PROCEDEE DE OBȚINERE ŞI PURIFICARE A NOILOR PREPARATE ANTIOXIDANTE DE ORIGINE PROTEICĂ DIN BIOMASA CIANOBACTERIEI *SPIRULINA PLATENSIS*

Efremova Nadejda*, Reva Veaceslav*, Bulimaga Valentina*, Gulea Aurelian, Chiriac Tatiana***, Rudic Valeriu*****

**Centrul de Cercetări Ştiinţifice „Ştiinţe ale vieţii", USM*
***Catedra Chimie anorganică şi fizică, USM*
****Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM*

Introducere

Elucidarea rolului diferitor forme de radicali liberi în apariţia şi evoluţia unor maladii cronice este comparabilă cu stabilirea rolului microorganismelor ca agenţi patogeni ai bolilor infecţioase [3, 18, 22, 24]. În caz de dezechilibru între formarea de radicali liberi şi sistemul de protecţie antioxidantă, în celule apare stresul oxidativ, considerat cauza apariţiei şi evoluţiei diferitor maladii [20,24,25,27,32,33,35,36].

Astfel, în ultimele decenii s-a intensificat interesul cercetărilor faţă de antioxidanţi, – principii active funcţionale responsabile de neutralizarea efectelor negative ale stresului oxidativ asupra organismelor vii [1-2, 8, 17]. În vederea obţinerii antioxidanţilor naturali, sunt explorate materiile vegetale, dintre care unei valorificări tot mai intense sunt supuse cianobacteriile şi microalgele. Este de menţionat şi faptul că antioxidanţii obţinuţi din surse naturale, precum este biomasa de cianobacterii şi microalge, sunt mai eficienţi în comparaţie cu antioxidanţii sintetizaţi pe cale chimică [28].

Cianobacteria *Spirulina platensis* poate fi considerată drept o sursă valoroasă de antioxidanţi, graţie prezenţei în spectrul de compuşi cu activitate biologică înaltă pe care îl oferă a antioxidanţilor de natură proteică (ficocianina – pigment aposolubil, enzimele: superoxiddismutaza, catalaza, peroxidaza, etc.) [18, 31].

Enzima superoxiddismutaza (SOD) este reglatorul principal al proceselor de oxidare în celulă şi poate fi utilizată pentru tratarea diferitor maladii [15, 16]. Ficocianina, un pigment aposolubil denotă capacitatea de a neutraliza radicalul peroxinitrit, hidroxil – şi peroxil, precum şi de a inhiba procesele de oxidare peroxidică a lipidelor, dezvoltând de rând cu mecanismul antioxidant şi proprietăţi antiinflamatoare, imunomodulatoare [6, 7, 9].

Preparatele antioxidante pe baza substanţelor bioactive ale spirulinei pot fi utilizate şi în cosmetologie în calitate de remedii de încetinire a proceselor de îmbătrânire a pielii datorită capacităţii de reglare a sintezei colagenului şi elastinei, precum şi de vindecare a rănilor, arsurilor şi de reducere a ridurilor [13].

Scopul investigaţiilor a constituit elaborarea procedeelor de obţinere şi purificare a noilor preparate antioxidante de natură proteică din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis.*

Materiale şi metode

Obiectul cercetărilor expuse a fost tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis CNM-CB-02*, depozitată în Colecţia Naţională de Microorganisme Nepatogene de pe lângă Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM.

Biomasa de spirulină – sursă de ficocianină şi SOD a fost obținută conform a două procedee, care au inclus cultivarea spirulinei în decursul a 144 ore pe mediul nutritiv *SP - 1* în baloane Erlenmeyer cu volumul suspensiei de 100 ml, cu suplimentarea în a 3-a zi a unuia din compuşi coordinativi ai Mn(II): $[Mn(COO(CHOH)_2COO)(C_3N_2H_4)_2(H_2O)_2]\bullet nH_2O$ sau Zn(II): $[Zn(COO(CH_2)_4COO)_2(C_3N_2H_4)_2(H_2O)_2]\bullet nH_2O$. Pe parcursul cultivării s-au respectat parametrii: temperatura de 30^0C, iluminarea de 2000-3000 lucşi.

