestat ca un agent cu un grad de inhibi ie biosintetic foarte mare, aplicat în concentra ia de 10 mg/l a redus con inutul de proteine în biomas cu 61%.

Corelarea dintre biomasa spirulinei i con inutul de protein în biomas a determinat clar efectul inhibitor al compu ilor, pentru care varierea producerii de biomas este înso it de o variere similar a reducerii de protein . Pe fonul unei productivit i neafectate, reducerea biosintezei proteinelor poate fi calificat ca un efect inhibitor determinat, i nu ca un efect toxic al compusului.

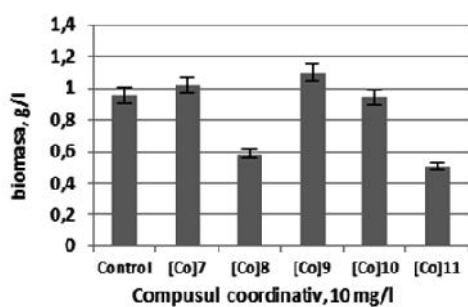


Fig.1. Biomasa spirulinei (g/l), ob inut la cultivare în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff, 10 mg/l .

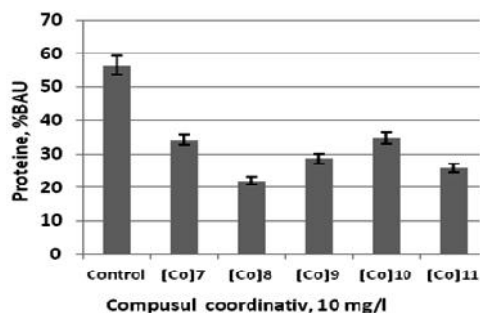


Fig.2. Con inutul proteinei (% BAU) în bi-omasa de spirulin , la cultivare în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff, 10 mg/l.

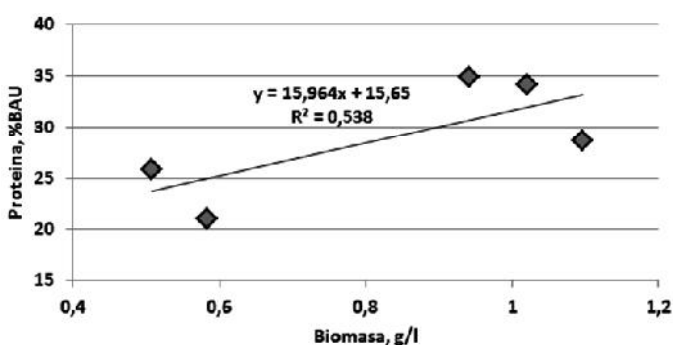


Fig. 3. Corelarea dintre biomasa spirulinei i con inutul de proteina în biomas , la cultivare în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff .

Un element constitutiv important al biomasei de spirulin este ficocianina, care îndepline te rolul de protec ie antiradicalic . Din experien ele realizate, este evident sc derea con inutului de ficocianin în biomasa spirulinei din probele experimentale. (Figura 4).

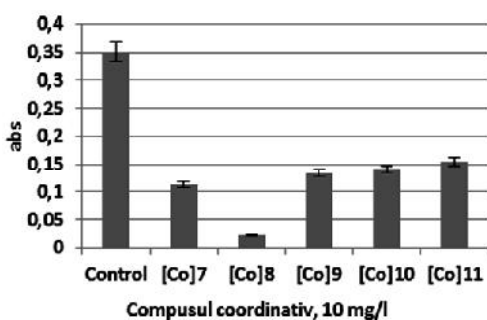


Fig. 4. Con inutul de ficocianin (abs) în biomasa spirulinei, ob inut la cultivare în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff, 10 mg/l.

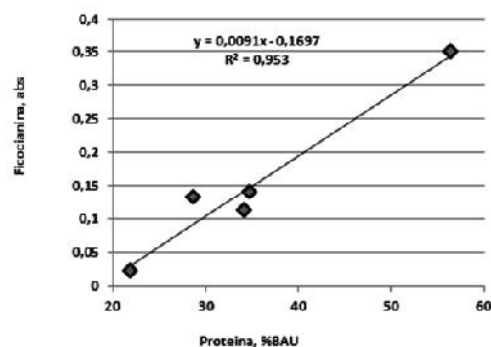


Fig. 5. Corelarea dintre con inutul de protein i ficocianin în biomasa spirulinei, cultivat în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff, 10 mg/l.

