

## PEPTIDE BIOACTIVE ALGALE ȘI PERSPECTIVA DE UTILIZARE A LOR ÎN CALITATE DE AGENȚI TERAPEUTICI

Valentina BULIMAGA, Maria PISOVA, Liliana ZOSIM,  
Angela RUDAKOVA, Natalia CLIMOVA, Veaceslav REVA

Universitatea de Stat din Moldova

Dezvoltarea și aplicarea tehnologiilor de inginerie enzimatică, folosind enzimele pentru hidroliza ficocianinei și producerea peptidelor bioactive, deschide noi perspective de utilizare a lor în calitate de agenți anticancer, antimicrobieni, antioxidativi, antihipertensivi etc. Lărgirea spectrului de peptide produse în baza enzimolizei ficocianinei poate fi efectuată prin utilizarea în acest scop a enzimelor proteolitice cu specificitate diferită. În lucrare sunt analizate spectrele UV ale hidrolizatelor triptice sumare ale ficocianinei și descrise unele metode de separare și analiză a fracțiilor peptidice din hidrolizat.

**Cuvinte-cheie:** peptide bioactive, ficocianina, hidroliză enzimatică, *Spirulina platensis*, gel filtrare.

### ALGAL BIOACTIVE PEPTIDES AND THEIR PERSPECTIVE USE AS THERAPEUTIC AGENTS

Development and application of enzyme engineering technologies using enzymes for the hydrolysis of Phycocyanin and production of bioactive peptides opens up new prospects for their use as anticancer, antimicrobial, antioxidant, hypotensive agents. Diversification of the range of produced peptides can be performed by the enzymolysis and using of the proteolytic enzymes with diverse specificity for this purpose. The paper presents the UV spectra of summary tryptic phycocyanin hydrolysates and some methods of separation and analyzing of peptide fractions.

**Keywords:** bioactive peptides, phycocyanin, enzymatic hydrolysis, *Spirulina platensis*, gel filtration.

### Introducere

În ultimele decenii peptidele sunt pe larg utilizate în calitate de agenți anticancerigeni, antioxidanți, antimicrobieni, antihipertensivi, cito- și imunomodulatorii [2-3,5]. Peptidele bioactive pot fi obținute atât prin sinteză chimică, cât și din surse naturale de origine vegetală și animală. În legătură cu faptul că multe proteine alimentare, inclusiv cazeina, provoacă unele efecte adverse, inclusiv alergii nu doar la copii, dar și la vârstnici, ele sunt substituite de peptide produse prin fermentația proteinelor [11].

Cu toate că multe specii de alge și cianobacterii, în special *Spirulina platensis*, se caracterizează printr-un conținut bogat de proteine, totuși sunt într-un număr limitat cercetările destinate utilizării algelor ca surse de peptide bioactive, obținute prin hidroliza enzimatică a proteinelor.

Este cunoscut că stresul oxidativ este un factor important în geneza multor boli, cum ar fi cancerul, maladiile cardiovasculare și cele degenerative. Utilizarea intensă a medicamentelor sintetice anti-aging (anti-îmbătrânire) poate provoca efecte secundare asupra organismului. Prin urmare, este important de a utiliza antioxidanți și remedii naturale cu efecte benefice asupra organismului. Un rol incontestabil în acest context revine ficocianinei, extrase și purificate din biomasa de spirulină [7,11,11,22,]. Au fost deja efectuate numeroase studii privind activitatea antioxidantă a ficocianinei [4,8,20]. Ea are multe funcții biologice, cum ar fi efect anticancer [6,9,15,28], activitate antibacteriană [22], antimalarie [19] și alte activități [20]. Astfel, cercetările efectuate în ultimul deceniu au scos în evidență că ficocianina poate întârzia senescența, manifestă efect antitumoral și antimicrobian și poate fi utilizată ca remediu natural în profilaxia și tratarea diverselor maladii.

În ultimii ani a sporit interesul cercetătorilor față de proteinele funcționale sau peptidele bioactive din algele marine [13]. Acest fapt se datorează proprietăților lor specifice cu efecte benefice asupra sănătății.

