

OBȚINEREA BIOMASEI FIERCOMPONENTE DE *PORPHYRIDIUM CRUENTUM* ȘI APRECIEREA ACTIVITĂȚII EI ANTIOXIDANTE

Rudic V., Cepoi Liliana, Rudi Ludmila, Ghelbet Viorica, Chelmenciuc Viorica, Loseva Liudmila*, Jilițova Iulia, Dencicov-Cristea Lidia**

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei

**Universitatea de Stat din Grodno „Ianco Cupala”, Grodno, Belarus*

***Universitatea Internațională Ecologică de stat „A. D. Saharov”, Minsk, Belarus*

Introducere

Microalgele sunt surse recunoscute de antioxidanți naturali [3-4, 7]. În procesul de fotosinteză ele convertesc energia solară în energie chimică, și în același timp generează oxigen molecular, concentrația căruia poate atinge valori mari. Deoarece oxigenul este ușor activat de radiațiile ultraviolete sau de lumina solară și transformat în specii reactive de oxigen (SRO), plantele și microalgele au dezvoltat mecanisme de protecție proprii - de sinteză a compușilor antioxidanți care pot minimaliza concentrația speciilor reactive de oxigen [12].

Biomasa microalgelor poate servi ca sursă sigură și constantă de antioxidanți,

deoarece poate fi cultivată pe scară largă în bioreactoare și în condiții dirijate. În plus, calitatea biomasei microalgale poate fi controlată în așa fel ca să nu conțină erbicide, pesticide sau alte substanțele toxice datorită mediilor nutritive ecologice [5].

În calitate de surse de antioxidanți este studiată, de rând cu alte microalge, specia *Porphyridium cruentum*, care prezintă un interes aparte prin conținutul de ficobiloproteine, polizaharide sulfatate, superoxidismutază și acizi grași polinesaturați cu aplicații în industria alimentară și farmaceutică [2, 9].

A fost stabilit, că orice modificare, care provoacă devieri în metabolismul celulelor microalgale, duce la accelerarea evidentă a activității enzimelor antioxidante și la sinteza unei cantități importante de antioxidanți nonenzimatici.

Metalele cu valența variabilă sunt responsabile, în mare măsură, de formarea SRO prin intermediul reacțiilor Fenton și Haber-Weis [12]. Fierul, unul din aceste elemente, este indispensabil pentru organismele vii, având un rol biochimic semnificativ atât sub aspect structural, cât și funcțional. Fierul convertit în compuși bioorganici se include efectiv în metabolismul de biosinteză celulară, în măsura necesităților fiziologo-metabolice ale organismului. Fier-ascorbat peroxidază și în special, fier-superoxidismutază sunt printre compușii cu rol principal în distrugerea radicalilor liberi.

Mecanismele de transport și acumulare a fierului la algele monocelulare sunt foarte puțin studiate în comparație cu alte organisme. Sunt cunoscute cercetări recente în ce privește transportul metalelor de tranziție, inclusiv și a fierului la alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* [10]. A fost stabilit că fierul stimulează acumularea de astaxantină în biomasa algei verzi *Haematococcus pluvialis* [4].

Astfel, transportul fierului ține de prezența unor grupe speciale de transportatori membranari (ionofori fieric specifici - siderofori) capabili de a extrage ionii de fier din mediul nutritiv și de a-i transporta în interiorul celulei. Odată ajunși în interior, ionii de fier formează legături cu componente macromoleculare, fiind metabolizați în structura unor proteine, peptide, aminoacizi, polizaharide, datorită interacțiunii cu grupările hidroxil-(OH) ai alcoolilor primari și secundari, cetogrupele- (COH), precum și cu grupările hidroxilaminice (N-OH), cu restul acetat (COO⁻), punțile disulfidice (SH⁻, -S-S-) etc. [1].

Ipoteza de lucru a constatat în aceea, că biomasa fercomponentă, care poate fi obținută prin metabolizarea Fe(III) din componența compușilor coordinativi, posedă activitate antioxidantă înaltă, deoarece prezența compușilor metalici sunt agenți cauzali ai stresului oxidativ, și asigură sporirea activității antioxidante a biomasei microalgale.

Scopul cercetărilor a constatat în obținerea biomasei fercomponente de *Porphyridium cruentum* cu activitate antioxidantă înaltă.

