

## CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ A PREPARATELOR DE FICOCIANINĂ OBȚINUTE ÎN BAZA BIOMASEI DE SPIRULINĂ ÎMBOGĂȚITE CU GERMANIU

Valentina BULIMAGA, Svetlana DJUR, Maria PISOV, Liudmila RUDI\*, Valeriu RUDIC\*

LCȘ „Ficobiotehnologie”

\*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

The optimal time to harvest spirulina biomass for phycocyanin extraction was established. The phycocyanin yield and purity depend on used extracting solution, recording the maximum values for 1% CaCl<sub>2</sub> solution in 10% alcohol. The testing for antioxidant activity of phycocyanin preparations by ABTS<sup>+</sup> was carried out for both: preparations obtained from spirulina biomass grown on Zarrouk medium, as well as those obtained from biomass cultivated on medium enriched with germanium. The antioxidant activity of containing germanium phycocyanin preparations was the highest.

### Introducere

Studiile privind nutriția umană au scos în evidență că un conținut redus de antioxidanți în alimente duce la stresul oxidativ, în cazul căruia are loc producerea necontrolată de radicali liberi, care cauzează denaturarea proteinelor, lipidelor și acizilor nucleici. Stresul oxidativ este semnificativ în geneza multor patologii [1-2] – de la cancer și până la maladii cardiovasculare și degenerative. În ultimii ani, pentru contracararea efectului nefast al radicalilor liberi asupra organismului este propusă utilizarea bioditivelor alimentare cu efect anti-oxidant. Antioxidanții au capacitatea de a neutraliza radicalii liberi. Activitatea antioxidantă a început să fie subiectul unor cercetări intensive datorită necesităților mereu crescânde ale industriei alimentare și farmaceutice în utilizarea unor compuși bioactivi naturali anticancerigeni și anti-aging, ceea ce demonstrează beneficiile apreciabile ale antioxidanților pentru sănătate [3]. Substanțele antioxidative obținute din astfel de surse naturale, ca semințele oleaginoase, grâne, boboase, legume, fructe și al., au fost studiate mai profund.

În ultimii ani atenția cercetătorilor este orientată tot mai frecvent spre explorarea antioxidanților din cianobacterii și microalge. Unele studii au demonstrat că atât spirulina, cât și extractele obținute din spirulină pot inhiba unele maladii de cancer la oameni și animale și contribuie la fortificarea sistemului imun. Un component valoros al extractelor apoase obținute din spirulină sunt ficobiliproteinele.

Ficobiliproteinele sunt proteine-pigmenți bine solubile în apă, intens colorate în albastru, care au în componența lor catene pirolice deschise, legate covalent cu resturile de cisteină ale catenelor polipeptidice și care sunt pigmenți fotosintetici suplimentari la cianobacterii. Conform datelor din literatură, ficocianina obținută din cianobacterii, inclusiv din *Spirulina spp.*, posedă proprietăți antioxidante datorită prezenței în componența sa a grupărilor tetrapirolice, similare cu bilirubina, bine cunoscută ca un anihilator eficient de diverse specii reactive [4-7]. Potențialul antioxidant al ficocianinei a fost evaluat și de alți cercetători, utilizând ca surse de ficocianină unele specii de cianobacterii marine, astfel ca *Lyngbya* și *Phormidium spp.*, precum și *Spirulina sp.* Autorii propun și mecanismul posibil al acțiunii antioxidante a ficocianinei asupra radicalilor de hidroxil și peroxil, care se datorează prezenței în cromoforul numit ficocianobilină a legăturilor conjugate [5].

În scopul de a proteja organismul de consecințele stresului oxidativ, o cale eficientă poate fi îmbunătățirea nutriției antioxidante. Cercetările științifice efectuate în această direcție au demonstrat că acțiunea sinergetică a unui spectru larg de antioxidanți este mai semnificativă, comparativ cu acțiunea unui singur antioxidant. Antioxidanții din sursele naturale au o bioaccesibilitate mai înaltă și au o eficiență protectivă mai majorată comparativ cu antioxidanții sintetici, inclusiv un efect anticancer pronunțat [8].

Conform datelor obținute la studiul *in vitro*, efectuat de cercetătorii chinezi, Se-ficocianina obținută din biomasa de spirulină îmbogățită cu seleniu manifestă o acțiune antioxidantă înaltă și ea s-a dovedit a fi un agent puternic antiproliferativ asupra celulelor de melanomă umană A375 și adenocarcinomă MCF-7 la ficat uman [9].

