STATUTUL ANTIOXIDANT ÎN CORELARE CU COMPONENŢA BIOCHIMICĂ A BIOMASEI UNOR MICROALGE ÎN CONDIŢII DE TEHNOLOGII INTENSIVE

Liliana CEPOI
Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie al Academiei de Ştiinţe a Moldovei, 2028 MD, mun. Chişinău, str.Academiei, 1, tel/fax +373 22 72 57 54, email: liliana.cepoi@imb.asm.md

Abstract. The coordination compounds of Fe (III) with Schiff bases cause the Porphyridium cruentum biomass reduction and Haematococcus pluvialis biomass increasing in case of application of the mentioned compounds in an amount of 20 mg / l. Between antiradical activity of extracts from biomass and the amount of malonic dialdehyde was detected a moderate inverse correlation to Porphyridium cruentum, and a close correlation to Haematococcus pluvialis. The amount of carotenoids in microalgae biomass correlate with antiradical activity of ethanol extracts, being the major components with antiradical effect both in porfiridium and hematococcus biomass.

Cuvinte cheie*:* activitate antiradicalică, Haematococcus pluvialis, Porphyridium cruentum; test ABTS, dialdehidă malonică, carotenoizi

Creşterea populaţiei Terrei, scăderea fertilităţii solurilor arabile, degradarea agroecosistemelor – fenomene ce prezintă o adevărată provocare pentru oamenii de ştiinţă – impun o abordare mai deosebită a problemei asigurării omenirii cu alimente şi materie primă pentru diferite tehnologii de producere. Microalgele, obiecte ce se înscriu în trendul de utilizare a organismelor acvatice în schimbul (sau suplimentar) celor terestre, sunt surse recunoscute de substanţe bioactive, fiind elemente cheie în numeroase lanţuri trofice, dar şi producători de nutrienţi pentru alimentaţia omului. Printre avantajele acestor obiecte se numără randamentul înalt, posibilitatea de a creşte fără utilizarea terenurilor arabile, fixarea unei cantităţi enorme de dioxid de carbon (după unele estimări, aproximativ 1,8 kg CO_2 la 1 kg biomasă microalgală uscată), capacitatea multor specii de microalge de a creşte pe medii ce conţin diferite deşeuri şi ape reziduale, utilizându-le pe acestea în calitate de surse de azot şi fosfor, excluderea utilizării fertilizanţilor tradiţionali şi a pesticidelor, posibilitatea modificării componenţei biochimice a biomasei microalgale prin manipularea condiţiilor de cultivare şi a componenţei mediilor nutritive, precum şi posibilitatea reciclării mediilor şi biomasei reziduale [2-4, 6-9, 13].

Tendinţa de a obţine o cantitate cât mai mare de biomasă cu un nivel tehnologic justificat al componentelor de interes major este absolut firească, în condiţiile cândcultivarea lor în aer liber este destul de dificilă din mai multe motive (aşa ca condiţiile climaterice, pericolul infectării culturilor ş.a.) iar cultivarea în fotobio-

reactoare este una din cele mai energointensive procese. În aceste condiţii rentabilitatea procesului tehnologic este un indicator ce determină succesul producătorului. Pentru întreprinderile biotehnologice mici o soluţie care permite de a spori eficienţa procesului de producere este implementarea tehnologiilor intensive care permit obţinerea a mai multor produse în cadrul unui singur flux tehnologic. Experienţa arată, însă, că intensitatea fluxului tehnologic este invers proporţională cu confortul fiziologic al culturilor implicate. În aceste condiţii, asigurarea siguranţei biomasei ficologice pentru consumul direct ori intermediat uman este primordială. Conţinutul componentelor bioactive în celule ar trebui să se afle într-un echilibru favorabil cu statutul antioxidant al biomasei, astfel ca produsele ficologice să nu prezinte pericol prooxidant pentru utilizatori. Orice modificare a compoziţiei biochimice în procesul de cultivare industrială a microalgelor trebuie sa fie examinată în contextul statutului antioxidant al biomasei.