Determinarea activității superoxiddismutazei a fost efectuată conform metodei spectrofotometrice [10]. Conținutul de ficocianină în biomasa spirulinei a fost determinat prin metoda spectrofotometrică [11]. Conținutul de proteină a fost apreciat conform metodei propuse de Lowry O. et al. [23]. Electroforeza în gel de poliacrilamidă în prezența SDS a fost efectuată conform metodelor, descrise de Laemmli U. [21]. Chromatografia de schimb ionic (pe coloana de Q – Sepharose) a fost realizată conform metodei [30].

Rezultate şi discuții

Menținerea unui nivel anumit al oxidării radicallibere a acililor fosfolipidelor membranelor biologice este una din condițiile de bază ale homeostazei celulare. Activarea oxidării peroxidice a lipidelor membranelor biologice în condițiile stresului oxidativ poate fi micşorată sub acțiunea diverselor substanțe bioactive. În acest aspect, biomasa de spirulină se impune şi ca una din sursele non convenționale importante de substanțe cu rol de atenuare, împiedicare şi reducere a proceselor de oxidare peroxidică, grație faptului, că o mare parte din componentele bioactive ale biomasei de spirulină denotă o activitate antioxidantă. Printre acestea sunt: ficocianina şi una din enzimele antioxidante principale – superoxiddismutaza. Biomasa de spirulină oferă circa 5% de ficocianină, iar activitatea superoxidismutazei este de circa 0,2-0,3 un. conv. Conținutul de ficocianină în biomasa de spirulină poate fi majorat, iar activitatea superoxiddismutazei poate fi intensificată prin utilizarea de noi stimulenți, precum şi prin stabilirea condițiilor optime de producere a lor în condiții dirijate.

Procedeele elaborate de noi la cultivarea dirijată a spirulinei asigură sporirea conținutului de ficocianină (până la 9,08 şi 13,01 %, respectiv), precum şi intensificarea activității superoxiddismutazei (până la 0,63 şi 0,53 un. conv. , respectiv) în biomasă. Biomasa de spirulină obținută conform acestor procedee a fost procesată în continuare pentru obținerea a 2 noi preparate antioxidante de natură proteică care includ separarea biomasei de spirulină de lichidul cultural; distrugerea celulelor prin congelare – decongelare repetată; extragerea fracției proteice ce conține SOD şi ficocianină cu utilizarea a tamponului fosfatic 0,1M Na, pH 7,8-8,0 (ce conține 10mM EDTA)**;** centrifugarea fracției obținute şi separarea supernatantului; precipitarea izoelectrică (pH 3,8 - 4. 0)**;** separarea supernatantului cu conținut de antioxidanți de natură proteică (SOD şi ficocianină)**;** concentrarea şi congelarea preparatelor antioxidante obținute - *"SP - SOD/Phyco - 1*" şi *"SP - SOD/Phyco - 2"*.

Compoziția preparatelor elaborate a fost stabilită prin electroforeza în gel de poliacrilamidă în prezența SDS, electroforegrama fiind prezentată în figura 1.