S-a stabilit, de asemenea, că și compușii organici ai germaniului au manifestat o capacitate anticancerigenă înaltă la tratarea unor tumori, însă acești compuși în unele cazuri pot avea și efecte adverse asupra organismului. Substituirea compușilor organici ai germaniului sintetizați pe cale chimică cu preparate naturale, obținute în baza biomasei de spirulină, ce conține germaniu organic legat cu componenții bioactivi, inclusiv cu ficocianina, prezintă interes atât din punct de vedere teoretic, cât și aplicativ.

Reieșind din cele expuse, prezintă interes lărgirea spectrului de preparate antioxidante cu acțiune anticancerigenă și antibacteriană, ce au în componența lor ficocianină cu conținut de alte elemente, cum ar fi germaniu. Scopul lucrării a constituit în obținerea preparatelor de ficocianină din biomasa îmbogățită cu germaniu și în determinarea activității lor antioxidante.

### Material și metode

**Obținerea biomasei de spirulină.** Pentru a obține biomasa de spirulină utilizată ca sursă de ficocianină a fost efectuată cultivarea cianobacteriei CNMN-CB-11 pe mediul modificat Zarrouk [10] în decurs de 10 zile, la iluminarea de 2500-3500 lx, la temperatura de 30°C. Biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu și, respectiv, cu germaniu și seleniu a fost obținută la cultivarea spirulinei în aceleași condiții, dar cu suplimentarea la mediul de nutriție în a 3-a zi de cultivare a  $\text{GeS}_2$  în concentrație de 10-15 mg/l. La a 10-a zi de cultivare biomasa a fost filtrată și spălată cu 2-3 volume de sol., 1,5% acetat de amoniu, suspendată în apă (20 mg/ml) și supusă congelării-decongelării repetate pentru distrugerea pereților celulari.

**Determinarea germaniului** a fost efectuată prin reacția spectrofotometrică cu fenilfluoron [11] în proba de biomasă supusă mineralizării prealabile.

Determinarea cantității de ficocianină a fost efectuată după A.Bennett și L.Bogorad [12], utilizând formula de calcul:  $\text{Phyc (mg/ml)} = (E_{620} - 0,434E_{650}) / 5,34$

**Metoda de determinare a activității antioxidante cu radicalul cationic ABTS<sup>+</sup>** Activitatea antioxidantă a extractelor a fost determinată prin metoda de decolorare a radicalului cationic ABTS<sup>+</sup> (2,2 azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) elaborată de Re și al. [13]. ABTS<sup>+</sup> a fost generat prin oxidarea ABTS cu persulfat de potasiu. ABTS în concentrație de 7 mM și persulfatul de potasiu (2,45 mM) au fost dizolvați în apă deionizată. Amestecul reactant se lasă la temperatura camerei pentru 12-16 ore la întuneric până la utilizare. Din soluția de ABTS<sup>+</sup> stoc se diluează cu etanol până la absorbanta  $0,700 \pm 0,020$  la 734 nm. Apoi 1ml soluție diluată de ABTS<sup>+</sup> se amestecă cu 10 mcl de probă testată (1,0 mg/ml) și după 6 min. se măsoară absorbanta la 734 nm. Procentul de inhibiție a absorbantei se calculează conform ecuației:

$$\% \text{ Inhibiție} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=60 \text{ min}}) / \text{Abs}_{t=0} \cdot 100,$$

unde:  $\text{Abs}_{t=0 \text{ min}}$  este valoarea extincției soluției de ABTS<sup>+</sup> și  $\text{Abs}_{t=6 \text{ min}}$  este valoarea extincției soluției ABTS<sup>+</sup> după 6 min. incubare cu probele.

Toate determinările au fost efectuate în 3 repetiții.

### Rezultate și discuții

Cercetarea acțiunii antioxidante a ficocianinei din biomasa de spirulină este precedată de extragerea și fracționarea ei de alți componenți. Conform unor date din literatură, s-a stabilit că randamentul ficocianinei extrase după dezintegrarea biomasei suspendate în lichid cultural este mai diminuat în comparație cu extragerea din biomasa suspendată în  $\text{H}_2\text{O}$  [14]. Aceste rezultate indică la faptul că prezența sărurilor ar putea influența asupra randamentului și purității ficocianinei extrase din biomasă. În această ordine de idei, a prezentat interes studiul influenței demineralizării biomasei obținute asupra cantității și calității ficocianinei. Demineralizarea a fost efectuată prin spălarea biomasei cu soluție de 1,5% acetat de amoniu și  $\text{H}_2\text{O}$  în raport de 1:2.

