

MICROBIOLOGIA ȘI BIOTEHNOLOGIA

ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI ANTIRADICALICĂ A BIOMASEI CIANOBACTERIEI *SPIRULINA PLATENSIS* CNMN-CB-11 PE FON DE STRES INDUS ÎN CONDIȚII DE PRODUCERE INDUSTRIALĂ

Rudic Valeriu, Rudi Ludmila, Chiriac Tatiana, Cepoi Liliana, Miscu Vera,
Djur Svetlana, Codreanu Svetlana, Dumbrăveanu Veronica, Ghelbet Viorica,
Chelmenciuc Viorica, Doni Veronica

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

Rezumat

Studiul dat se referă la influența stresului de iluminare asupra activității antioxidante și antiradicalice în biomasa tulpinii *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 în condiții de producere industrială. Răspunsul culturii de spirulină la stresul de iluminare a fost apreciat în baza capacității antioxidante și antiradicalice a biomasei. A fost stabilit că reducerea perioadei de iluminare la 4 ore în zi pe durata fazei creșterii exponențiale a culturii modifică în direcția majorării activitatea antioxidantă a extractelor etanolice și hidrice din biomasa colectată. Stresul de iluminare a modificat semnificativ activitatea antiradicalică care s-a redus cu 30-50% în cazul extractelor etanolice și a crescut cu 50-100% în cazul extractelor hidrice. A fost stabilit efectul imediat al stresului de iluminare asupra activității antiradicalice a ambelor tipuri de extracte.

Cuvinte cheie: *Spirulina platensis*, stres de iluminare indus, activitate antioxidantă, activitate antiradicalică

Depus la redacție 03 mai 2017

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

Introducere

Datorită conținutului de compuși biologic activi *Spirulina (Arthrospira) platensis*, este utilizată în calitate de materie primă pentru producerea preparatelor antioxidante cu o largă aplicare în medicină, farmacologie, cosmetologie ș.a [3,8]. Aplicând proceduri de extragere în apă sau solvenți organici polari ca alcoolul etilic, din biomasa de spirulină se obțin complexe antioxidante, formate în special din elemente non-enzimatice [5,9]. Astfel, biomasa devine un produs tot mai solicitat pe piață. Eficiența producerii industriale a spirulinei depinde atât de condițiile de cultivare, cât și de componența mediului de cultivare. În acest context, eficientizarea procesului tehnologic devine un obiectiv major, dar în lupta pentru atingerea lui trebuie de ținut cont în primul rând de calitatea produsului final [6, 12].

Sunt cunoscute și aplicate diverse procedee de stimulare a activității biosintetice a spirulinei în scopul obținerii biomasei cu un conținut sporit de principii biologic active, printre care și componentele cu capacitate antioxidantă și antiradicalică [7]. În majoritatea lor tehnologiile utilizează efectul stresului indus în calitate de factor care redirecționează activitatea biosintetică a spirulinei [1,4,6,12].

Reacția spirulinei la stres este foarte variată și implică activarea antioxidantilor enzimatici și non-enzimatici care se includ activ în stabilizarea și menținerea culturii. Sunt foarte variați și factorii mediului care pot induce starea de stres. Pentru *Spirulina platensis* care este un organism autotrof, lumina este esențială pentru fotosinteză, dar în același timp, poate fi o sursă de stres major. Iluminarea intensă generează o superproducere a oxigenului singlet, care se presupune că inhibă procesele de reparare a fotosistemului II (PSII) inactivat de lumină [13]. Reducerea perioadei de iluminare sporește activitatea pigmentilor fotosintetici auxiliari cu implicarea altor structuri membranare în mecanismele transferului de electroni.

În ultimii ani au fost descifrate unele mecanisme de generare a speciilor reactive de oxigen la plantele superioare, dar cercetările demonstrează, că acestea nu pot explica exact aceleași procese și la cianobacterii. Din acest motiv cercetările ce țin de modelarea și studierea stresului oxidativ la cianobacterii rămân a fi actuale. În special, se studiază influența condițiilor de iluminare asupra diferitor procese vitale la cianobacterii, inclusiv asupra capacității antioxidante totale [1].

