PROCEDEE DE OBŢINERE A BIOMASEI DE SPIRULINA PLATENSIS CU UN CONŢINUT SPORIT DE FICOBILIPROTEINE







acad. Valeriu RUDIC, directorul Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM

drd. Ludmila BATÎR, Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM

membru cor., prof. univ. Aurelian GULEA, şef catedră Chimie Anorganică şi Fizică, USM

Biomasa de Spirulina platensis cu un conţinut sporit de ficobiliproteine poate servi drept sursă de substanţe bioactive utilizate pe larg în industria farmaceutică, cosmetologie, medicina clinică şi experimentală.

Ficobiliproteinele sunt substanţe ce conţin grupuri proteice din lanţuri tetrapirolice deschise, numite biline, legate de reziduurile specifice de cisteine în apoproteine. Ele acţionează ca pigmenţi fotosintetici, iar proprietăţile lor de absorbţie le împarte în trei clase principale: ficoeritrine, ficocianine şi aloficocianine. De asemenea, ficobiliproteinele sunt utilizate ca marcheri fluorescenţi în celule şi macromolecule [1, 2].

Una dintre cele mai promiţătoare microalge care poate fi utilizată ca sursă naturală de vitamine, minerale, pigmenţi antioxidanţi, cum sunt β-carotenul şi ficocianina, tocoferolii şi acidul linolenic, este cianobacteria Spirulina platensis. În dependenţă de condiţiile de cultivare, biomasa de spirulină oferă până la 15% de ficobiliproteine (C-ficocianina şi aloficocianina) [2, 3].

În prezent pigmenţii extraşi din biomasa de spirulină sunt utilizaţi pe larg în calitate de coloranţi naturali pentru aditive alimentare. Pe lângă acest fapt, pigmentul ficocianina posedă proprietăţi anticancer, antioxidante, antivirale, antiinflamatorii şi este capabil de a inhiba procesele de peroxidare a lipidelor prin capturarea radicalilor liberi. De asemenea, ficocianina este un agent puternic imunostimulator, iar extractele bogate în ficocianină, obţinute din biomasa de spirulină, au un rol semnificativ la reducerea viabilităţii celulelor tumorale [3, 4, 5].

Cercetările efectuate în ultimii ani au demonstrat că procesul reglării conținutului de substanțe bioactive în biomasa diverselor cianobacterii şi microalge poate fi dirijat, utilizându-se anumiți agenți de natură fizică şi chimică. Din şirul compuşilor chimici, compuşii coordinativi ai metalelor constituie un capitol aparte în reglarea creşterii şi dezvoltării microorganismelor, precum şi în stimularea proceselor biosintetice.

Studiul rolului biologic al cuprului prezintă interes atât din punct de vedere structural, cât şi funcțional, deoarece acest element intră în componența unui şir întreg de enzime, influențează procesele de oxidoreducere celulare, are rolul de coenzimă în sistemul enzimatic, intră în componența proteinelor, măreşte acțiunea hipoglicemică a insulinei şi participă în metabolismul fierului [6, 7].

În literatura de specialitate este menționat faptul că compuşii coordinativi ai Cu(II) cu tiosemicarbazone posedă o gamă largă de aplicații biologice, care includ activități antitumorale, antifungice, antivirale, antibacteriene şi antimalariene. în celulele animalelor tiosemicarbazonele exercită o activitate biologică asupra inhibiției enzimei ribonucleotid-reductazei, necesară în sinteza precursorilor ADN. S-a demonstrat, de asemenea, activitatea sporită a complecşilor de Cu(II) şi Fe(II) ce conțin tiosemicarbazone în raport cu compuşii coordinativi ai altor metale [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

A fost dovedit faptul că mai multe linii de celule canceroase, inclusiv celulele umane ale cancerului de prostată, au fost inhibate în cazul în care erau tratate cu o serie de complecşi ai Cu(II) ce conțin în cadrul ligandului grupa fenolică [16] şi tiosemicarbazidică [17, 18].

Având în vedere importanța biologică a complecşilor cuprului, dar şi proprietățile pe care le posedă ficocianina, ne-am propus să studiem influența unor compuşi coordinativi noi ai Cu(II) asupra sintezei principiilor bioactive la cultivarea cianobacteriei Spirulina platensis.