Materiale şi metode

În calitate de *obiecte de cercetare* au servit: microalga roşie *Porphyridium cruentum (Näg) CNM-AR-01* şi microalga verde *Haematococcus pluvialis Flotow* CNM-AV-05 depozitate în Colecţia Naţională de Microorganisme Nepatogene.

Mediul nutritiv mineral VP 2 (Brevet MD Nr. 690) pe care este efectuată creşterea microalgei *P.cruentum* are următoarea componenţă chimică: Macroelemente în g/L – NaCl-7,0; KCl-7,5; $MgSO_3 \cdot 7H_2O$-1,8; $Ca(NO_3) \cdot 4H_2O$-0,15; KBr-0,05; KI-0,05; K_2HPO_4-0,2; Soluţie de microelemente (din care se aplică 1ml/L), ce conţine în mg/L: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$-2,7; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$-0,02; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-0,05; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$-0,3; H_3BO_3-0,6; MoO_3-0,02; $NaVO_3$-0,05 [1].

Cultivarea s-a efectuat cu menţinerea următorilor parametri: pH-ul 6,8-7,2, temperatura de 23-25^{0}C, iluminare de 2000-3000 Lx, agitare lentă periodică. Cantitatea de inoculum a fost de 0,5-0,6 g/L biomasă absolut uscată (BAU). Durata procesului a fost de 14 zile.

Microalga verde *Haematococcus pluvialis Flotow* a fost cultivată pe *mediul mineral lichid RD* [12] cu următoarea componenţă a macroelementelor (g/l): $NaNO_3$ – 0,3; KH_2PO_4 – 0,02; K_2HPO_4-0,08; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; $CaCl_2$ – 0,0474, NaCl – 0,02, şi microelementelor (mg/l): $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,0001; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ –0,0015; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,00008; H_3BO_3 – 0,0003; $(NH_4)_6Mo_{24} \cdot 4H_2O$ –0,0003; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 9,3; $Co(NO_3)_2 \cdot H_2O$ – 0,0002; EDTA –0,0075.

Cultura a fost cultivată în condiţiile de temperatură de 27 ± 1°C, pH 6,8 – 7,0, intensitatea optimă a luminii de 2500-3500 lx. Durata cultivării a fost de 16 zile.

Determinarea capacităţii antiradicalice cu utilizarea radicalului cation $ABTS^{\cdot+}$. Radicalul $ABTS^{\cdot+}$ este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) cu persulfat de potasiu. Se prepară soluţia stoc a reagentul ABTS de 7 mM în apă deionizată. Persulfatul de potasiu se adăugă în concentraţia de 2,45 mM.

Reacţia de formare a radicalului $ABTS^{\cdot+}$ decurge la întuneric, la temperatura camerei cel puţin timp de 12-16 ore. Soluţia de lucru a ABTS se prepară din soluţia stoc de $ABTS^{\cdot+}$, care se dizolvă în etanol sau apă distilată până la stabilizarea absorbanţei de 0,700 ± 0,020 la 734 nm.

Amestecul reagent constă din 0,3 ml probă şi 2,7 ml soluţie $ABTS^{\cdot+}$. Reacţia de decolorare decurge la temperatura camerei timp de 6 minute, iar procentul de inhibiţie se calculează conform ecuaţiei: **% Inhibiţie =($Abs_{t=0} - Abs_{t=6\ min}$)/$Abs_{t=0}$ * 100,** unde $Abs_{t=0min}$ este valoarea extincţiei de 0,700 ± 0,020 la 734 nm a soluţiei $ABTS^{\cdot+}$, $Abs_{t=6\ min}$ este valoarea extincţiei după incubare [12].