Materiale și metode utilizate

Drept obiect de studiu a servit tulpina de colecție a algei roșii *Porphyridium cruentum* (Näg) CNM-AR-01 (RHODOPHYTA) a fost crescută pe mediul nutritiv mineral VP 2 (Brevet MD Nr.690) cu următoarea componență chimică: macroelemente în g/l: NaCl-7,0; KCl-7,5; MgSO₄·7H₂O-1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O-0,15; KBr-0,05; KI-0,05; K₂HPO₄-0,2; soluția de microelemente 1ml/l, ce conține în mg/l: FeCl₃·6H₂O-2,7; ZnSO₄·5H₂O-0,02; CuSO₄·5H₂O-0,05; MnSO₄·5H₂O-0,3; H₃BO₃-0,6; MoO₃-0,02; NaVO₃-0,05 [10].

Cultivarea a fost efectuată în baloanele Erlenmayer cu menținerea următorilor parametri: pH-ul 6,8-7,2, temperatura de 23-25° C, iluminare de 2000-3000 ex/cm², agitare lentă periodică. Cantitatea de inoculum a fost de 0,5-0,6 g/l în recalcul la BAU. Durata cultivării a fost de 10 zile.

Compușii coordinativi ai fierului, utilizați în calitate de stimulatori, au fost sintetizați și oferiți pentru cercetare de către d-na Ana Lăzărescu, doctorul în chimie, Institutul de Chimie AȘM. Suplimentarea mediului nutritiv cu compuși coordinativi a fost efectuată prin adăugarea cantităților stabilite ale compusului până la inoculare, concentrațiile utilizate fiind de la 5 la 35 mg/l cu intervalul între variante de 5 mg/l.

Prepararea extractelor din biomasa nativă de *Porphyridium cruentum*. La 1 g de biomasă absolut uscată s-a adăugat 50 ml soluție hidro-etanolică (cu concentrația alcoolului etilic de 55%) și a fost agitat timp de 60 min cu viteza de 260 rot/min. Extractul a fost standardizat după conținutul de substanță activă extrasă la 1 mg/ml.

Cantitatea fierului în biomasă a fost determinată conform metodei în baza reacției de oxidarea Fe(II) în Fe(III), cu formarea unui compus complex colorat în roșu și citirea spectrofotometrică la lungimea de undă 495 nm [13].

Activitatea antiradicalică a extractelor din biomasă a fost apreciată cu ajutorul metodei spectrofotometrice cu utilizarea radicalilor liberi 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) [6]. Pentru realizarea reacțiilor a fost utilizată soluția etanolică de 0,6 M DPPH[•]. Reducerea valorilor extincției (% Inhibiție) a soluției de DPPH a fost calculată în baza diferenței de absorbantă (517 nm) a probelor până la și după incubare.

Activitatea antioxidantă a fost realizată în baza reacției de reducere a radicalului 2,2 azinobis 3-ethylbenzotiazolină-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) [8]. ABTS^{•+} radical este generat prin oxidarea ABTS cu persulfat de potasiu. Procentul de inhibiție a fost calculat conform ecuației pentru metoda reducerii DPPH[•].

Toate experiențele au fost executate în 3 repetări. Calculul matematic s-a efectuat utilizând posibilitățile Microsoft Office Excel.

Rezultate și discuții

La prima etapă a prezentului studiu a fost apreciat nivelul acumulării fierului în biomasa de *Porphyridium* la cultivarea lui în prezența unor compuși coordinativi ai Fe(III) și determinate condițiile optime pentru realizarea acestui proces. Au fost selectați patru compuși coordinativi ai Fe(III) cu aminoacizi (alanina, glicina, valina și treonina). Pentru toți compușii implicați în cercetare au fost obținute rezultate asemănătoare, care indică asupra unei creșteri semnificative a cantității de biomasă obținută și asupra unui conținut destul de înalt al metalului acumulat în biomasă în toate probele expuse estimărilor cantitative.