În condi iile de suplimentare a mediului nutritiv cu compusul [Co Schiff]8, con inutul de ficocianin în biomas s-a redus cu 93,7%, adic spirulina practic, a încetat sinteza

pigmentului. În cazul compu ilor [Co Schiff]7 i [Co Schiff]9 con inutul de ficocianin în biomas a sc zut cu 68 i 62,1% respectiv. Compu ii [Co Schiff]8 i [Co Schiff]11 au redus sinteza ficocianinei i acumularea ei în biomas cu 59,8% i 55,8% respectiv în compara ie cu proba control.

Prin urmare, ne convingem în continuare de efectul inhibitor al compu ilor coordinativi ai cobaltului cu baze Schiff care ac ioneaz la nivelul sistemelor biochimice de sintez i nu afecteaz procesele de înmul ire a spirulinei. Acest lucru devine evident dac analiz m prin comparare acumularea proteinei în biomas spirulinei cu acumularea de ficocianin în probele experimentale (figura 5). Nivelul de sintez a ficocianinei pentru probele experimentale este unul similar pentru majoritatea compu ilor, propor ional diminu rii cantit ii de protein .

Unul din componentele cu ac iune antiradicalic major din biomas de spirulin este carotenul. În calitatea sa de antioxidant, sinteza intensiv a lui, ar fi un indice a reactivit ii de rezisten celular , dezvoltat în condi iile ac iunii compu ilor cobaltului testa i. În cazul aplic rii la mediul de cultivare a spirulinei a compusului [Co Schiff]11, con inutul de caroten este redus, dar în compara ie cu ac iunea celorlal i compu i, aceast reducere este una moderat - cu doar 30,57% (figura 6). Efectul inhibitor al compusului [Co Schiff]8 continu s fie stabil, atestat i prin sc derea con inutului de caroten cu 60% în compara ie cu proba control. Compu ii [Co Schiff]9 i [Co Schiff]10 au redus cu 24 – 30% con inutul carotenului în biomas . Compusul [Co Schiff]7 s-a manifesta identic compusului [Co Schiff]8, reducând con inutul carotenului în biomas de spirulin cu 59%.

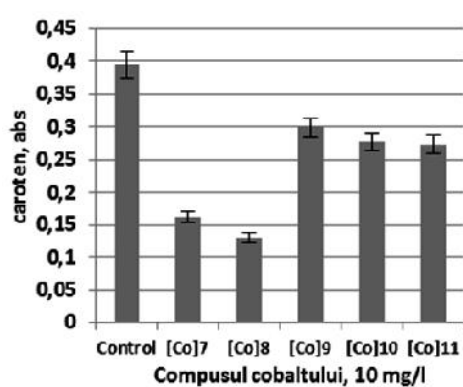


Fig. 6. Con inutul carotenului (abs) în biomas de spirulin , la cultivare în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff, 10 mg/l.

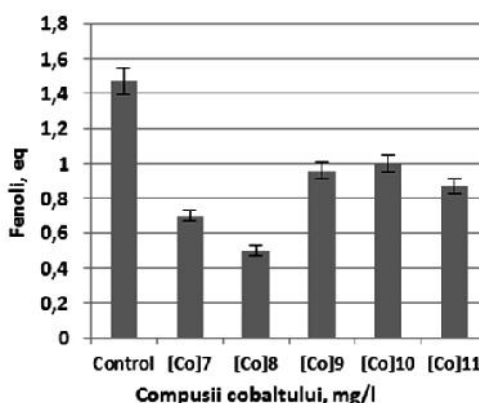


Fig. 7. Con inutul fenolilor (acid galic, mg/ml) în biomas de spirulin , la cultivare în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff.