Metoda determinării produselor oxidării lipoproteinelor în baza determinării substanţelor reactive ale acidului tiobarbituric [5]. Valoarea gradului de oxidare al lipidelor este determinată prin concentraţia substanţelor reactive ale acidului tiobarbituric (dialdehida malonică). La probele de biomasă se adăugă 1 ml acid tiobarbituric 0,67% şi 1 ml acid tricloracetic 15%, după care probele sunt supuse incubării pentru 1 oră la 95°C. În continuare, probele se răcesc pe gheaţă timp de 5 min şi se centrifughează timp de15 min. la 3000g. Concentraţia dialdehidei malonice se măsoară la 535 nm, iar calculul se efectuează cu utilizarea coeficientului extincţiei molare a complexului dialdehidei malonice calculat la proteina sau % inhibiţie faţă de proba martorului pozitiv.

Au fost utilizate metodele standardizate pentru cercetările ficologice: determinarea spectrofotometrică a biomasei algale; determinarea carotenoizilor [12]. Compuşii coordinativi au fost sintetizaţi de colaboratorii laboratorului Compuşi coordinativi, IC, AŞM, şef Laborator I. Bulhac.

Rezultate şi discuţii

În studiu au fost luaţi 8 compuşi coordinativi ai Fe(III) cu bazele Schiff (notaţi în această lucrare prin abreviaturile [Fe1]; [Fe2];). Fierul este un metal strict necesar culturilor de *Porphyridium cruentum* şi *Haematococcus pluvialis*, fiind demonstrat faptul, că aceste metale pot asigura intensificarea anumitor procese de inportanţă biotehnologică, aşa ca acumularea ficobiliproteinelor în biomasa de porfiridium [12] ori a astaxantinei în cea de hematococ [10].

În acelaşi timp bazele Schiff sunt cunoscute ca produse care induc apoptoza celulară, şi deci ca factori de toxicitate înaltă, iată de ce a fost luată decizia de a utiliza compuşi, care au în componenţa lor aceste elemente în scopul inducerii pe de o parte a proceselor de acumulare a unor componente ale biomasei, iar pe de alta – în scopul intensificării reacţiilor de protecţie antioxidantă.

Pentru ambele microalge au fost aplicate aceleaşi concentraţii a compuşilor – 20 mg/l. Parametrii monitorizaţi în cadrul experienţelor au fost cantitatea de biomasă acumulată, activitatea antiradicalică a extractelor din biomasă, stabilită cu utilizarea testului ABTS, cantitatea de carotenoizi în biomasă, acumularea produselor peroxidării lipidelor (dialdehidei malonice – DAM) în celule. Rezul-

tatele pentru acumularea de biomasă la porfiridium în mediu cu adaos de compuşi coordinativi ai fierului sunt prezentate în figura 1(A). Pentru toţi compuşii se înregistrează o scădere semnificativă a cantităţii de biomasă acumulată la finele ciclului vital al microalgei cu 12-43% faţă de varianta martor. Pentru hematococ, din contra, atât la etapa de celule verzi mobile (fig.1(B)), cat şi la cea de cişti roşii (fig.1(C)) au fost înregistraţi indici de productivitate care depăşesc valorile respective în probele martor cu 18-62%.