Conform rezultatelor cercetărilor efectuate anterior, s-a stabilit că puritatea și randamentul ficocianinei depinde de solventul utilizat pentru extragerea ei [15-16]. Pentru a stabili influența sărurilor restante în biomasa de spirulină asupra purității și randamentului ficocianinei, au fost determinați acești parametri pentru ficocianina obținută din biomasa nedemineralizată și cea demineralizată la extragere cu apă, soluție alcoolică de 10%, soluție apoasă de 1%  $\text{CaCl}_2$  și soluție 1%  $\text{CaCl}_2$  în alcool de 10%. Rezultatele obținute (Tab.1) demonstrează că atât randamentul ficocianinei, cât și puritatea ei sunt mai majorate la extragerea din biomasa supusă în prealabil demineralizării. Un randament înalt (23,9-24,8%) se observă pentru toate extracțiile, indiferent de extragentul utilizat, însă cu înregistrarea unei valori maxime a purității ( $A_{620}/A_{280} = 2,70$ ) la extragerea ficocianinei cu soluție de 1%  $\text{CaCl}_2$  în alcool de 10%.

Tabelul 1

**Influența demineralizării biomasei spirulinei asupra purității și randamentului ficocianinei la extragerea ei din biomasa cultivată în condiții industriale**

Proba de extract examinată	Cantitatea de ficocianină, mg/probă	Randamentul ficocianinei, %	Puritatea ficocianinei (A <sub>620</sub> /A <sub>280</sub> )
Din biomasa nedemineralizată:			
a) apos	2,68±0,10	13,4±0,5	1,07±0,04
b) alcoolic (10%)	2,92±0,10	14,6±0,5	1,24±0,05
c) apos (1% CaCl <sub>2</sub> )	3,48±0,12	17,4±0,7	1,70±0,05
d) alcoolic (10%) cu 1% CaCl <sub>2</sub>	3,46±0,12	17,3±0,7	2,25±0,07
Din biomasa demineralizată:			
a) apos	4,94±0,19	24,7±1,0	1,75±0,05
b) alcoolic (10%)	4,96±0,20	24,8±0,9	1,80±0,05
c) apos (1% CaCl <sub>2</sub> )	4,78±0,18	23,9±0,9	2,08±0,06
d) alcoolic (10%) cu 1% CaCl <sub>2</sub>	4,92±0,18	24,6±1,1	2,70±0,08

În scopul stabilirii termenului optim de colectare a biomasei, care asigură valori maxime ale randamentului și purității ficocianinei extrase din biomasa, spirulina a fost supusă cultivării în decurs de 7, 10 și 15 zile. Conform rezultatelor obținute (Tab.2), termenul optim de recoltare a spirulinei ca sursă de ficocianină este la a 10-a zi de cultivare. Totuși, comparând extractul de ficocianină apos și cel alcoolic cu 1% CaCl<sub>2</sub>, s-a stabilit că randamentul și puritatea ficocianinei sunt mai majorate, respectiv, de cca 1,1 și 1,3 ori la extragerea cu soluție de 1% CaCl<sub>2</sub> în alcool de 10%, indiferent de termenul de recoltare a spirulinei.

Tabelul 2

**Influența termenului de cultivare a spirulinei asupra purității și randamentului ficocianinei la extragerea ei din biomasa cu H<sub>2</sub>O și soluție de 1% CaCl<sub>2</sub> în alcool de 10%**

Termenul de cultivare a spirulinei	Biomasa de spirulină, mg/ml	Caracteristica extractului de ficocianină					
		Cantitatea, mg/probă		Randamentul, %		Puritatea (A <sub>620</sub> /A <sub>280</sub> )	
		apos	alcoolic cu CaCl <sub>2</sub>	apos	alcoolic cu CaCl <sub>2</sub>	apos	alcoolic cu CaCl <sub>2</sub>
7 zile	18,5±0,7	3,40±0,1	3,83±0,1	18,32±0,7	20,72±1,1	1,70±0,05	2,20±0,1
10 zile	20,0±0,8	3,91±0,1	4,33±0,1	19,5±0,8	21,60±1,2	1,96±0,06	2,46±0,1
15 zile	20,9±0,8	4,10±0,1	4,24±0,1	19,6±0,7	21,20±1,1	1,80±0,06	2,32±0,1