Figura 1 reflectă rezultatele obținute în cazul utilizării în calitate de stimulatori a alaninatului și glicinatului de Fe(III). Pentru toate concentrațiile utilizate ale alaninatului a fost obținută o cantitate de biomasă, care o depășește pe cea a martorului cu 20-25%, deosebirea dintre probele cu diferită concentrație a compusului fiind nesemnificative. În același timp menționăm, că pentru toate concentrațiile testate cantitatea de biomasă se deosebește semnificativ de cea obținută în proba martor (P<0,01). Cantitatea fierului acumulată în biomasa de *Porphyridium cruentum* variază în limite foarte mari – de la 0,12 până la 0,52% din biomasa absolut uscată, cantitatea maximală obținându-se în

cazul concentrațiilor de 30-35 mg/l compus de fier (III) în mediu. La utilizarea în calitate de sursă de fier a [Fe(III)-gly], rezultatele nu se deosebesc esențial, fiind exprimate de asemenea prin sporirea productivității în limitele de 20-30% față de martor și prin acumularea unei cantități de fier în biomasă de până la 0,52% din biomasă absolut uscată.

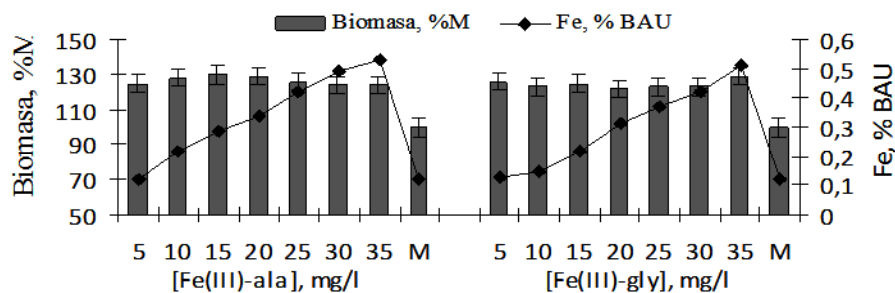


Figura 1. Productivitatea *Porphyridium cruentum* și cantitatea de fier în biomasă obținută la utilizarea alaninatului și glicinatului de Fe (III).

În figura 2 sunt prezentate rezultatele obținute la suplimentarea mediului pentru cultivarea porfiridului cu diferite cantități de treoninat și valinat de Fe(III). În cazul treoninatului valorile înregistrate atât pentru productivitate, cât și cele pentru cantitatea de fier au fost în corespundere cu presupunerile noastre și cu rezultatele obținute anterior pentru alți compuși ai Fe(III).

Astfel, biomasă obținută a fost cu 20-28% mai mare, iar cantitatea de fier acumulată a atins cote de 0,56% BAU. Similar primelor două cazuri deosebirea dintre fiecare din variantele experimentale și martorul au fost veridice $P < 0,01$.

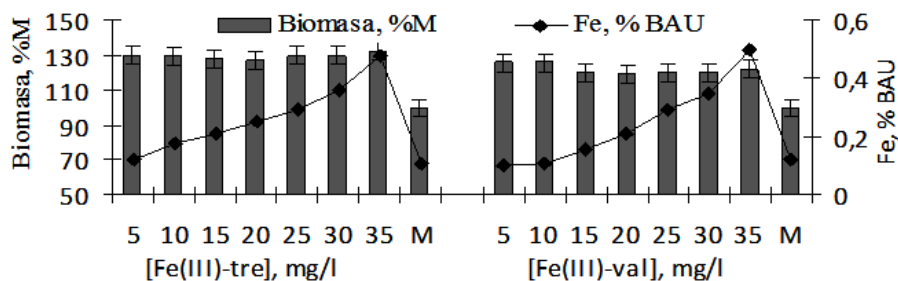


Figura 2. Productivitatea *Porphyridium cruentum* și cantitatea de fier în biomasă obținută la utilizarea treoninatului și valinatului de Fe (III).

În continuare, biomasă de *Porphyridium*, obținută prin cultivarea în prezența compușilor fierului, a fost utilizată pentru prepararea extractelor hidroetanoloce. Extractul din *Porphyridium cruentum* prezintă un produs complex, care include atât componente hidrosolubile, cât și cele liposolubile. Din aceste considerente, pentru aprecierea activității antioxidante a extractelor au fost utilizate două metode, care sunt considerate drept cele mai semnificative în acest domeniu: testul de reducere a radicalului DPPH - informativ pentru extractele policomponente complexe și testul de reducere a radicalului cation ABTS, care permite înregistrarea activității elementelor

hidrofile și lipofile în aceeași măsură.