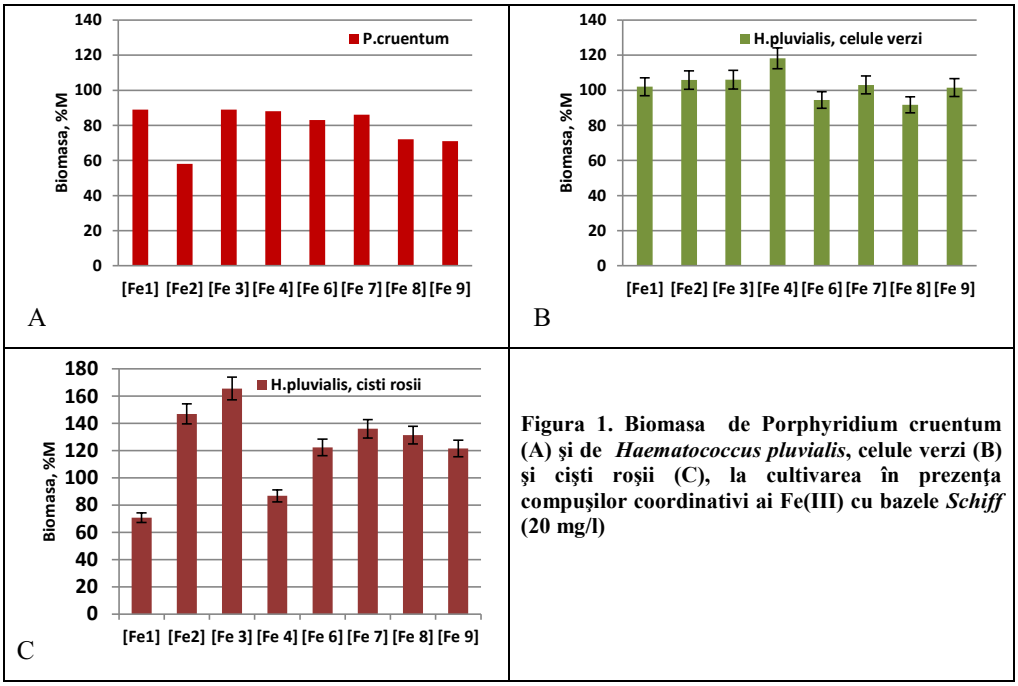
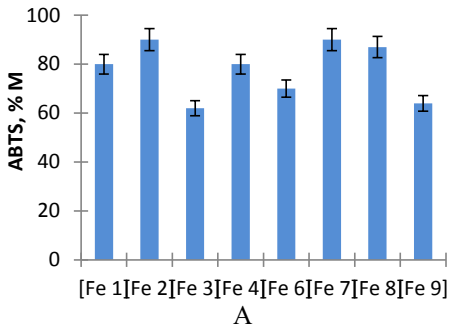
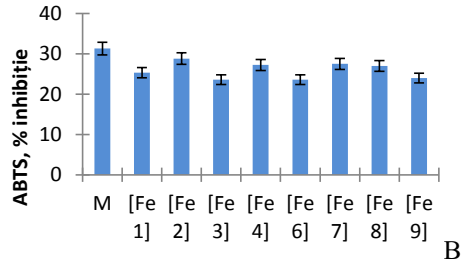


Figura 1. Biomasa de Porphyridium cruentum (A) şi de *Haematococcus pluvialis*, celule verzi (B) şi cişti roşii (C), la cultivarea în prezenţa compuşilor coordinativi ai Fe(III) cu bazele *Schiff* (20 mg/l)

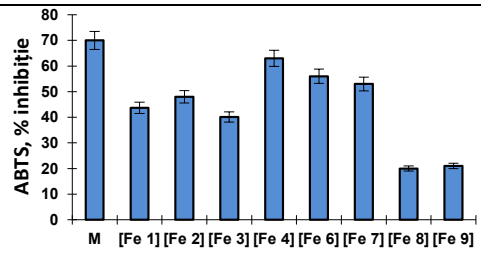
Activitatea antiradicalică a extractelor din biomasa microalgală a fost testată cu aplicarea testului de reducere a radicalului cation ABTS. Rezultatele obţinute pot fi văzute pe figura 2. În cazul microalgei *P. cruentum* (fig.2A) activitatea antiradicalică a extractelor etanolice din biomasă este mai mică, ca cea a extractului din biomasa standard. În cazul microalgei verzi *Haematococcus pluvialis* activitatea antiradicalică a extractelor din biomasă în cazul prezenţei compuşilor fierului de asemenea scade, proces care este mai evident în cişti roşii (fig.2B) decât în celulele verzi mobile (fig.2C). Trebuie sa menţionăm, că scăderea activităţii antiradicalice a extractelor din biomasă este o tendinţă generală, care se dezvoltă atât în condiţii de creştere considerabilă a cantităţii de biomasă, cât şi în condiţii de diminuare vădită a productivităţii.