Problema pe care o rezolvă investigațiile efectuate constă în elaborarea a două procedee de cultivare a biomasei de spirulină cu un conținut sporit de ficobiliproteine – sursă de substanțe bioactive utilizate în industria farmaceutică, medicina clinică şi experimentală.

Materiale şi metode de studiu

Obiectul cercetărilor l-a constituit tulpina cianobacteriei Spirulina platensis CNM-CB-02 – o sursă de substanțe bioactive, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene de pe lângă Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM. Cultura de Spirulina platensis CNM-CB-02 a fost cultivată în mediul lichid SP-1 cu o componență echilibrată de macro şi microelemente [19]. În calitate de stimulatori ai procesului de modificare dirijată a conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină au fost utilizați doi compuşi coordinativi noi ai Cu(II), administrați în concentrație de 2-4 mg/l. Cultivarea spirulinei a avut loc în retorte Erlenmeyer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie de spirulină la o temperatură de 30-32°C şi iluminarea de 2000-3000 lucşi în primele 2 zile de cultivare şi 3000-4000 lucşi pentru următoarele zile. Procesul are loc timp de 7 zile.

Conținutul de ficobiliproteine în biomasă a fost determinat prin metoda spectrofotometrică elaborată de Boussiba şi Richmond [20] la lungimile de undă 620 şi 650 nm, în modificația (Rudic, Bulimaga, 1998) [21].

Rezultate şi discuții

În literatura de specialitate este descris un procedeu de cultivare a 18 tulpini de alge şi cianobacterii, inclusiv Spirulina platensis NCCU-S5, cu un conținut de ficobiliproteine de 62,5 mg/g din masa celulară uscată [22]. Acest procedeu constă în creşterea culturii la pH - 8,0, temperatura de 30±1°C, intensitatea luminii 25 µmol photoni/m2/s, în regim de noapte/zi timp de 27 de zile. Durata îndelungată a cultivării, precum şi conținutul scăzut de ficobiliproteine ca parte componentă efectivă constituie un dezavantaj al procedeului dat.

Un alt procedeu cunoscut de obținere a biomasei de Spirulina platensis cu un conținut sporit de ficobiliproteine include următoarele etape: cultivarea spirulinei în mediul nutritiv SP-1, în a treia zi de cultivare în acest mediu adaugându-se unul dintre compuşii coordinativi: azotat de hexa-µ-glicinato(O,O')-µ3-oxotriacvatrifier(III)trihidrat - $[Fe_3O(Gly)_6(H_2O)_3]NO_3 \cdot 3H_2O$, de hexa-µ-treoninato(O,O')- µ3-oxotriacvatrifier(III) - $[Fe_3O(Tre)_6(H_2O)_3]NO_3$ sau de hexa-µ-alaninato(O,O')-µ3-oxotriacvotrifier(III)trihidrat - $[Fe_3O(Gly)_6(H_2O)_3]NO_3 \cdot 4H_2O$ în concentrație de 5-10 mg/l, cultivarea are loc timp de 6 zile, la temperatura de 30-35°C şi iluminarea de 3000-4000 lucşi [23].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că cultivarea spirulinei conform procedeului asigură obținerea unei biomase de spirulină cu un conținut de numai 21,68% de ficobiliproteine ca parte componentă a biomasei.

În urma cercetărilor efectuate asupra conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină, cultivată în prezența unor compuşi coordinativi noi ai Cu(II), putem propune două procedee de obținere a biomasei de spirulină cu un conținut sporit de ficobiliproteine [24, 25]:

Procedeul I:

❖ mediul nutritiv de bază pentru cultivarea tulpinii Spirulina platensis CNM-CB-02 constă din următorul raport al ingredientelor:

– macroelemente (g/l): $NaNO_3$ - 2,25; $NaHCO_3$ - 8,0; NaCl - 1,0; K_2SO_4 - 0,3l; Na_2HPO_4 - 0,20; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,20; $CaCl_2$ - 0,024;

– soluția de microelemente (1ml/l) conține: H_3BO_3 - $2,86 \cdot 10^{-3}$mg/l; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - $1,81 \cdot 10^{-3}$mg/l; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-$8 \cdot 10^{-5}$mg/l; MoO_3 – $1,5 \cdot 10^{-5}$mg/l, suplimentar se adiționează compusul hidratul de 2-{[2-(2-hidroxietilamino)-etilimino]-metil}-benzen-1,4-diolo(2-)cupru în concentrație de 2 mg/l.