În continuare în biomas spirulinei a fost determinat con inutul fenolilor, componente cu ac iune antioxidant (figura 7). În biomas de spirulin cultivat în prezen a compusului [Co Schiff]7, con inutul fenolilor s-a redus cu 52,3%. O reducere a fenolilor cu 66% a fost determinat în biomas rezultat din cultivarea în prezen a compusului [Co Schiff]8. Compusul [Co Schiff]11 a redus cu 41% sinteza fenolilor în biomas de spirulin , o reducere relativ moderat , comparabil cu rezultatul experien elor cu utilizarea compu ilor [Co Schiff]9 i [Co Schiff]10.

Astfel, biosinteza fenolilor decurge în paralel cu sinteza proteinelor, iar aciuinea compu ilor cobaltului asupra acestui proces poate fi analizat prin rela ia dintre con inutul fenolilor i con inutul de protein în biomasa spirulinei (Figura 8.).

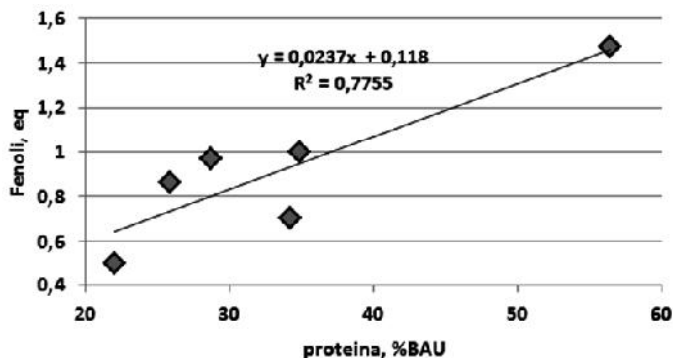


Fig. 8. Corelarea dintre con inutul fenolilor i proteinelor în biomasa spirulinei, la cultivare în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff, 10 mg/l.

Raportul corela ional indic clar, c compu iile cobaltului au afectat în m sur egal sinteza proteinelor i cea a fenolilor.

În continuare a fost determinat activitatea antioxidant a biomasei de spirulin , ob inut din probele experimentale pentru a stabili existen a unei corel ri dintre con inutul redus de componente biologice active i activitatea antioxidant a biomasei. Pentru aceasta au fost efectuate testele antioxidante cu utilizarea radicalilor non-biologici DPPH i ABTS.

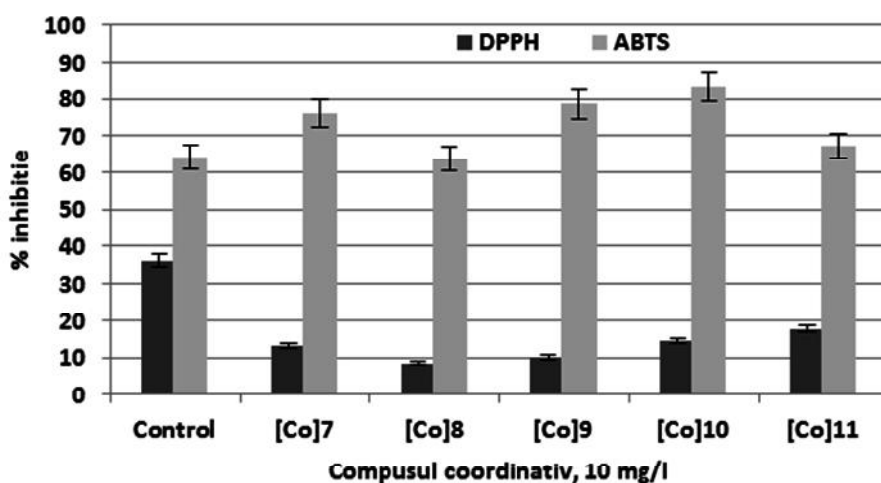


Fig. 9. Activitatea antioxidant (% inhibi tie DPPH, ABTS) a biomasei de spirulin , ob inut la cultivare în prezen a compu ilor Co(II) cu baze Schiff, 10 mg/l .

Rezultatele ob inute au stabilit o reducere drastic a valorilor testului DPPH a biomasei de spirulin în condi iile unei activit i biosintetice reduse (figura 9). În cazul biomasei, rezultate din experien a cu suplimentarea mediului nutritiv cu compu iile [Co Schiff]7 i [Co Schiff]10 valorile testului DPPH sunt de 13,16 i 14,3 % inhibi tie, sau cu 64 i respectiv 60,58% mai mici fa de activitatea antioxidant a biomasei din proba control.