În ce privește strategia de obținere a peptidelor bioactive din proteine algale marine, ea este discutată detaliat de unii autori și este bazată pe hidroliza enzimatică a extractului proteic [21]. Întregul proces include etapele: uscarea biomasei algale, distrugerea pereților celulari, extragerea componentelor solubile intracelulare, tratarea extractului prin hidroliza proteolitică și obținerea hidrolizatului proteic, izolarea și purificarea peptidelor din hidrolizat și determinarea secvenței aminoacide și a masei moleculare ale acestora.

Recent, unii cercetători și-au concentrat eforturile asupra investigării unor noi peptide produse din *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima* și *Chlorella vulgaris*.

Printre primele cercetări referitoare la obținerea unor fracții peptidice prin digestia peptică a proteinelor din *Chlorella vulgaris* și *Spirulina platensis* pot fi menționate cele efectuate de K.Suetsuna și J.R. Chen [26]. Frațiile peptidice au fost purificate prin cromatografie de schimb ionic și gel-filtrare și s-a stabilit efectul lor de inhibare a enzimei de conversie a angiotensinei 1 (ACE). Administrarea orală a fracțiilor peptidice la șobolani hipertensivi în doza de 200 mg / kg de greutate corporală a condus la efecte antihipertensive marcate. Separarea ulterioară a fracțiilor peptidice prin cromatografie HPLC a permis obținerea următoarelor peptide bioactive, derivate de la *Chlorella vulgaris*: Ile-Val-Val-Glu, Ala-Phe-Leu, Phe- Ala-Leu, Ala-Glu-Leu și Val-Val-Pro-Pro-Ala. În cazul hidrolizatului din *Spirulina platensis* au fost identificate peptidele Ile-Ala-Glu, Phe-Ala Leu, Ala-Glu-Leu, Ile-Ala-Pro-Gly și Val-Ala-Phe [26].

Sunt raportate și alte studii referitoare la obținerea peptidelor bioactive prin hidroliza cu pepsină a deșeurilor proteice din biomasa de *Chlorella pyrenoidosa* și stabilită activitatea biologică a peptidelor parțial purificate [25,29]. Purificarea peptidelor din hidrolizat a fost efectuată prin salifierea în două trepte, precum și gel-filtrarea pe SephacrylS-100 cu obținerea a 6 fracții peptidice. Frația B (neadsorbită pe Sephacryl), cu cea mai înaltă activitate anticancer, a fost supusă purificării suplimentare prin cromatografie pe coloanele de Q-sepharose și CM-sepharose CL-6B. La ultima etapă de purificare s-a efectuat eluția peptidelor cu gradient linear de 0-1,0 M NaCl. A fost obținută o fracție peptidică parțial purificată ce manifesta o activitate anti-oxidantă înaltă și un efect inhibitor asupra enzimei de conversie a angiotensinei [25].

A fost cercetat de asemenea și efectul asupra citochininelor la șobolani a peptidelor produse prin hidroliza peptică a proteinei extrase din spirulină. S-a stabilit că peptidele obținute prin hidroliza proteinei din spirulină joacă un rol important în reglementarea funcției imunitare prin controlul nivelului de citokine [29].

Mai este raportat un studiu referitor la izolarea și purificarea unei peptide Ile-Gln-Pro cu activitate inhibitoare asupra enzimei de conversie a angiotensinei I(ACE) cu o valoare IC (50) de  $5,77 \pm 0,09$  microM. Această peptidă a fost obținută prin hidroliza extractului din *Spirulina platensis* cu alcalaza, apoi a fost supusă purificării prin cromatografia de gel-filtrare și cea cu fază inversă HPLC(RP-HPLC) în două etape. Peptida a demonstrat rezistență la digestie *in vitro* cu proteaze gastrointestinale. Administrarea orală a Ile-Gln-Pro într-o doză de 10 mg/kg s-a soldat cu diminuarea semnificativă a ponderii tensiunii arteriale și sistolice (TAS) și diastolice (DBP) la șobolani hipertensivi (SHR) la 4, 6, și 8 ore după tratament. Rezultatele obținute indică asupra faptului că peptida Ile-Gln-Pro din *Spirulina platensis* cu activitate inhibitoare asupra ACE ar putea fi utilizată în prevenirea și tratamentul hipertensiunii [16].