Cultivarea are loc conform următorilor parametri: temperatura – 30-32°C, pH= 9,5-10, iluminarea – 2000-3000 lucşi în primele 2 zile ale cultivării şi 3000-4000 lucşi în următoarele zile.

În ziua a 7-a, biomasa se separă de lichidul cultural şi se supune demineralizării de surplusul de săruri, în acest scop utilizându-se o soluție de acetat de amoniu de 1,5%, şi se determină conținutul de ficobiliproteine.

Avantajul procedeului constă în majorarea conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină până la 27,11% din BAU.

Procedeul II:

❖ mediul nutritiv de bază pentru cultivarea tulpinii Spirulina platensis CNM-CB-02 constă din următorul raport al ingredientelor:

– macroelemente (g/l): $NaNO_3$ - 2,25; $NaHCO_3$ - 8,0; NaCl - 1,0; K_2SO_4 - 0,3l; Na_2HPO_4 - 0,20; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,20; $CaCl_2$ - 0,024;

– soluția de microelemente (1ml/l) conține: H_3BO_3 - 2,86 mg/l; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ - 1,81 mg/l; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-$8 \cdot 10^{-5}$mg/l; MoO_3 – $1,5 \cdot 10^{-5}$mg/l, compusului i se adiționează suplimentar hidratul nitratului de 5-nitrosalicilidentiosemicarbazido(1-)aquacupru(II) în concentrație de 4 mg/l.

Cultivarea are loc conform următorilor parametri: temperatura – 30-32°C, pH= 9,5-10, iluminarea – 2000-3000 lucşi în primele 2 zile ale cultivării şi 3000-4000 lucşi în următoarele zile.

În ziua a 7-a biomasa se separă de lichidul cultural şi se supune demineralizării de surplusul de săruri, în acest scop utilizându-se o soluție de acetat de amoniu de 1,5%, şi se determină conținutul de ficobiliproteine.

Avantajul procedeului constă în majorarea conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină până la 30,33% din BAU.

Schema de realizare a procedeelor de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis în prezența stimulatorilor chimici este prezentată în figura 1.

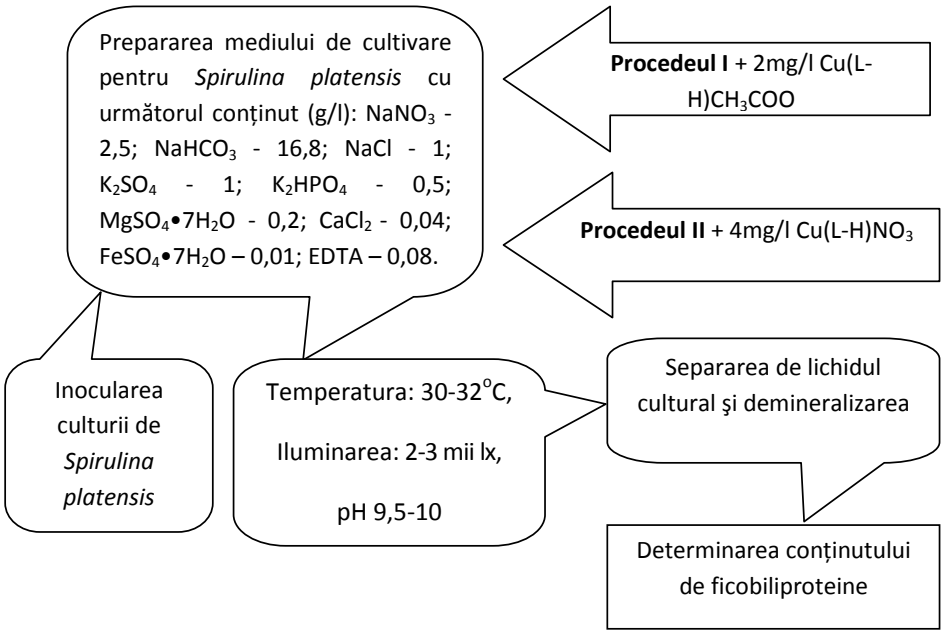


Fig. 1. ***Schema de realizare a procedeelor de obținere a biomasei de spirulină cu un conținut sporit de ficobiliproteine***