Cele mai potrivite metode de determinare a activității antioxidante a produselor din spirulină sunt cele aplicate complexelor de antioxidanți cum ar fi testele cu utilizarea radicalilor ABTS și DPPH. Aceste teste pot fi folosite pentru determinarea activității antioxidante în baza capacității de implicare a diferitor antioxidanți în reacțiile de oxido-reducere și a proprietăților antiradicalice în baza capacității de reducere prin transferul de protoni [14].

În lucrarea dată a fost monitorizată modificarea activității antioxidante și antiradicalice a extractelor hidrice și etanolice din spirulina, cultivată în condiții de producere industrială în regim de iluminare redusă, pentru a determina impactul stresului de iluminare asupra valorilor testelor antioxidante.

Metodele de realizare a cercetărilor

Obiectul de studiu. În calitate de obiect de studiu a servit tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 depusă în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

Procesul de cultivare. Cianobacteria *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 a fost cultivată în condiții industriale în bioreactoare cu volumul de lucru 40 l cu utilizarea mediului mineral optimizat [11], la întreprinderea „Ficotehfarm” SRL cu sediul în mun. Chișinău. Condițiile de cultivare au fost următoarele: temperatura de 25-28°C, pH-ul mediului 9-10, iluminarea de 3000-4000lx; agitare permanentă și regim de iluminare continuă. Durata ciclului de cultivare a fost de 10 zile.

Modelarea stresului de iluminare. În ziua a 3-a a ciclului vital cultura de spirulină a fost supusă stresului de iluminare prin reducerea perioadei luminoase la 4 ore din 24. Acest regim a fost respectat până în ziua a 7-a de cultivare, când a fost restabilit regimul de iluminare continuă, care a fost menținut până în ziua a 10-a.

Colectarea probelor. Pe durata experienței, timp de 10 zile, la intervale de 24 ore, din fiecare bioreactor s-a colectat 100 ml suspensie. Biomasa a fost separată prin filtrare în vid și demineralizată prin spălare repetată cu soluție izotonică de acetat de amoniu [11].

Prepararea extractelor. Pentru obținerea extractelor etanolice a fost preparat amestecul din 100 mg biomasă și 10 ml alcool etilic care a fost supus agitării timp de

120 min la temperatura camerei. Extractele etanolice obținute se separă de biomasă prin centrifugare. Extractele hidrice au fost obținute prin tehnica congelării/decongelării repetate a amestecului de biomasă în apă (100 mg biomasă la 10 ml apă distilată). Extractele hidrice obținute se separă de biomasă prin centrifugare și se păstrează în formă congelată.

Determinarea activității antioxidante (testul ABTS) a fost efectuată pentru extractele etanolice și hidrice din biomasa spirulinei. În calitate de substrat a fost utilizat radicalul acidului 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic (ABTS). Amestecul de reacție a constat din 0,3 ml extract și 2,7 ml soluție ABTS. Timpul de reacție a fost de 6 min. Rezultatele au fost exprimate în % inhibiție ABTS [10].

Determinarea activității antiradicalice (testul DPPH) a fost efectuată pentru aceleași extracte. În calitate de substrat a fost utilizat radicalul de 1,1 difenil-2-picril hidrazil (DPPH). Absorbanța soluției etanolice DPPH s-a fixat la valoarea de 0,640-0,660 la 517 nm. Amestecul de reacție a constat din 0,3 ml extract și 2,7 ml soluție DPPH. Timpul de reacție a fost de 30 min. Rezultatele au fost exprimate în % inhibiție DPPH [2].

Experiența și toate determinările au fost efectuate în trei repetări. Rezultatele experiențelor au fost exprimate ca valoare medie \pm deviația standard.

Rezultate și discuții

Din fiecare probă colectată pe durata experienței, în conformitate cu procedura descrisă mai sus, au fost obținute două tipuri de extracte - hidric și etanolic. Acestea au fost standardizate după masa uscată (1 mg/ml) și au fost supuse testelor de determinare a activității antioxidante și antiradicalice.

Conform studiilor anterioare este cunoscut, că extractele etanolice conțin astfel de compuși solubili în alcool, cum ar fi tocoferolul, acizi grași, fosfolipide, pigmenții beta-carotenul și clorofila. Reducerea perioadei de iluminare provoacă modificări semnificative în conținutul clorofilei și a carotenului și, ca rezultat, modificarea activității antioxidante. Rezultatele testului antioxidant, efectuat pentru extractele etanolice obținute din biomasa cultivată în condiții optimale cu regim de iluminare continuă, au demonstrat un nivel al activității antioxidante a culturii care se încadrează între 34 și 46% inhibiție radical ABTS, (Tabelul 1). Maximul activității antioxidante de $46 \pm 2,01\%$ inhibiție ABTS a fost determinat în faza exponențială, în ziua a 4-a de cultivare. În următoarele zile, activitatea antioxidantă se menține la nivelul valorilor de 36-42% inhibiție ABTS cu o ușoară tendință de micșorare spre sfârșitul cultivării.