Au fost studiate și proprietățile bioactive ale hidrolizatului extractului brut de spirulină, obținut în rezultatul enzimolizei acestuia cu proteaza SM98011. Extractul de proteină totală din spirulină în soluție tampon fosfat a fost tratat cu proteaza SM98011 la incubare la 50° cu agitare constantă, timp de 5 ore. După stoparea reacției prin incubare la 90° timp de 15 minute s-a efectuat centrifugarea la 10.000xg la 4°, timp de 20 min. Hidrolizatului obținut a manifestat o activitate de anihilare a radicalilor liberi cu mult mai înaltă (SA% =33,28%), comparativ cu proteina netratată enzimatic (SA% =12,15 nmg/ml) [31].

Au fost identificate încă două peptide Lдавnr(P1) și MMLDF(P2) obținute din hidrolizatului enzimatic al proteinei din *Spirulina maxima* și cercetată acțiunea lor antialergică. Rezultatele obținute au permis a concluziona că peptidele P1 și P2 din *S.maxima* pot fi candidați promițători pentru utilizare în terapii antialergice, contribuind la dezvoltarea de noi aditive alimentare bioactive pentru ameliorarea bolilor alergice [27].

O peptidă cu capacitate înaltă de chelatare a fierului a fost purificată din hidrolizatele proteice ale extractului de spirulină. Proteina a fost hidrolizată, folosind două enzime – alcalaza (Alcalase®) și o exopeptidază (Flavourzyme), iar gradul de hidroliză a fost determinat utilizând un test cu acidul trinitrobenzensulfonic și SDS-electroforeza în gel de poli(acrilamidă). Hidrolizatele proteice din spirulină au fost supuse ultrafiltrării pentru a izola componentele sub 3kDa, care au fost apoi fracționate prin cromatografie pe coloanele de Q-Sefaroză și Sephadex G-15. A fost determinată capacitatea de chelatare a fierului a fiecărei fracții obținute, iar peptida cu cea mai înaltă activitate a fost izolată și identificată. Secvența de aminoacizi a peptidei a fost identificată ca fiind Thr-Asp-Pro-Ile (Leu)-Ala-Ala-Cys-Ile (Leu), care are o greutate moleculară de 802 Da. Datorită capacității sale de a lega fierul, peptida izolată poate fi utilizată ca un supliment nutritiv de fier [12].

Pentru a evalua efectele ficocianinei din *S.platensis* și ale hidrolizatelelor sale triptice asupra creșterii celulare și activității Caspazei-3 a celulelor HeLa, au fost efectuate teste cu tetrazoliu galben MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), care este redus de către celulele metabolice active

(MTT), precum și prin metoda ELISA. Rezultatele au scos în evidență că ficocianina purificată și hidrolizatele sale triptice au efecte de inhibare evidente asupra proliferării celulelor HeLa *in vitro*. Ratele de inhibare a ficocianinei și hidrolizatelor sale (100 mg/l) asupra celulelor HeLa sunt 29,2% și 56,5%, respectiv. De asemenea, s-a constatat că activitatea Caspazei-3 a celulelor HeLa tratate cu ficocianină (100 mg/l) după 12 ore crește în mod evident [30].

În urma analizei rezultatelor cercetărilor expuse mai sus se poate constata că din proteinele algale, inclusiv din *Spirulina sp.*, la enzimoliză au fost produse peptide cu un spectru larg de activități biologice. Totodată, în pofida progreselor atinse în cercetarea și identificarea unor peptide bioactive, obținute prin hidroliza extracțelor sumare proteice din spirulină, în prezent sunt în număr foarte redus cercetările referitoare la peptidele bioactive preparate din ficocianină.