Capacitatea de reducere a radicalului DPPH a biomasei ob inute din experien a cu compu ii [Co Schiff]8 i [Co Schiff]9 este cu 76,6 i 72,2% mai mic fa de proba control. La suplimentarea mediului nutritiv al spirulinei cu compusul [Co Schiff]11, activitatea antioxidant s-a redus în jum tate i constituie 17,6% inhibi ie DPPH. Prin urmare, în biomasa de spirulin s rac în componente biologice active, activitatea antioxidant este redus .

Testul antioxidant cu utilizarea radicalului ABTS este unul din cele mai uzuale teste antioxidative, care se utilizeaz pentru determinarea activit ii antioxidante a componentelor purificate, cât i a complexelor antioxidante. Testul respectiv a fost aplicat pentru determinarea activita ii antioxidante a biomasei de spirulin în urma inducerii stresului oxidativ cu aplicarea compu ilor Co(II) cu baze Schiff (figura 9). În cazul experien elor cu suplimentarea mediul de cultivare cu compu ii [Co Schiff]8 i [Co Schiff]11 valorile testului ABTS a biomasei sunt mai joase comparativ cu proba control. Cea mai mare valoare a testului de reducere a radicalului ABTS (83,4% inhibi ie) a fost înregistrat în cazul ac iunii compusului [Co Schiff]10 i este cu 29% superioar activit ii antioxidante a biomasei din proba control. În cazurile de aplicare a compu ilor [Co Schiff]7 i [Co Schiff]9, activitatea antioxidant a biomasei de spirulin este cu 18-22% mai mare fa de control.

Un con inut redus de fenoli, caracteristic biomasei ob inute din cultivarea prin suplimentarea mediului cu compu ii Co(II) cu baze Schiff, a determinat valori reduse ale testului DPPH (figura 10). Con inutul fenolilor în limitele valorilor de 0,7-1,0 mg acid galic echivalent, a determinat valorile testului DPPH care variaza în limitele a 10-17,6 % inhibi ie.

Coeficientul de determinare, $R^2=0,75$ confirm dependen a valorilor sc zute ale testului DPPH de valorile sc zute ale con inutului de fenoli. A fost demonstrat existen a unei dependen e directe dintre con inutul fenolilor i activitatea antioxidant prin testul DPPH.

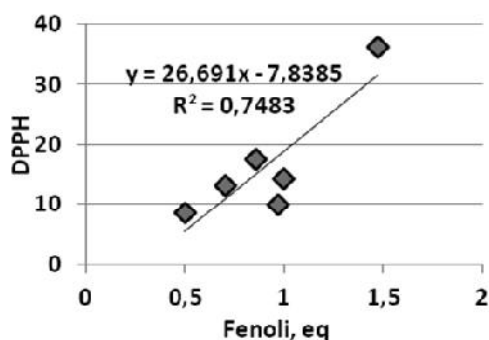


Fig. 10. Corelarea dintre con inutul fenolilor (mg acid galic) i activitatea antioxidant (DPPH, % inhibi ie) a biomasei de spirulin , la cultivare în prezen a compu ilor Co(II), 10 mg/l .

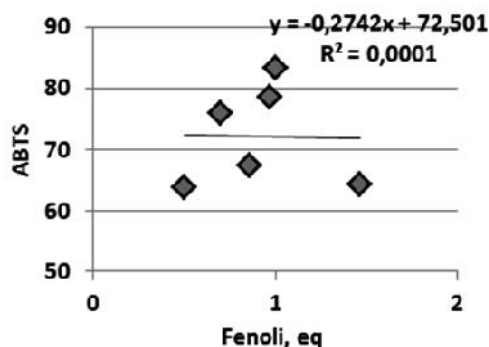


Fig.11. Corelarea dintre con inutul fenolilor (mg acid galic) i activitatea antioxidant (ABTS, % inhibi ie) a biomasei de spirulin , la cultivare în prezen a compu ilor Co(II), 10 mg/l .