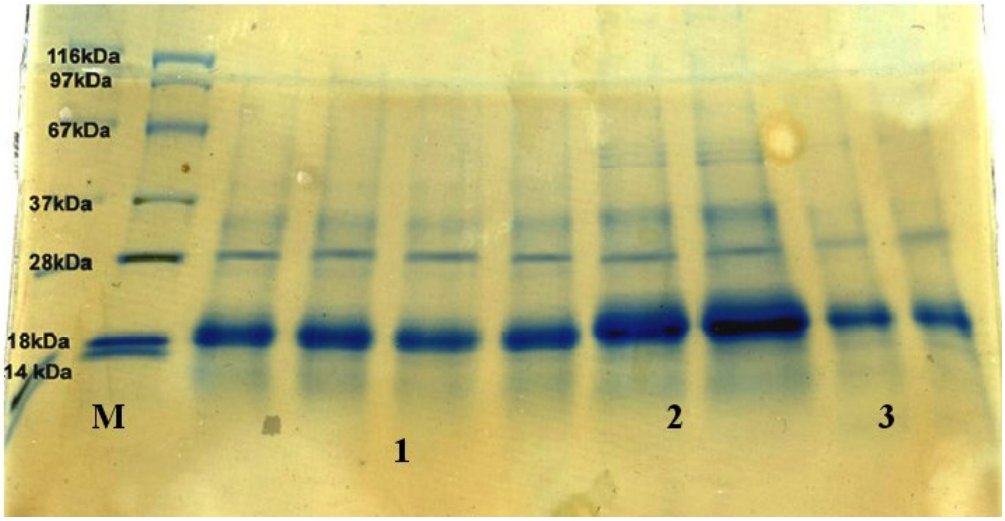


Figura 1. Electroforegrama preparatelor antioxidante obținute din biomasa de spirulină. M – marcheri proteici; 1 –proba preparatului "SP - SOD/Phyco - 1"; 2 – proba preparatului "SP - SOD/Phyco - 2"; 3– proba martor.

Se ştie că ficocianina prezintă un dimer, ce disociază în condiţiile de SDS electroforeză în α - şi β – subunităţi [26, 31]. Conform electroforegramei, masele moleculare ale subunităţilor ficocianinei sunt 18 şi 19,95 kDa, respectiv. Aceste date sunt comparabile cu unele date de specialitate cunoscute, conform cărora masa moleculară a subunităţilor ficocianinei extrase din biomasa de spirulină sunt de 19,5 şi 21 kDa [26].

Din studii anterioare, este cunoscut că masa moleculară a diferitor tipuri de superoxiddismutază la cianobacterii variază în limitele 30 – 46 kDa [4, 14, 29, 34]. În biomasa cianobacteriilor se conţine superoxiddismutaza fierocomponentă - FeSOD, care prezintă un homodimer [14]. Masa moleculară aparentă a subunităţilor SOD stabilită de noi este 28 kDa (fig. 1).

Se poate conchide deci, că preparatele antioxidante de natură proteică conţin nu doar SOD şi ficocianină, dar şi alte reziduuri de proteine. Pentru obţinerea unui grad mai înalt de purificare a preparatelor elaborate, a fost efectuată cromatografia de schimb ionic pe coloana de Q - Sepharose (fig. 2).

Conform cromatogramei, în componenţa preparatelor cercetate au fost identificate 6 fracţii proteice, fiind stabilit că SOD se conţine în fracţia 3 (fig. 2). Ficocianina reprezintă un pigment de culoare albastră cu maximumul de absorbţie la lungimea de undă 620nm [5, 6, 9, 12, 31]. Analiza spectrofotometrică la lungimea de undă 620nm, a relevat prezenţa ficocianinei în fracţia 5.

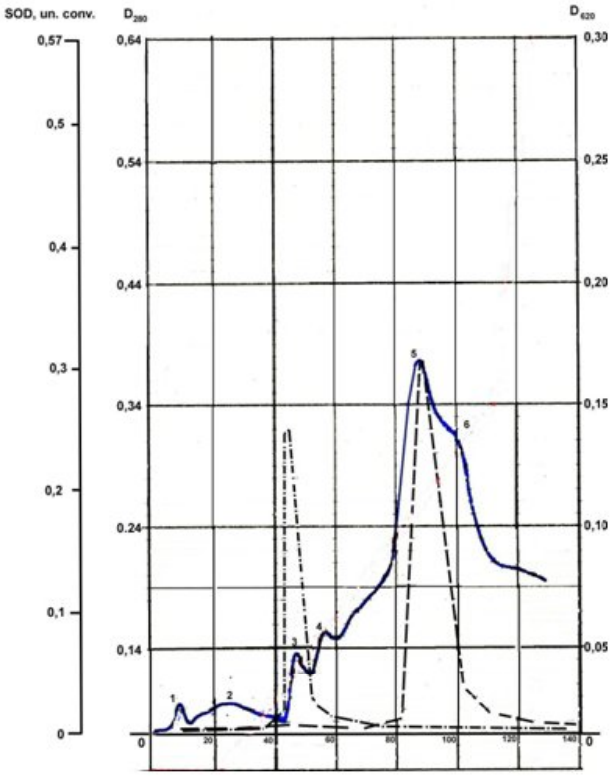


Figura 2. Cromatografia de schimb ionic a preparatelor *"SP – SOD/ Phyco – 1" /"SP – SOD/ Phyco – 2"*

Volumul probei- 5 ml; coloana– Q - Sepharose; viteza– 1 ml/min; soluția tampon A: TRIS - HCl 20mM, pH 8,0; soluția tampon B: NaCl 1M, TRIS - HCl 20 mM, pH 8,0. —— - fracții proteice 1-6; - - - - - - - densitatea optică la lungimea de undă 620 nm; --- - --- - --- - activitatea SOD.