La cultivare în condiții de stres indus a fost stabilită modificarea activității antioxidante pentru extractele etanolice. A fost stabilită o creștere de 1,2 ori a activității antioxidante în condițiile stresului de iluminare indus față de condițiile optimale. Această creștere a fost înregistrată la cea de-a 4-a zi de cultivare. În faza staționară, când a fost restabilit regimul de iluminare continuă, valorile testului ABTS s-au modificat semnificativ comparativ cu varianta control (condiții optimale), înregistrând un spor de 1,33 ori în ziua a 8-a de cultivare. Pe durata fazei staționare (zilele 7-10 ale ciclului de cultivare), activitatea antioxidantă a extractelor etanolice obținute în varianta experimentală cu modificarea regimului de iluminare, rămâne a fi ridicată. Prin urmare, creșterea valorilor testului ABTS pentru extractele etanolice din spirulină în faza staționară este rezultatul privării culturii de iluminare în faza exponențială.

Tabelul 1. Modificarea activității antioxidante (ABTS, % inhibiție) și antiradicalice (DPPH, % inhibiție) a extractelor etanolice din spirulină pe durata cultivării în condiții optimale și de stres de iluminare.

Ciclul de cultivare, zile		ABTS % inhibiție			DPPH, % inhibiție		
		Condiții optimale	Condiții de stres de iluminare	Raportul valorilor ABTS (stres/opim)	Condiții optimale	Condiții de stres de iluminare	Raportul valorilor DPPH (stres/opim)
1	Faza de latență	34±1,20	34±2,01	1,0	32±1,06	32±1,14	1,0
2		42±1,08	42±1,02	1,0	32±1,08	32±1,21	1,0
3	Faza exponențială	41±1,22	48±1,02	1,17	31±2,01	20±2,01	0,64
4		41±1,02	49±1,11	1,20	31±2,20	15±2,02	0,48
5		46±2,01	44±2,02	0,96	32±1,08	20±1,24	0,63
6		38±2,01	40±2,01	1,05	36±1,11	19±1,22	0,54
7	Faza staționară	42±1,04	48±1,11	1,14	34±1,22	19±1,02	0,56
8		39±1,10	52±1,12	1,33	33±1,21	19±2,01	0,58
9		36±1,00	46±2,12	1,28	29±1,01	20±1,08	0,69
10		35±1,00	46±2,21	1,31	25±2,22	18±1,02	0,72

Activitatea antiradicalică a extractelor etanolice, obținute din biomasa de spirulină crescută în condiții optimale de producere industrială, prezintă valori cuprinse între 25 și 36 % inhibiție radical DPPH, în ușoară creștere pe durata perioadei exponențiale. Maximul de 36% inhibiție radical DPPH a fost stabilit în ziua a 6-a de cultivare (Tabelul 1). În faza staționară se observă micșorarea activității antiradicalice, care în ziua a 10-a constituie 25% inhibiție DPPH.

Stresul de iluminare indus pe durata perioadei de creștere exponențială a spirulinei a redus semnificativ (cu 30-50%) activitatea antiradicalică a extractelor etanolice. Din prima zi de stres de iluminare, capacitatea componentelor extractului etanolic de a reduce radicalul DPPH scade cu 36% comparativ cu activitatea antiradicalică a probelor control. Valorile joase se mențin pe toată perioada creșterii exponențiale. În faza staționară, restabilirea regimului de iluminare nu a determinat creșterea valorilor antiradicalice care rămân a fi mai joase comparativ cu valorile obținute pentru varianta martor.

Astfel, reducerea perioadei de iluminare pe durata creșterii exponențiale a spirulinei a indus scăderea semnificativă a activității antiradicalice a extractelor etanolice. Privarea de iluminare pe durata creșterii exponențiale a determinat valorile joase ale testului DPPH și în faza staționară când a fost restabilit regimul de iluminare. Prin urmare, modificarea activității antiradicalice a extractelor etanolice în condiții de stres de iluminare este ireversibilă în cadrul unui ciclu tehnologic.