A fost comparată activitatea antiradicalică a extractelor obținute din biomasa crescută pe mediu nutritiv standard și pe mediu cu adaos a diferitor concentrații de compus coordinativ.

Figura 3 reflectă rezultatele testului antiradicalic cu utilizarea DPPH*, obținute în cazul utilizării în prezența alaninului și glicinului de Fe(III). În cazul concentrațiilor mici ale compusului [Fe(III)-ala] (de până la 25 mg/l) se observă o creștere moderată, cu 25-40%, a activității antiradicalice, iar pentru concentrațiile de 30 și 35 mg/l această creștere este mai semnificativă, fiind cu 60% mai mare decât în cazul extractelor din biomasa martorului ($P < 0,01$). Din cele relatate putem trage concluzia, că alaninul de fier fiind un stimulator activ al reproducerii la *Porphyridium*, este în același timp și un inductor al stresului oxidativ, care se manifestă semnificativ în toate variantele experimentale, dar mai pronunțat - în cazul concentrației de 35 mg/l.

[Fe(III)-gly], care de asemenea este un stimulator al procesului productiv la *Porphyridium*, în concentrațiile de 5 și 10 mg/l nu modifică statutul antioxidant al microalgei crescute pe mediile respective. O creștere a activității antiradicalice a extractelor hidroetanolicе din biomasa de *Porphyridium* se observă începând cu concentrația de 15 mg/l.

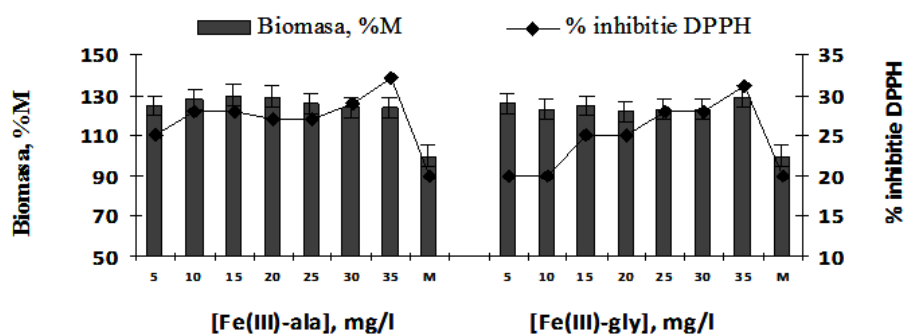


Figura 3. Activitatea antiradicalică (% inhibiție DPPH*) a extractelor din biomasa de *Porphyridium*, obținută pemedii cu adaos de alaninat și glicinat de Fe(III).

În figura 4 sunt prezentate rezultatele obținute la suplimentarea mediului pentru cultivarea *Porphyridium* cu diferite cantități de treoninat și valinat de Fe(III). În toate variantele experimentale, de rând cu sporirea esențială a productivității se observă și un nivel sporit al procesului de inhibiție a radicalului DPPH*. În cazul treoninatului de Fe(III), activitatea antiradicalică a extractului hidroetanolic din biomasa înregistrează valori maxime la concentrațiile de compus de 25, 30 și 35 mg/l.

La concentrația de 35 mg/l are loc o diminuare a procentului de inhibiție a radicalului DPPH comparativ cu concentrația de 30 mg/l, ceea ce ar putea fi o mărturie a faptului, că sistemele antioxidante încep a manifesta semne de cedare. Acest lucru poate duce în final la instalarea unei stări de stres oxidativ în cazul sporirii de mai departe a concentrației de compus în mediul nutritiv. Același lucru este observat și în cazul valinatului de Fe(III), pragul de toleranță fiind mai jos, iar scăderea activității antiradicalice se înregistrează deja la 30 mg/l. În același timp urmează să menționăm, că chiar în variantele numite, activitatea antiradicalică a extractelor experimentale este

mult mai înaltă decât a celor obținute în cazul probei martor.