Așadar, pentru obținerea și explorarea peptidelor bioactive potențiale la etapele inițiale este necesară facilitarea extracției proteinelor prin distrugerea pereților celulari algali. Acest proces poate fi realizat atât printr-un procedeu asistat de enzime, cât și prin metode mecanice, cum sunt ultrasonicarea, congelarea/ decongelarea suspensiei algale. La rândul lor, peptidele bioactive pot fi obținute din surse alimentare proteice prin trei moduri: (1) hidroliza cu enzime digestive de la animale; (2) hidroliza cu enzime proteolitice recoltate de la microorganisme sau plante și (3) hidroliza cu microorganisme proteolitice în timpul fermentării [13]. Cercetările au demonstrat utilizarea eficientă în acest scop a hidrolizei pentru obținerea peptidelor și din alge brune [10]. Alți factori care determină eficacitatea proteolizei *in vitro* sunt condițiile fizico-chimice selectate pentru fiecare enzimă, cum ar fi valorile optime ale temperaturii și pH-ului [21], precum și durata hidrolizei. Pentru fracționarea hidrolizatelor proteice pot fi utilizate metode de separare a peptidelor în fracții cu mase moleculare diferite, cum ar fi ultrafiltrarea (UF) prin membrane cu diferite dimensiuni ale porilor sau gel-filtrarea, precum și determinarea masei moleculare relative a peptidelor prin metoda electroforetică în gel de poliacrilamidă (SDS-PAGE). Pentru purificarea suplimentară și izolarea unor peptide individuale este utilizată cu succes cromatografia lichidă de înaltă performanță cu fază inversă (RP-HPLC) [16]. Pentru a caracteriza structurile și masele moleculare ale peptidelor bioactive sunt utilizate atât metode contemporane, cum ar fi cromatografia lichidă – spectrometria de masă (LC-MS) și spectrometria de masă în tandem (MS-MS), cât și metode tradiționale, cum sunt electroforeza, spectrofotometria UV-VIS și metode clasice de determinare a proteinelor.

Aplicarea tehnologiilor de producere a peptidelor bioactive, folosind enzimele proteolitice pentru hidroliza ficocianinei, face cercetarea în acest domeniu mai valoroasă din punct de vedere aplicativ. Studiile suplimentare referitoare la activitatea biologică a peptidelor deschid noi perspective de utilizare a lor în calitate de medicamente anticancer și cu alte efecte terapeutice. Se poate presupune că peptidele obținute din ficocianină ar putea manifesta efecte terapeutice și mai pronunțate, comparativ cu ficocianina.

Având în vedere actualitatea problemei abordate și numărul limitat de publicații referitoare la obținerea peptidelor prin hidroliza enzimatică a ficocianinei, scopul lucrării rezidă în studiul posibilității de obținere a fracțiilor peptidice din ficocianină.

### Material și metode

**Extragerea și purificarea ficocianinei.** Ficocianina a fost extrasă cu apă distilată din biomasa de *Spirulina platensis*, supusă în prealabil congelării-decongelării repetate pentru distrugerea pereților celulari. În acest scop, la 1 volum suspensie de spirulină (20 mg/ml) s-a adăugat 4 volume de apă distilată și după agitarea suspensiei la 4°C în decurs de 30 min. proba a fost supusă centrifugării la 6000 rot/min. Extractul de ficocianină a fost supus fracționării cu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  în 2 etape: până la 25% saturație, după care precipitatul a fost înlăturat, iar la supernatant a fost adăugat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  până la 50% saturație. Precipitatul a fost separat prin centrifugare la 6000 rot/min și dizolvat în soluție 3 M NaCl, pH 8,0. Purificarea ficocianinei a fost efectuată pe coloana de phenyl-separose ( $\varnothing = 1,7\text{cm}$ ,  $h = 5\text{cm}$ ), echilibrată cu soluție 3 M NaCl, pH 8,0. Viteza de eluție 50 ml/oră. Eluția a fost efectuată consecutiv cu soluție 1, 0,5, 0,25, 0,1 M NaCl, respectiv, apoi cu  $\text{H}_2\text{O}$ . Detectarea și înregistrarea fracțiilor proteice eluate din coloană a fost efectuată la Uvicord (UV-1, LKB) la 280 nm cu ajutorul 2210 Recorder (LKB). Regenerarea coloanei de phenyl-sepharose a fost efectuată cu:  $\text{H}_2\text{O}$ , 1% SDS, 10% alcool etilic și  $\text{H}_2\text{O}$ . Puritya ficocianinei la fiecare etapă de purificare a fost evaluată prin raportul  $A_{620}/A_{280}$ .