Pentru determinarea tipului de superoxiddismutază, fracția 3 a fost supusă studiilor suplimentare privind efectul inhibitorilor asupra activității SOD. Este cunoscut că Cu/ZnSOD este inhibată de KCN, în timp ce FeSOD şi MnSOD nu sunt sensibile la cianură. Peroxidul de hidrogen este utilizat pentru a distinge FeSOD şi MnSOD [19]. Au fost utilizați următorii inhibitori: H_2O_2, NaN_3 şi KCN (tabelul 1).

Tabelul 1. Determinarea tipului SOD

Inhibitorii	Activitatea SOD
50 мМ KCN	+
10 мМ H_2O_2	–
30 мМ NaN_3	–

Astfel, activitatea SOD de 100% nu s-a diminuat în prezența KCN, iar la utilizarea H_2O_2 şi NaN_3, activitatea enzimei a fost supusă inhibiției complete. În baza rezultatelor se poate presupune deci, că preparatele elaborate de noi conțin forma fierocomponentă a superoxiddismutazei (FeSOD). Pentru determinarea omogenității fracțiilor proteice obținute, două din aceste fracții (fr. 3 care posedă activitate SOD şi fr. 5 ce conține ficocianină) au fost supuse SDS-electroforezei în gel de poliacrilamidă (fig. 3).

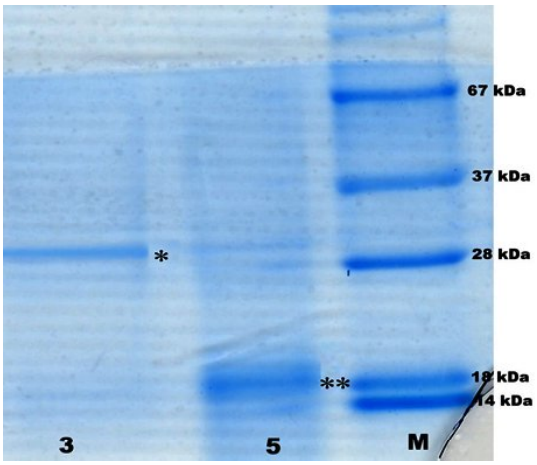


Figura 3. Electroforegrama preparatului antioxidant "SP – SOD/Phyco – 1" /"SP - SOD/Phyco - 2" după etapa purificării prin cromatografie de schimb ionic pe coloana de Q-Sepharose. 3 – fracția 3; 5 –fracția 5; M – marcheri proteici

Electroforegrama fracțiilor proteice purificate confirmă datele obținute anterior, referitor la masele moleculare aparente ale subunităților SOD (28 kDa) şi ale ficocianinei (18 şi 19,95 kDa).

Concluzii:

Procedeele de obținere a preparatelor *"SP - SOD/Phyco - 1" şi "SP - SOD/Phyco - 2"* redau schema integrată de obținere a preparatelor antioxidante noi în baza biomasei de spirulină – sursă de ficocianină şi SOD.

Compoziția preparatelor "SP - SOD/Phyco - 1" şi "SP - SOD/Phyco - 2" se confirmă prin metoda electroforetică în gel de poliacrilamidă în prezența SDS. Banda proteică cu masa moleculară de 28 κDa denotă prezența superoxiddismutazei, iar cele cu masele moleculare de 18 şi 19,95 κDa aparțin ficocianinei.

Referințe

1. *Abd El-Baky H. , Farouk K. , Gamal S.* Production of carotenoids from marine microalgae and its evaluation as safe food colorant and lowering cholesterol agent. // Journal of Agriculture and Environmental Science, 2007, vol. 6, no. 1, p. 792-800.