A



B



C

Figura 2. Activitatea antiradicalică (% inhibiţie radical cation *ABTS*) a extractelor etanolice din biomasa de *Porphyridium cruentum* (A), *Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile (B) şi cişti roşii (C) la cultivare în prezenţa compuşilor Fe(III), 20 mg/l

Statutul antioxidant al biomasei microalgale este determinat nu doar de (şi nu atât de) activitatea antiradicalică şi antioxidantă ca componentelor celulare, cât de echilibrul care se instalează între radicalii liberi şi produsele cu activitate antioxidantă şi antiradicalică. Cuantificarea radicalilor liberi este destul de complicat de realizat din cauza duratei scurte de viaţă a lor şi complexitatea metodelor care urmează a fi aplicate. În schimb, efectele nocive ale acţiunii radicalilor liberi şi produsele formate sunt stabile, şi pot fi determinate prin metode destul de simple. Unul din efectele cele mai evidente ale acţiunii speciilor reactive ale oxigenului este procesul de peroxidare a lipidelor. Cuantificarea dialdehidei malonice este un test recunoscut de apreciere a gradului de deteriorare oxidativă a lipidelor. În experienţele efectuate au fost determinate produsele peroxidării lipidice (dialdehida malonică) şi stabilită relaţia între cantitatea lor şi activitatea antiradicalică a extractelor din biomasă. Rezultatele sunt prezentate în figura 3.

Pentru cultura de *Porphyridium cruentum* (fig.3A) a fost stabilit, că coeficientul de determinare între activitatea antiradicalică şi cantitatea de dialdehidă malonică este de 0,5298, dependenţa fiind inversă. Pentru procesele biologice o asemenea valoare este considerată ca corelare moderată, iar în termeni de explicare a proceselor ce au loc în celule putem afirma, că o intensitate înaltă a

proceselor antiradicalice asigură protecţia celulelor de procesul de peroxidare a lipidelor. În cazul celulelor verzi mobile de *Haematococccus pluvialis* (fig.3B) şi a ciştilor roşii (fig.3C) coeficienţii de determinare între cei doi parametri sunt mult mai înalţi: 0,9467 şi 0,9175 respectiv. Acest rezultat de fapt poate fi considerat previzibil, daca apelăm la rezultatele cu referire la productivitatea de biomasă a culturilor respective. La *H. pluvialis* suprimarea acumulării de biomasă sub influenţa compuşilor fierului se observa doar în 2 cazuri şi doar în ciştii roşii, deci şi presiunea stresului oxidativ este mai mică, pe cand la *P. cruentum* în toate variantele experimentale are loc scăderea biomasei.