Conform estimărilor proprii și a datelor din literatura de specialitate extractele hidrice obținute din biomasa de spirulină conțin pigmenți ficobilinici, fenoli, vitamine hidrosolubile, hidrați de carbon. În mod sigur, privarea de lumină duce după sine modificarea conținutului de ficobiline și fenoli ca componente funcționale, care determină activitatea antioxidantă a extractelor hidrice. Activitatea antioxidantă a

extractelor hidrice, obținute din biomasa de spirulină cultivată în regim de iluminare continuă, prezintă valori cuprinse între 31 și 42% inhibiție radical cation ABTS. Maximul de 40-42% inhibiție ABTS a fost determinat în faza exponențială în ziua a 4-a de cultivare și în faza staționară, ziua a 10-a a ciclului (Tabelul 2).

În varianta experimentală de inducere a stresului de iluminare pe durata creșterii exponențiale, activitatea antioxidantă a extractelor hidrice se modifică în direcția majorării, cu un spor de 1,3 ori la începutul și sfârșitul fazei de creștere exponențială față de valorile respective determinate în condițiile optimale. Restabilirea regimului de iluminare a dus la micșorarea valorilor testului antioxidant pentru extractele hidrice la nivelul probelor control în zilele 9-10 de cultivare. Astfel, în extractele hidrice obținute din biomasa de spirulină creșterea activității antioxidante are loc pe durata acțiunii factorului de stres. Restabilirea condițiilor de iluminare a avut ca efect restabilirea activității antioxidante la valorile probelor control.

Pe durata cultivării spirulinei în condiții optimale cu regim de iluminare continuă, activitatea antiradicalică a extractelor hidrice are valori mult mai mici comparativ cu activitatea antiradicalică a extractelor etanolice (Tabelul 2). Astfel, valorile testului DPPH în aceste condiții au fost cuprinse între 5,4 și 10,0 % inhibiție DPPH.

Tabelul 2. Modificarea activității antioxidante (ABTS, % inhibiție) și antiradicalice (DPPH, % inhibiție) a extractelor hidrice din spirulină pe durata cultivării în condiții optimale și de stres de iluminare.

Ciclul de cultivare, zile		ABTS % inhibiție			DPPH, % inhibiție		
		Condiții Optimale	Condiții de stres de iluminare	Raportul valorilor ABTS (stres/opim)	Condiții optimale	Condiții de stres de iluminare	Raportul valorilor DPPH (stres/opim)
1	Faza de latență	38±1,10	38±1,21	1,0	10,0±1,06	10,0±1,01	1,0
2		34±1,21	34±1,02	1,0	8,7±0,78	8,7±1,11	1,0
3	Faza exponențială	36±2,02	47±1,02	1,17	6,7±1,01	9,4±1,81	1,40
4		40±1,12	41±1,02	1,06	5,4±1,05	9,2±1,01	1,70
5		31±2,00	36±1,09	1,16	5,5±1,68	10,6±1,04	1,93
6		35±1,08	46±1,16	1,05	5,8±1,51	11,6±0,41	2,00
7	Faza staționară	36±1,24	42±1,12	1,14	7,2±0,82	10,6±0,22	1,47
8		31±2,14	36±1,00	1,33	7,3±0,66	11,0±0,33	1,50
9		35±1,08	33±1,10	1,28	6,7±1,11	10,4±1,01	1,55
10		42±1,06	38±1,20	1,31	6,2±1,02	10,4±1,04	1,68

În condiții de stres de iluminare indus valorile testului DPPH pentru extractele hidrice au crescut semnificativ. Sporul de 1,4-2,0 ori a valorilor antiradicalice a fost stabilit pe durata fazei de creștere exponențială a spirulinei ca răspuns direct la condițiile specifice de iluminare. Restabilirea regimului de iluminare a determinat tendința de reducere a activității antiradicalice ale extractelor hidrice, dar care au rămas superioare variantei experimentale control. Spre finalul ciclului de cultivare, capacitatea de reducere a radicalului DPPH a extractelor hidrice este cu 30-50% mai mare comparativ cu varianta cultivării în condiții optimale.