**Obținerea hidrolizatului de ficocianină.** Hidroliza ficocianinei a fost efectuată cu tripsină în raport de 1:20 în decurs de 24 ore. Hidroliza enzimatică a soluției de ficocianină (3 mg/ml) a fost efectuată în 0,5 M soluție NaCl, pH 8,0, în prezența mercaptoetanolului (2 mcl/ml), la temperatura de 30°C. După dializă a fost

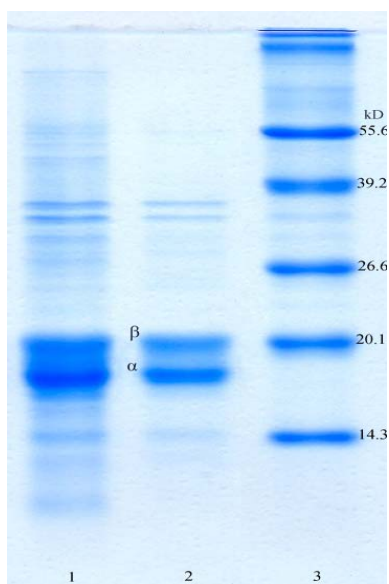
analizat UV-VIS spectrul ficocianinei hidrolizate până la înlăturarea proteinei nehidrolizate și după înlăturarea proteinei nehidrolizate prin filtru centricon (10 kDa).

**SDS-electroforeza în gel de poliacrilamidă.** Ficocianina obținută în rezultatul purificării a fost precipitată cu acid tricloracetic, spălată cu acetonă și dizolvată în soluție tampon pentru proteină. SDS-electroforeza a fost efectuată în gel de poliacrilamidă de 15% în sistemul Laemli [25]. Pentru determinarea masei moleculare a proteinelor au fost utilizați markeri Eichprotein cu mase moleculare: 14,3, 20,1, 26,6, 39,2 și 55,6 kDa. Frațiile peptidice din hidrolizatele ficocianinei au fost analizate cu ajutorul tricine SDS-electroforezei [23]. Pentru determinarea masei moleculare a proteinelor au fost utilizați markeri Eichprotein cu mase moleculare: 2,56, 6,38, 8,24, 14,6, 17, 2, 20,1 și 26,6 kDa.

Benzile proteice în gelul de poliacrilamidă au fost fixate cu amestec etanol:apă:acid acetic (5:5:1) și colorate cu Coomassie G-250 (Serva, Germania) în decurs de 10-20 min., cu spălarea ulterioară a gelului cu soluție 7% CH<sub>3</sub>COOH. Scanarea gelurilor a fost efectuată la Image Scanner III. Masele moleculare ale benzilor electroforetice au fost determinate utilizând programa Kodak.