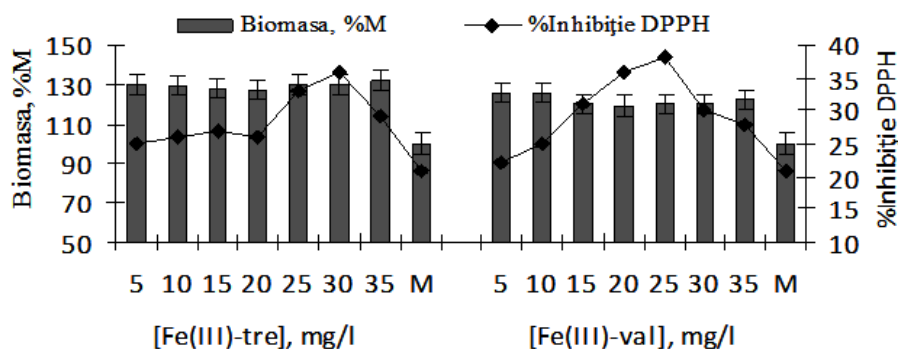


Figura 4 Activitatea antiradicalică (% inhibiție DPPH) a extractelor din biomasa de *Porphyridium*, obținută pe medii cu adaos de treoninat și valinat de Fe(III).

Testul de verificare a activității antioxidante prin inhibarea radicalului cation ABTS este deosebit de informativ, deoarece permite înregistrarea activității componentelor lipo- și hidrosolubile, obținute prin extragerea hidroetanolică (50% etanol). Rezultatele obținute pentru cazurile de aplicare a alaninatului și glicinatului de fier (III) sunt prezentate în figura 5.

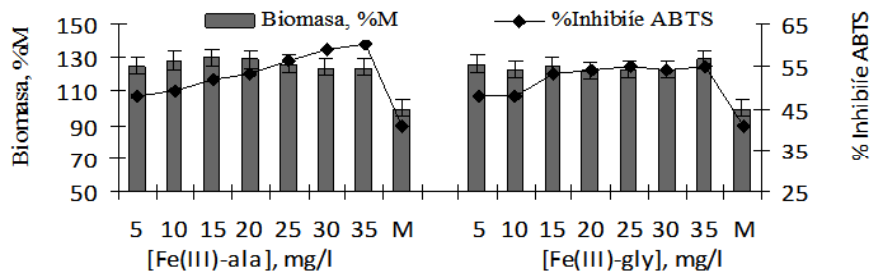


Figura 5. Activitatea antioxidantă (% inhibiție ABTS^{•+}) a extractelor din biomasa de *Porphyridium*, obținută pe medii cu adaos de alaninat și glicinat de Fe(III).

Activitatea antioxidantă a extractelor hidroetanolice din biomasa de *Porphyridium*, obținută pe medii cu adaos de alaninat și glicinat de fier este semnificativ mai înaltă față de cea a extractele obținute din biomasa standard. La concentrații mari (30-35mg/l) de [Fe(III)-ala] se obține o activitate de 1,5 ori mai înaltă decât în proba martor.

La utilizarea compusului glicinat de Fe(III), sporul maximal al activității antioxidante a fost cel de 37,5% față de proba martor. Ca și în cazul testului precedent, în cazul testului de inhibare a radicalului cation ABTS valorile % de inhibiție în probele experimentale sunt esențial mai mari față de activitatea extractului din biomasa obținută pe mediul standad.

Următoarea figură (figura 6) a inclus rezultatele obținute în cazul suplimentării mediului standard pentru cultivarea *Porphyridium* cu valinat și treoninat de fier.

Activitatea antioxidantă a extractelor hidroetanolice din biomasa de *Porphyridium*, obținută pe medii cu adaos de treoninat și valinat de Fe(III) este semnificativ mai înaltă față de extractele obținute din biomasa standard. În cazul treoninatului de fier se obține o activitate de 2 ori mai înaltă decât în proba martor la concentrațiile mari (25-35mg/l)

ale compusului coordinativ.