Preparatele de ficocianină obținute cu diverși solvenți din biomasa cultivată în decurs de 10 zile în condiții standard și cele obținute din biomasa îmbogățită cu germaniu au fost supuse testării pentru a stabili capacitatea lor antioxidantă prin metoda ABTS<sup>+</sup>. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3

**Capacitatea antioxidantă a preparatelor parțial purificate de ficocianină, obținute din biomasa de spirulină, determinată prin metoda ABTS<sup>+</sup> (Abs 734 nm)**

Proba analizată	Conținutul Ge în preparat, mg/g	A734(0) - A734(exp)	% inhibiție
Preparate de ficocianină obținute din biomasa de spirulină cultivată pe mediul Zarrowk			
1. Extract apos	0	0,122±0,005	17,43±0,67
2. Extract cu sol. apoasă 1% CaCl <sub>2</sub>	0	0,095±0,005	13,57±0,38
3. Extract cu sol. 1% CaCl <sub>2</sub> în 10% alcool	0	0,101±0,005	14,43±0,52
Preparate de ficocianină obținute din biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu			
1. Extract apos	0,80±0,02	0,143±0,007	20,43±0,78
2. Extract cu sol. apoasă 1% CaCl <sub>2</sub>	1,14±0,04	0,145±0,007	20,71±0,81
3. Extract cu sol. 1% CaCl <sub>2</sub> în 10% alcool	1,14±0,04	0,146±0,007	20,86±0,67

Datele obținute demonstrează că toate preparatele testate posedă capacitate antioxidantă față de ABTS<sup>+</sup>. Studiul comparativ al capacității antioxidante a extractelor de ficocianină a scos în evidență valori mai înalte ale gradului de inhibiție în cazul extractelor obținute din biomasa îmbogățită cu germaniu (20,43-20,86%), comparativ cu valorile evaluate pentru ficocianina extrasă din biomasa cultivată în condiții standard (13,57-17,43%). Conținutul de germaniu în preparatele de ficocianină este cuprins în limitele 0,8-1,11 mg/g de ficocianină.

Conform unor autori, acțiunea antioxidantă a ficocianinei asupra radicalilor de hidroxil și peroxil se datorează prezenței în ficocianobilină (catena tetrapirolică) a legăturilor conjugate [5]. Nu poate fi exclus și aportul la acest proces a unor resturi aminoacide din catena polipeptidică [17]. A fost demonstrat că extractul apos, bogat în ficocianină, obținut din alga albastră-verzuie *Aphanizomenon flos-aquae*, are abilitatea de a proteja eritrocitele normale umane de deteriorarea oxidativă *in vitro*. Au loc schimbări spectrale ale ficocianinei induse cu AAPH - (2,2'-azobis(2-amidino-propan) dihidroclorid) sau cu CaCl<sub>2</sub>. Incubarea extractului cu agenți oxidanți duce la o diminuare semnificativă a absorbanței la 620 nm și la dispariția rapidă a colorației albastre.

Valori mai înalte ale % de inhibiție, atestate în extractele de ficocianină obținute din biomasa îmbogățită cu germaniu, se pot datora prezenței în componența lor a germaniului organic, care poate fi un antioxidant potențial [18]. Efecte similare au fost observate și în studiul efectuat de cercetătorii chinezi privind activitatea antioxidantă și antiproliferativă a ficocianinei purificate ce conținea seleniu (Se-PC), obținute din *Spirulina platensis* îmbogățită cu seleniu [9]. Activitatea antioxidantă a Se-PC a fost evaluată prin 4 metode: ABTS, DPPH, de anihilare a anionului superoxid și de himoliză a eritrocitelor. Rezultatele au scos în evidență că Se-PC manifestă o activitate antioxidantă mai puternică, comparativ cu ficocianina, în anihilarea radicalilor liberi.