2. *Aboul-Enein A. , Farouk K. , Gamal S. et. al.* Antioxidant activity of algal extracts on lipid peroxidation. // Journal of Medical Sciences, 2003, vol. 3, no. 1, p. 87-98.

3. *Ames B. , Shigenaga M. , Hagen T.* Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. // Proc. Nat. Sci. 1993, vol. 90, no. 17, p. 7915-7922.

4. *Balakrishnan P. , Jagadeesan P. et. al.* Comparative analysis of cyanobacterial superoxide dismutases to discriminate canonical forms. // BMC Genomics, 2007, no 8, p 435.

5. *Benedetti S. , Benvenuti F.* Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. // Life Sciences, 2004, no. 19, p. 2353-2362.

6. *Bhat V. , Madyastha K. M. C.* Phycocyanin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro. // Biochemical Research Communications, 2000, no. 1, p. 20-25.

7. *Bhat V. , Madyastha K.* Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*. // Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, no. 2, p. 262 -266.

8. *Blinkova L. Gorobets O. , Baturo A.* Biological activity of Spirulina. // J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol, 2001, no. 2, p. 114-118.

9. Boussiba S. , Richmond A. C-phycocyanin of the blue-green algae *Spirulina platensis*. // Arch. Microbiol. 1998, vol. 125, no. 2, p. 143-147.

10. Brevet de invenție. 3752 G2, MD, C12N9/02. Metodă de determinare a activității superoxiddismutazei. / Valentina Bulimaga, Nadejda Efremova, Lidia Dencicov (MD). Cererea depusă 28. 03. 2008, BOPI nr 11/2008.

11. Brevet de invenție. 3781 MD, C12N1/12. Procedeu de obținere a preparatului antioxidant termostabil din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis. /* Valeriu Rudic, Valentina Bulimaga, Nadejda Efremova (MD). Cererea depusă 18. 03. 2008, BOPI nr. 12/2008.

12. Campanella L. , Crescentini P. , Angiello L. Simple procedure for analyzing for phycocyanin *Spirulina platensis* algae using LPLC and HPLC. // Annali di Chemica, 2000, vol. 90, p. 153-161.

13. Dal Farra C. , Antipois S. , Imbert I. Protection of the skin from glycation stress with a new antioxidant dimmer peptide. // J. of the Acad. of Dermat. , 2008, no. 2, p. 20.

14. Desai K. , Sivakami S. Purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from the soluble fraction of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. // World Journal Microbiology Biotehnology, 2007, vol. 23, no. 11, p. 1661-1666.

15. Esco R. , Valencia J. , Coronel P. et. al. Efficacy of orgotein in prevention of late side effects of pelvic irradiation. // International journal of radiation, oncology, 2004, vol. 60, no. 4, p. 1211-1219.

16. Escribano A. , Garcia-Grande A. , Montanes P. et. al. Aerosol orgotein for the prevention of radiotherapy - induced adverse effects in head and neck cancer patients. // Neoplasma journal, 2002, no. 3, p. 201-208.

17. Estrada P. , Bermejo Bescós P. and Villar Del Fresno A. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extracts. // Farmaco, 2001, vol. 56, no. 5, p. 497-500.

18. Flora S. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. // Cell Molecular Biology, 2007, vol. 53, no. 1, p. 1-2.

19. Hammouda O. Purification and Identification of the type of superoxide dismutase from *Gloeocapsa sp*. // Folia Microbiology, 1999, vol. 44, no. 1, p. 32-36.

20. Junqueira V. , Barros S. , Sandra S. Aging and oxidative stress. //Molecular aspects of medicine, 2004, vol. 25, no. 1-2, p. 5-6.

21. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature, 1970, vol. 227, no. 5259, p. 680-685.

22. Lawrence M. Oxyradicals and DNA damage. // Carcinogenesis, 2000, vol. 21, no. 3, p. 361-370.

23. Lowry O. , Rosebrough N. , Farr A. et. al. Protein measurement with the folin phenol reagent. // J. Biology and Chemistry, 1951, vol. 193, no. 1, p. 265-275.