În concluzie, putem afirma că au fost elaborate două procedee de obținere a biomasei de spirulină cu un conținut sporit de ficobiliproteine – sursă importantă de substanțe bioactive utilizate în industria farmaceutică, medicina clinică şi experimentală.

Bibliografie

1. BERMEJO, R., FELIPE, M.A., TALAVERA, E.M., ALVAREZ-PEZ, J.M. *Expanded Bed Adsorption Chromatography for Recovery of Phycocyanins from the Microalga Spirulina platensis.* In: Chromatographia, 2006, vol. 63, Nr. 1/2, p. 59-66
2. ERIKSEN, Niels T. *Production of phycocyanin–a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine.* In: Appl Microbiol Biotechnol, 2008, vol. 80, p. 1–14
3. HANAA, H. Abd El-Baky. *Over Production of Phycocyanin Pigment in Blue Green Alga Spirulina sp. and It's Inhibitory Effect on Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.* In: J. Med. Sci., 2003, vol. 3, nr. 4, p. 314-324
4. PINERO, Estrada J., BERMEJO, Besco P., VILLAR DEL FRESNO, A. *Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protean extract.* In: IL Farmaco, 2001, vol. 56, p. 497-500
5. ZHOU, Z., LIU, L., CHEN, X., et al. *Factors that effect antioxidant activity of c-phycocyanins from Spirulina platensis.* In: J. Food. Biochem., 2005, vol. 29, p. 313-322
6. NALIMOVA, A., POPOVA, V., TSOGLIN, L., PRONINA, N. *The effects of copper and zinc on Spirulina platensis growth and heavy metal accumulation in its cells.* In: Rus J of Plant Physiology, 2005, vol.52, nr.2, p. 229-234
7. BERTA DE LA CERDA, CASTIELLI, O. *A proteomic approach to iron and copper homeostasis in cyanobacteria*. In: Briefings in Functional Genomics, 2008, Vol. 9, Nr. 2
8. MUHAMMAD, T., MAQSOOD, A.A *Comparative Study of Anti-Inflammatory Activity of Diflunisal and its Copper Complex.* In: Internat. J. of Agricult & Biology, 2003, Vol. 5, Nr. 1, p. 1-3
9. GULEA, A., POIRIER, D., PAHONȚU, E.-M., ȚAPCOV, V., BEJENARI, N., ROY, J. *Inhibitori ai leucemiei mieloide umane în baza compuşilor coordinativi ai Cu(II) cu saliciliden-tiosemicarbazide.* // Brevet de invenție MD nr. 3890, 2009, BOPI nr. 4/2009, p. 35
10. GULEA, A., ROŞU, T., COTOVAIA, A., DONALD, P., JENNY, R., ȚAPCOV, V. *Inhibitor al leucemiei mieloide umane în bază de bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.2,7/tridecan-13-ontiosemicarbazonato)cupru.* // Brevet de invenție MD nr. 3655, BOPI nr. 7/2008, p. 36-37
11. ROSU, T., PASCULESCU, S., LAZAR, V., CHIFIRIUC, C., CERNAT, R. *Copper(II) complexes with ligands derived from 4-amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one: synthesis and biological activity.* In: Molecules, 2006, Vol. 11, p. 904-914
12. ROŞU, T., GULEA, A., NICOLAE, A., GEORGESCU, R. *Complexes of 3dn Metal Ions with Thiosemicarbazones: Synthesis and Antimicrobial Activity* // Molecules, 2007, 12, p. 782-796
13. ANTHONY, E.L., DOUGLAS, X.W. *Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status.* In: BioMetals, 1992, vol. 5, p. 121-126
14. GULEA, A., POIRIER, D., DONALD, ROY, J., TSAPKOV, V. *Dihydrate of di(μ-Ophenoxy) di[N-(2oxy-1-benzal)-N1-α-oxyfuralhydrazine(2-) copper] with properties of inhibitor of the human myeloid leukaemia //* Brevet de invenție MD 3098, BOPI nr. 7/2006, p. 28-29
15. DEVEREUX, M., MCCANN, M., O'SHEA, D., et al. *Synthesis, Superoxide Dismutase Mimetic and Anticancer Activities of Metal Complexes of 2,2-Dimethylpentanedioic Acid(2dmepdaH2) and 3,3-Dimethylpentanedioic acid(3dmepdaH2): X-Ray Crystal Structures of [Cu(3dmepda)(bipy)]2•6H2O and [Cu(2dmepda)(bipy)(EtOH)]2•4EtOH (bipy=2,2 Bipyridine).* In: Bioinorganic Chemistry and Applications, 2006, p. 1-11