Putem concluziona că toate preparatele de ficocianină testate posedă activitate antioxidantă la determinare prin metoda ABTS<sup>+</sup>, însă cu o prevalare a activității antioxidante a preparatelor de ficocianină îmbogățite cu germaniu (% de inhibiție – 20,43-20,86). Biomasa de spirulină îmbogățită cu germaniu poate fi utilizată în calitate de sursă de Ge-ficocianină cu proprietăți antioxidante și alte efecte curative. Termenul optim de recoltare a spirulinei pentru extragerea ficocianinei este de 10 zile. Extragentul care asigură un randament și o puritate înaltă este soluția de 1% CaCl<sub>2</sub> în alcool de 10%.

### Concluzii

1. A fost stabilit că etapa de demineralizare a biomasei de spirulină contribuie la majorarea purității și a randamentului ficocianinei extrase cu diverși solvenți. Termenul optim de cultivare a spirulinei pentru extragerea ficocianinei este de 10 zile. Extracția ficocianinei cu soluție de 1% CaCl<sub>2</sub> în 10% alcool asigură un randament (24,6%) și o puritate maximă a ficocianinei ( $A_{620}/A_{280}=2,6$ ).

2. Preparatele de ficocianină manifestă capacitate antioxidantă semnificativă la determinare prin reacția cu ABTS<sup>+</sup>, % de inhibiție prevalând în probele de ficocianină obținută din biomasa îmbogățită cu germaniu față de ficocianina obținută din biomasa standard.

### Referințe:

1. Lawler J.M. Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy // J.Physiol, 2011, vol.25(3), p.2161-70.
2. Bennett S., Grant M.M, Aldred S. Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology // J.Alzheimers Dis., 2009, vol.17(2), p.245-57.
3. Balsano C., Alisi A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds // Curr. Pharm. Des., 2009, vol.15(26), p.3063-73.
4. Bhat V.B., Madyastha K.M. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro* // Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, vol.275(1), p.20-25.
5. Patel A., Mishra S., Ghosh P. Antioxidant potential of C-phycoyanin isolated from cyanobacterial species. *Lyngbya, Phormidium and Spirulina spp.* // Indian J. of Biochem. and Biophysics., 2006, vol.43, no.2, p.25-31.
6. Bertolin T.E., Farias D., Guarienti C.F. et al. Antioxidant effect of phycoyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats // Braz. arch. biol. technol., 2011, vol.54, no.4, p.733-738.
7. Bermejo P., Piñero E., Villar Á.M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycoyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis* // Food Chemistry, 2008, vol.110, no.2, p.436-445.

8. Saxena A., Saxena A.K., Singh J., Bhushan S. Natural antioxidants synergistically enhance the anticancer potential of AP9-cd, a novel lignan composition from *Cedrus deodara* in human leukemia HL-60 cells // *Chem. Biol. Interact.*, 2010, vol.188(3), p.580-90.
9. Tian Feng Chen, Yum-Shing Wong. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis* // *J. Agric. Food Romey*, 2008, vol.2008, no.12, p.4352-4358.
10. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. - Chișinău: Știința, 1993.
11. Marczenko Z.; Balcerzak, M. Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis. - E-book type: Imprint: Elsevier, 2000.
12. Bennett A., Bogorad L. Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga // *Journal of cell biology*, 1973, vol.58, p.419-435.
13. Re R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol.10, p.1231-1237.
14. Cisneros M., Rito-Palomares M. A simplified strategy for the release and primary recovery of C-phycocyanin produced by *Spirulina maxima*. // *Chemical and Biochemical Engineering Quaterly*, 2004, vol.18, no.4, p.385-390.
15. Bulimaga V., Djur S., Pisov M. et al. Elaborarea tehnologiilor noi de obținere în baza biomasei de spirulină a preparatelor de ficocianină // Conferința științifică internațională „Biotehnologia microbiologică – domeniu științific contemporan”, Chișinău 6-8 iulie 2011, p.9-10.
16. Bulimaga V., Pisov M. Exploararea biotehnologică a biomasei de spirulină în calitate de sursă de ficocianină – aditiv alimentar și cosmetic // Conferința științifică internațională „Creșterea impactului cercetării și dezvoltarea capacității de inovare”, USM, Chișinău, 21-22 septembrie 2011, p.38-41.
17. Romay Ch. et al. C-phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects // *Current protein and peptide science*, 2003, vol.4, no.3, p.207-216.
18. Wakabayashi Y. Effect of germanium-132 on low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi hypercholesterolemic rabbits. // *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 2001, vol.65, no.8, p.1893-1896.

Prezentat la 03.04.2012