24. Mc Cord J. The evolution of free radicals and oxidative stress. // Am. J. Med. 2000, vol. 108, no. 8, p. 652-659.

25. Meydani S. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. // American journal of clinical nutrition, 1995, no. 6, p. 1462-1476.

26. Minkova K. , Techernov A. , Tchorbadjieva M. et. al. Purification of C - phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira*) *Fusiform*is. // Journal of biotechnology, 2003, vol. 102, no. 1, p. 55-59.

27. Parthasarathy S. Oxidative stress in cardiovascular disease. // Journal of Nuclear Cardiology, 2001, vol. 8, no. 3, p. 379-389.

28. Patra J. , Patra A. , Mahapatra M. et. al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed extract. // Turk. J. Biol. , 2007, vol. 32, no. 2, p. 119-125.

29. Regelsberger G. , Laaha U. , Dietmann D. et. al. The iron superoxide dismutase from the

filamentous cyanobacterium *Nostoc PCC 7120*. // J. of Biol. Chem. , 2004, no. 43, p. 44384-44393.

30. Reva V. , Ciobanu V. , Mueller-Uri F. Strategia şi tactica izolării şi purificării proteinelor. Chişinău, 2001, 186 p.

31. Romay C. , Gonzalez R. , Ledon N. et. al. C-phycocianin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. // Protein and peptide science, 2003, vol. 4, no. 3, p. 207-216.

32. Soundarapandian S. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. // J. Appl. Phycol. 2008, no 3, p. 113-136.

33. Valko M. , Rhodes C. , Moncol J. et. al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. // Chem Biol Interact, 2006, vol. 160, no. 1, p. 1-40.

34. Wolf F. L. The role and evolution SOD in algae. New Jersey, 2006, 132 p.

35. Перехрестенко А. Иммунопатогенез псориатической болезни. // Лікарські справи. Киев, 2000, no. 5, с. 10-14.

36. Сергеев Ю. и др. Атопический дерматит: современная диагностика и лечение. // Иммунопатология, 2001, no. 4, стр. 28-48.

ACUMULAREA ASTAXANTINEI ÎN BIOMASA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* LA CULTIVARE PE MEDIU CU COMPUŞI COORDINATIVI AI Fe(III) CU AMINOACIZII

Miscu Vera

Institutul de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM

Microalgele şi-au ocupat ferm locul în biotehnologia microbiană în calitate de surse de biomasă şi produse specifice. Cele mai recente tehnologii în baza microalgelor sunt cele de producere a astaxantinei – pigment carotenoid important cu aplicare nutraceutică, cosmetică şi în industria alimentară [11-13, 30, 32].

Microalga verde *Haematococcus pluvialis* este considerată superproducător de astaxantină şi se cultivă cu success pe scară industrială în mai multe ţări ale lumii [2, 9, 15, 29, 31]. În celulă acest pigment îndeplineşte funcţia fotoprotectoare, servind în calitate de barieră fizico-chimică, ce previne deteriorarea lipidelor din componenţa membranelor funcţionale şi a ADN-ului de către radicalii liberi [14, 35, 38]. Funcţiile biologice esenţiale ale astaxantinei exercitate în organismul uman şi animal includ protecţia componentelor celulare de procesul de oxidare, formarea răspunsului imun şi reglarea expresiei genelor [29]. Efectul benefic generalizat al astaxantinei este mediat de capacitatea de pătrundere în plasma sangvină şi de mobilitatea moleculelor ei [7, 32].

Carotenogeneza la *Haematococcus pluvialis*, ca şi la toate organismele fotosintezatoare, decurge în mod normal la menţinerea condiţiilor favorabile de dezvoltare. Intensificarea procesului de acumulare a astaxantinei poate fi obţinută prin modificarea condiţiilor de cultivare aşa ca iluminarea intensă, deficitul de nutrienţi, stresul oxidativ şi stresul salin, temperaturile înalte [2, 16, 24, 33].

Acumularea masivă de astaxantină a fost obţinută în cazul cultivării pe mediu cu insuficienţă de azot şi iluminare intensivă - condiţii care facilitează asimilarea carbonului de catre microalgă [10, 21, 25]. Azotul este foarte important în dezvoltarea