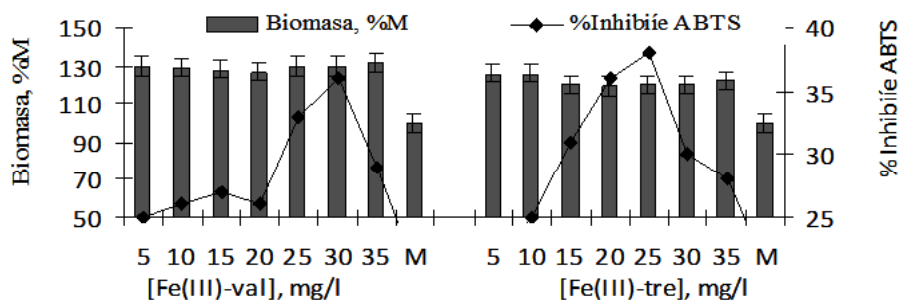


Figura 6. Activitatea antiradicalică (% inhibiție ABTS) a extractelor din biomasa de *Porphyridium*, obținută pe medii cu adaos de valinat și treonat de Fe(III).**

La utilizarea compusului [Fe(III)-val], sporul maximal al activității antioxidante care a fost înregistrat, a depășit cu peste 40 % activitatea antioxidantă în proba martor.

Ca și în cazul testului precedent, la înregistrarea inhibiției radicalului cation ABTS, în probele experimentale valorile antioxidante sunt esențial mai mari față de activitatea extractului din biomasa obținută pe mediul standad.

Prin urmare, biomasa microalgei *Porphyridium cruentum*, îmbogățită cu bioelemente, reprezintă o activitate antioxidantă sporită.

Rezultatele prezentate în acest articol au servit ca bază pentru deducerea următoarelor concluzii:

1. Compușii coordinativi ai Fe(III) cu alanina, glicina, valina și treonina se manifestă ca stimulatori ai procesului productiv la microalga *Porphyridium cruentum*, exprimat prin acumularea activă a biomasei în cultură.

2. *Porphyridium cruentum* acumulează activ Fe(III) în biomasă la cultivarea în prezența compușilor nominalizați, cantitatea metalului fiind, în variantele experimentale, de până la 4,3 ori mai mare față de martor.

3. Creșterea semnificativă a activității antioxidante a biomasei fiercomponente de *Porphyridium cruentum* indică asupra faptului, că compușii fierului sunt inductori ai unui stres oxidativ de intensitate moderată.

4. Suplimentarea mediului nutritiv pentru cultivarea *Porphyridium cruentum* cu compușii coordinativi nominalizați permite obținerea biomasei fiercomponente cu activitatea antioxidantă înaltă.

Bibliografie:

1. Buleandră M. Aspecte privind interacția dintre cationii metalici și moleculele organice de interes biologic. // București, România, 1995, p.237.

2. Cepoi L. Particularitățile fiziologo-biochimice de cultivare a algei roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01 – sursă de substanțe bioactive. // Autoref. tezei de doctor în științe biologice, 1995, 21 p.

3. Kirk E. Commercial developments in microalgal biotechnology. // Journal of Phycology, 1999, vol. 35, p. 215-226.

4. Miscu V. Acumularea astaxantinei în biomasa *Haematococcus pluvialis* la cultivare pe mediu cu compuși coordinativi ai Fe(III) cu aminoacizii. // Buletinul AȘM. Științele vieții, 2009, nr.3(309), p.143-150.

5. Molina Grima E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and

economics. // Biotechnology Advances, 2003, vol. 20, p. 491-515.

6. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. // J. Sci. Technol., 2004, vol.2, p. 211-219.

7. Plaza M., et al. In the search of new functional food ingredients from algae. // Trends in Food Science & Technology, 2008, vol. 19, p. 31-39.

8. Re R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. // Free Radical Biology & Medicine, 1999, vol. 26, nr. 9/10, p. 1231-1237.

9. Reboloso-Fuentes M., et al. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. // Food Chemistry, 2000, vol.70, p. 345-353.

10. Rosakis A. Molecular insight into transition metaltransport in the green microalga *Chlamidomonas reinhardtii*. // A dissertation Doctor of Natural Sciences presented Dipl. Biol., University of Konstanz Zurich, 2004.

11. Rudic, V., Cepoi, L. Mediul e cultivare pentru alga roșie *Porphyridium cruentum*. Brevet MD Nr.690 În: BOPI, 1997, nr.3, p.17.

12. Weiss J., Landauer M. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. // Toxicology, 2003, vol. 89, p. 1-20.

13. Zosim L. Elaborarea procedurii de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de fier ca parte componentă efectivă. // Studia Universitatis, seria "Științe naturale", 2007, nr. 1, p. 125-128.