16. HINDO, SARMAD S., FREZZA, M., TOMCO, D., et al. *Metals in anticancer therapy: Copper(II) complexes as inhibitors of the 20S proteasome.* In: European Journal of Medicinal Chemistry, 2009, Vol. 44, Nr. 11, p. 4353-4361;

17. GULEA, A., POIRIER, D., ROY, J., STAVILA, V., BULIMESTRU, I., TSAPCOV, V., BÂRCĂ, M., POPOVSCHI, L. I*n vitro antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes: Chemical synthesis and structure – activity relationships* // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2008; v. 23. nr. 6, pp. 806-818

18. GULEA, A., PRISACARI, V., TSAPKOV, V., BURACHEVA, S., SPYNU, S., BEZHENAR, N., POIRIER, D., ROY, J. *Synthesis and antimicrobial activity of sulfanylamide containing copper (II) and nickel (II) salicyliden thiosemicarbazidates* // Pharmaceutical Chemistry Journal, v. 41. nr. 11, 2007, p. 596-599

19. RUDIC, V. *Aspecte noi ale biotehnologiei,* Chişinău, 1993. 140 p.

20. BOUSSIBA, S., RICHMOND, A. *C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga Spirulina platensis.* In: Arch. Microb., 1980, nr. 125, p. 143-147

21. RUDIC, V., BULIMAGA, V. *Procedeu de obținere a ficocianinei.* Brevet de invenție MD nr. 1008, BOPI nr. 8, 1998, p. 16

22. HEMLATA, TASNEEM FATMA. *Screening of Cyanobacteria for Phycobiliproteins and Effect of Different Environmental Stress on Its Yield.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 83, nr. 4, p. 509-515

23. RUDIC, V., TURTĂ, C., BULIMAGA, V., DENCICOV, L., CHIRIAC, T., LĂZĂRESCU, A. *Procedeu de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis.* Brevet de invenție MD nr. 2386, BOPI nr. 2, 2004

24. BATÎR, L., RUDIC, V., BULIMAGA, V., ZOSIM, L., ELENCIUC, D., GULEA, A., BEJENARI, N., ȚAPCOV, V. *Procedeu de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis.* Brevet de invenție MD nr. 167, BOPI nr. 3/2010

25. GULEA, A., ȚAPCOV, V., GRAUR, V., BATÎR, L., RUDIC, V., BULIMAGA, V. *Hidratul de 2-{[2-(2-hidroxietilamino)-etilimino]-metil}-benzen-1,4-diolo(2-)cupru şi procedeu de cultivare a cianobacteriei Spirulina platensis cu utilizarea acestuia.* Brevet de invenție MD nr. 4026, BOPI nr. 3/2010

REZUMAT

În prezentul articol este descrisă elaborarea a două procedee de obținere a biomasei de spirulină platensis cu un conținut sporit de ficobiliproteine, utilizându-se în calitate de reglatori compuşii coordinativi noi ai Cu(II) cu azometine.

ABSTRACT

The elaboration of two methods for obtaining of spirulina platensis biomass with a high content of phycobiliproteins using as regulators some new coordinative compounds of Cu(II) with azomethines is described in the present article.