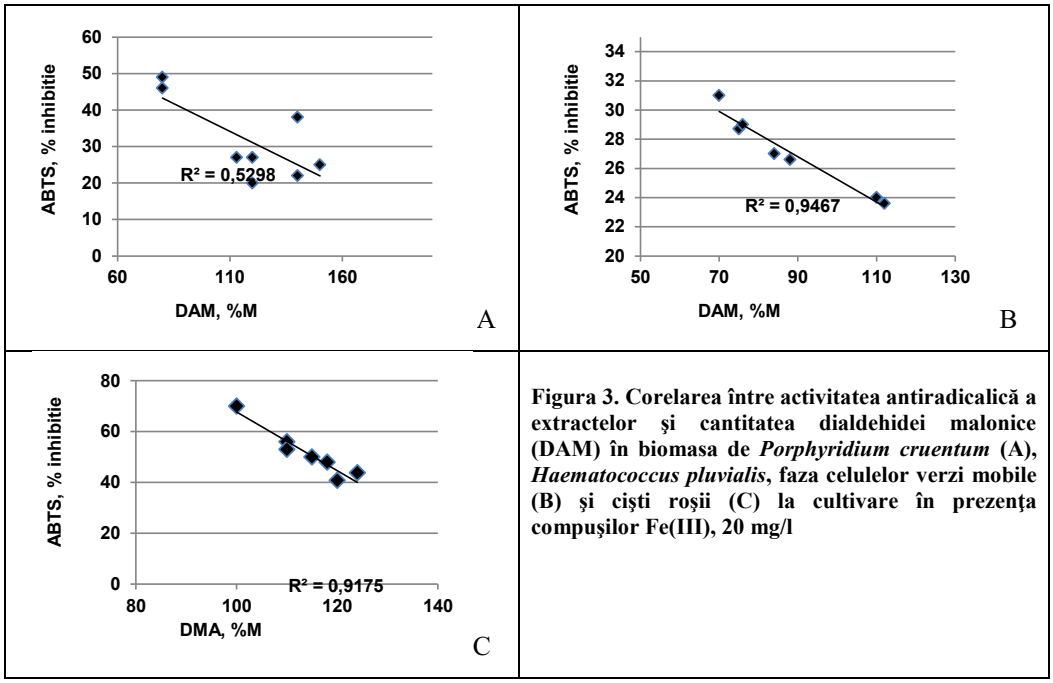


Figura 3. Corelarea între activitatea antiradicalică a extractelor şi cantitatea dialdehidei malonice (DAM) în biomasa de *Porphyridium cruentum* (A), *Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile (B) şi cişti roşii (C) la cultivare în prezenţa compuşilor Fe(III), 20 mg/l

Dintre componentele cu efect antioxidant pronunţat ale biomasei de porfiridium poate fi menţionat carotenul, iar în cazul culturii de hematococ, carotenul în celulele verzi şi astaxantina în ciţtii roşii, care de fapt, şi determină protecţia antioxidantă a celulelor. În figura 4 este ilustrată corelarea între activitatea antiradicalică şi conţinutul de carotenoizi în biomasa microalgelor.