Dependența dintre condițiile de iluminare și modificarea activității antiradicalice a extractelor hidrice demonstrează implicarea stresului de iluminare în calitate de factor care determină creșterea activității antiradicalice a extractelor hidrice. Prin urmare, în condiții de producere, stresul, provocat de reducerea perioadei luminoase, modifică semnificativ activitatea antiradicalică a extractelor hidrice din biomasa spirulinei în direcția sporii valorilor testului DPPH.

Concluzii

În condiții de producere industrială, stresul, provocat de reducerea perioadei de iluminare modifică activitatea antioxidantă și antiradicalică a extractelor etanolice și hidrice obținute din biomasa spirulinei colectată pe durata cultivării. Activitatea antioxidantă a extractelor etanolice și hidrice din biomasa de spirulină în condiții de stres de iluminare pe durata fazelor de creștere exponențială și staționară este mai înaltă comparativ cu valorile obținute în condiții optimale de creștere a spirulinei de 1,14-1,33 ori. Valorile înalte se mențin atât pe durata stresului, cât și după înlăturarea lui. Activitatea antiradicalică a extractelor hidrice din spirulină de asemenea crește ireversibil din momentul instalării stresului de iluminare (de 1,4-2,0 ori). În același timp, activitatea antiradicalică a extractelor etanolice în condiții de iluminare redusă scade cu până la 50% față de nivelul martorului, ceea ce se explică prin scăderea intensității proceselor fotosintetice în aceste condiții și a activității principalelor componente ale acestui tip de extracte –clorofila și carotenoizii.

Astfel, în condițiile stresului indus prin reducerea perioadei luminoase pentru cultura de spirulină adaptată la condiții tehnologice are loc creșterea activității componentelor hidrosolubile ale biomasei capabile să realizeze reacțiile de anihilare a radicalilor prin mecanismele transferului atomului de hidrogen, precum și a transferului unui singur electron și a componentelor antioxidante solubile în alcool, care acționează prin mecanismul transferului de electroni.

Bibliografie

1. Abd El-Baky Hanaa H., El Baz F. K., El-Baroty Gamal S. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress. //Acta Physiol Plant 2009, 31:623–631.
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, 28: 25-30.
3. Finamore Alberto, Palmery Maura, Bensehaila Sarra and Peluso Ilaria. Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly *Spirulina*. //Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Article ID 3247528, (2017) 14 pages.
4. Ganesh Aparna B., Manoharan Periakaruppan T., Suraishkumar G.K. Responses of the Photosynthetic Machinery of *Spirulina maximata* Induced Reactive Oxygen Species. //Biotechnology and Bioengineering ,2007, 96(6): 1191-1198.
5. Gitte S. Jensen, Victoria L. Attridge, Joni L. Beaman, Jesse Guthrie, Axel Ehmann, and Kathleen F. Benson. Antioxidant and anti-inflammatory properties of an aqueous cyanophyta extract derived from *Arthrospira platensis*: Contribution to Bioactivities by the Non-Phycocyanin Aqueous Fraction. //J Med Food ,2015, 18(5):535–541
6. Moreira Juliana Botelho, Vieira Costa Jorge Alberto and Greque de Morais Michele. Evaluation of different modes of operation for the production of *Spirulina sp.* //J Chem Technol Biotechnol, 2016, 91:1345–1348.

7. Mostafa Mahmoud Sami Ismaiel et al. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Brazilian Journal of Microbiology, 47, 2016, 298-304.
8. Peter C. Dartsch. Antioxidant Potential of Selected *Spirulina platensis* Preparations. //Phytother. Res.,2008, 22:627–633.
9. Pinero Estrada J.E., Bermejo Bescos P., Villar del Fresno A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. Il Farmaco,2000, 56:497– 500.
10. Prieto P., Pineda M., Aquilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. //Analytical Biochemistry,1999, 10:337-341.
11. Rudic V. ș.a.. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău: Știința, 2007, 364 p.
12. Sanchez-Luna Luis Dante et al. Influence of pH, Temperature, and Urea Molar Flowrate on *Arthrospira platensis* Fed-Batch Cultivation: A Kinetic and Thermodynamic Approach. //Biotechnology and Bioengineering, Vol. 96, No. 4,2007, 96(4):702-711.
13. Shabana Effat Fahmy, et al. Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in response to gamma irradiation. //Food Chemistry, 2017, 214:550–555.
14. Tirzitis Gunars and Bartosz Grzegorz. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. //Acta Biochemica Polonica, 2010) 75(1):139-142.