Coeficientul de corelare dintre con inutul fenolilor în biomasa de spirulin i activitatea antioxidant , determinat cu aplicarea testului ABTS, este de 0,00, dovad

a lipsei dependen ei dintre valorile acestor parametri. Compu ii ca ficocianina i carotenoizii îndeplinesc în celul rolul s u biologic de pigmen i cu participare în procesele fotosintetice. Capacitatea lor de a se manifesta în calitate de antioxidant este una esen ial .

În rezultatul experien elor efectuate a fost stabilit c componentele cu ac iune antioxidant cu masa molecular joas nu au rolul de protec ie antioxidantiv în biomasa de spirulin în condi iile experimentale studiate. În rezultatul ac iunii compu ilor Co(II) cu baze Schiff, cultura de spirulin se afl la limita existen ei cu o activitate biosintetic înjum t it , dar productivitatea este la nivelul probei control. Acest fenomen este unul rar întâlnit în practica biotehnologic . În cele mai multe cazuri, efectul toxic al unui sau a câtorva xenobiotice din mediul nutritiv se manifest , în primul rând, prin reducerea productivit ii, care poate fi urmat de intensificarea unor procese biosintetice. Prin urmare, a fost determinat un fenomen de reactivitate biologic nespecific pentru cultura cianobacteriei *Spirulina platensis*.

Concluzii:

1. Stresul oxidativ indus la *Spirulina platensis* este asociat cu diminuarea cantit ii componentelor de baz ale biomasei (proteine, ficocianin , caroten , fenoli).
2. Activitatea antioxidant a biomasei ob inute în condi ii de stres oxidativ de asemenea scade, corelând cu con inutul redus de componente bioactive.
3. În cazul stresului oxidativ indus cu compu ii coordinativi ai cobaltului cu baze Schiff la *Spirulina platensis*, cantitatea de biomas acumulat nu este un indiciu sigur de apreciere a st rii culturii, deoarece diminuarea componentelor func ionale are loc în condi iile producerii de biomas în limitele normale.

Bibliografie

1. Belay Amha. Handbook of Microalga Culture: Applied Phycology and Biotechnology. // Wiley Blackwel, 2013, p.736.
2. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. //Food Science and Technology, 1995, p. 25-30.
3. Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Chiriac T., Chelbet V., Ia co Iu., Coropceanu E., Pisarenco M., Rudic V. Activitatea antioxidant a Haematococcus pluvialis la diferite etape ale ciclului vital în prezen a compu ilor coordinativi ai Co cu bazele Sciff. // Buletinul Academiei de tiin e a Moldovei. tiin ele Vie ii. 2013. V. 1(319) p. 126-136.
4. Gantt, E., Lipschultz, C.A.. Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum* pigment analysis. // Biochemistry, 1974, 13: 14-20.
5. Perez-Jimenez Jara, Arranz Sara, Taberero Maria, Diaz- Rubio M. Elena, Serrano Jose, I Gonisabel, Saura-Calixto Fulgencio. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. // Food Research International 2008, V 41, Issue 3, Pages 274–285
6. 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, 26(9/10): 1231-1237.
7. Rudi L., Cepoi L., Miscu V., Chiriac T., Valu A., Codreanu S., Sadovnic D., Rudic V. Producerea de biomas i carotenoizi de c tre alga verde *Haematococcus pluvialis* pe durata ciclului vital sub influen a metalocomplexelor Co (II) cu bazele Schiff. //Buletinul A. M. tiin ele vie ii. 2014, Nr.2 (323), 163-171.

8. Rudi L., Cepoi L., Miscu V., Chiriac T., Valu a A., Djur S., Sadovnic D., Rudic, V. Determinarea dependen ei corela ionale dintre valorile testului ABTS i con inutul de carotenoizi în extractele etanolice din biomasa algei verzi *Haematococcus pluvialis*.// Buletinul Academiei de tiin e a Moldovei. tiin ele vie ii. 2013, 2(320),146-153.

9. Rudic, V. Phycobilitechnology - fundamental research and practical achievements. Chisinau: Elena-VI. 2007. 364 p.

10. Rudic V., Gudumac, V., Bulimaga, V., Dencicova, L., Ghelbet, V., and Chiriac, T. Method of investigation in phycobiotechnology. Chisinau: CE USM. 2002. 60 p.

11. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. In: American Journal of Enology and Viticulture, 1965, v. 16, p. 144-158.