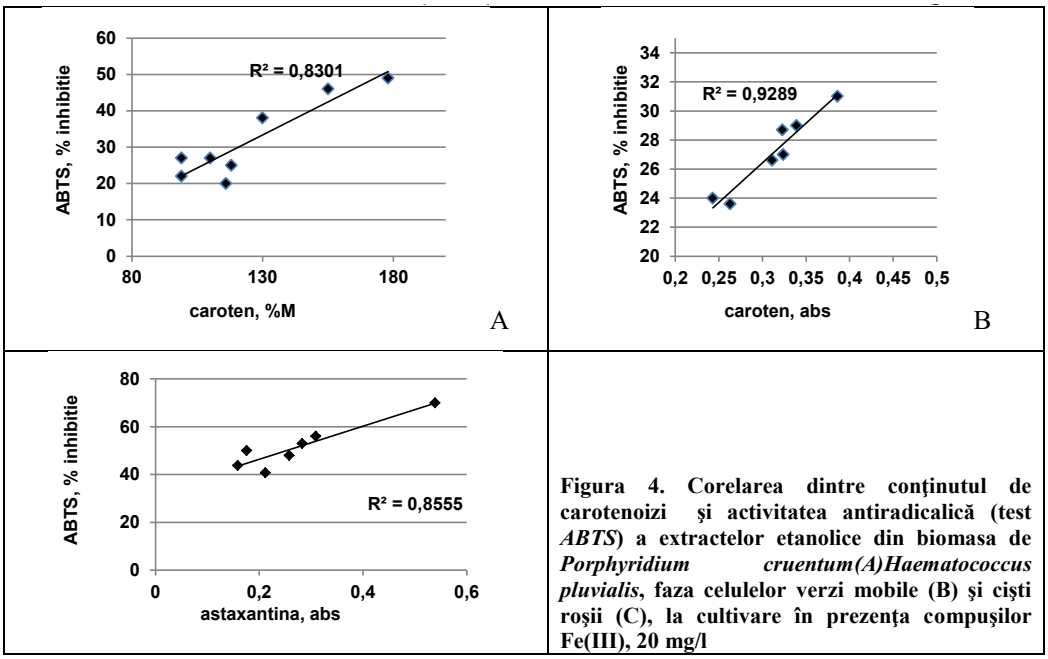


Figura 4. Corelarea dintre conţinutul de carotenoizi şi activitatea antiradicalică (test *ABTS*) a extractelor etanolice din biomasa de *Porphyridium cruentum*(A)*Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile (B) şi cişti roşii (C), la cultivare în prezenţa compuşilor Fe(III), 20 mg/l

În toate tipurile de biomasă studiate, corelarea între activitatea antiradicalică a extractelor etanolice şi conţinutul de carotenoizi în biomasă este semnificativă. Putem afirma, că în mare măsură protecţia antioxidantă în celulele de porfiridium şi hematococ supuse stresului oxidativ prin influenţa compuşilor coordinativi, este asigurată de carotenoizii prezenţi în biomasă (β-caroten în porfiridium şi celulele verzi de hematococ şi astaxantină în cişti rosii de hematococ).

Astfel, modificările ce se înregistrează în biomasa microalgelor în condiţii de stres oxidativ sunt în corelare strânsă cu procesele antioxidante ce au loc în celule. Pentru siguranţa produselor ficologice este important de a evita acumularea radicalilor liberi şi a produselor peroxidării lipidelor. Datorită corelării inverse dintre activitatea antiradicalică a biomasei şi procesele de peroxidare, putem selecta ca optimale acele condiţii tehnologice, care asigură un confort fiziologic şi un statut antioxidant favorabil pentru culturile de microalge. În cazul culturilor de *Haematococccus pluvialis* şi *Porphyridium cruentum* aceste condiţii se asociază şi cu acumularea intensă a carotenoizilor, ceea ce este şi foarte convenabil din punct de vedere economic.

Bibliografie

1. Brevet de invenţie 690 G2 690. Mediu pentru cultivarea algei roşii Prophyridium cruentum (variantele lui). / Cepoi Liliana, Valeriu Rudic. Data publicării 30.06.1995. BOPI nr.6/1995

2. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. In: Biotechnol. Adv. 2007, vol. 25, p. 294–306.
3. Curtain C.C. The growth of Australian's algal b-carotene industry. In: J. Aust. Biotechnol. Assoc. 2000, vol. 10, p. 19–23.
4. Donohue T, Cogdell R. Microorganisms and clean energy. In: Nat. Rev. Microbiol. 2011, nr.4, p.800
5. Hodges D.M. et al. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. In: Planta, 1999, vol. 207, p.604-611.
6. Hu M.C., Phillips F. Technological evolution and interdependence in China's emerging biofuel industry In: Techological Forecasting&Social Change. 2011, vol. 78, p. 1130-1146.
7. Hu Q. et al. Microalgal triacyglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. In: Plant J. 2008, vol. 54, p. 621–639.
8. Huntley M.E., Redalje D.G. CO_2 mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal. In: Mitig. Adapt. Strat. Glob. Change. 2007, vol. 12, p. 573–608.
9. Malcata F.X. Microalgae and biofuels: A promising partnership? In: Trends in Biotechnology. 2011, vol. 29, nr. 11, p. 542-549.
10. Miscu V. Biotehnologii de obţinere a preparatelor pe bază de astaxantină din *Haematococcus pluvialis*. Autoref. tezei dr.şt. biologice. Chişinău, 2010, 28p.
11. Re R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: Free Radical Biology & Medicine, 1999, vol.10, p. 1231-1237.
12. Rudic, V. ş.a. Ficobiotehnologie –cercetări fundamentale şi realizări practice. Chişinău: Elena VI, 2007, 362 p.
13. Widjaja A., Chien C. C, Ju Y. H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. In: Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2009, vol. 40, p. 13–20.