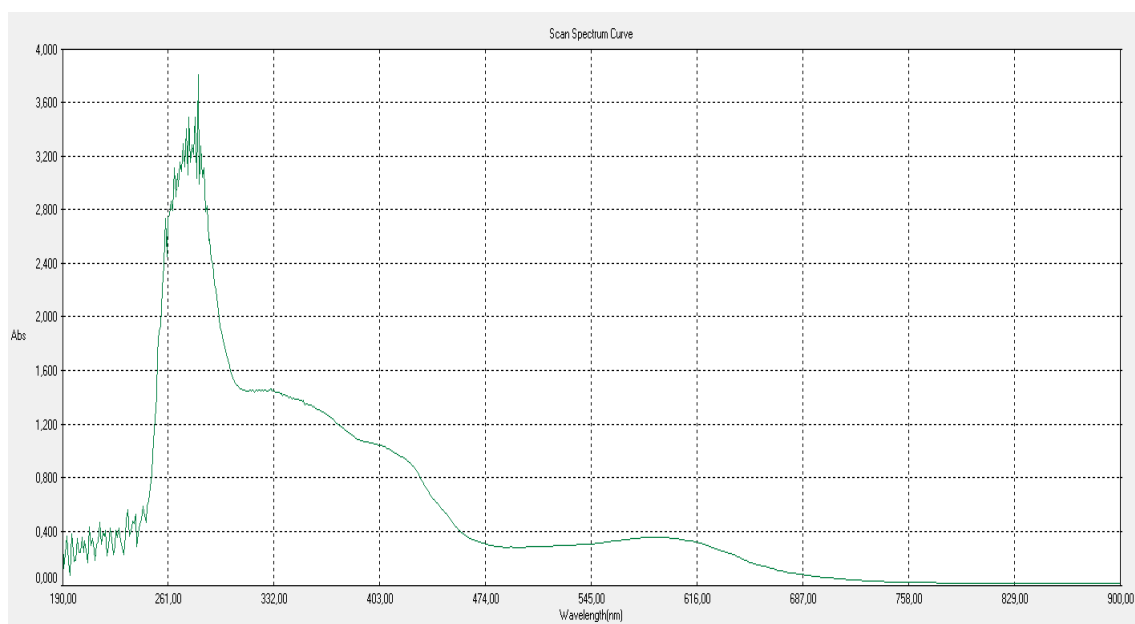
### Rezultate și discuții

Pentru obținerea și explorarea peptidelor bioactive la etapele inițiale, este necesară facilitarea extracției ficobiliproteinelor din biomasa de spirulină prin distrugerea pereților celulari. Acest proces a fost realizat prin congelarea/decongelarea suspensiei algale. Următoarea etapă a procesului a constat în obținerea preparatului de ficocianină pură. În acest scop, extractul sumar de ficobiliproteine a fost supus salifierii în două etape și purificării prin cromatografie pe coloana de Phenyl-sepharose. Analiza electroforetică a preparatelor de ficocianină obținute prin fracționare cu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25-50%) scoate în evidență prezența a două benzi abundente cu masele molare aparente 17,8 și 19,5 kDa ce aparțin subunităților  $\alpha$  și  $\beta$  ale ficocianinei și alte benzi polipeptidice cu mase moleculare mai jos de 14 kDa și agregate cu mase moleculare de circa 40 kDa. După purificarea prin cromatografie, preparatul de ficocianină conține în principal două benzi ce constituie subunitățile  $\alpha$  și  $\beta$ , ceea ce demonstrează că cromatografia asigură înlăturarea proteinelor balast și obținerea preparatului cu un grad de puritate înalt ( $A_{620} / A_{280} = 4,0$ ).

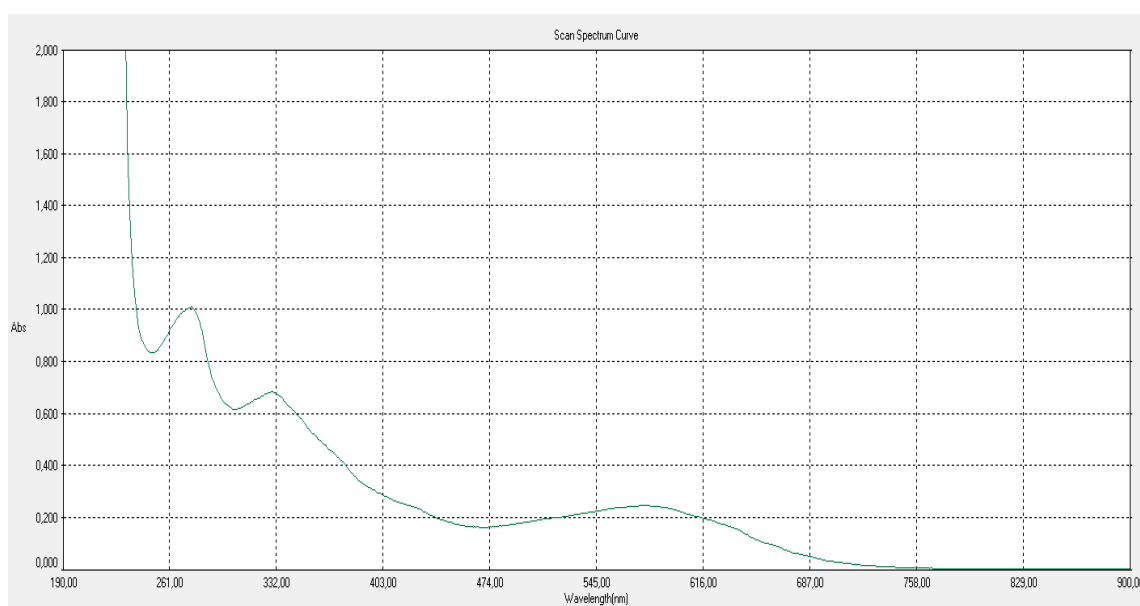


**Fig.1.** SDS-electroforeza ficocianinei purificate prin fracționare cu 25-50% SA (1), cromatografie pe coloana de Phenyl-Sepharose (2) și markerii Eichprotein, kDa (3).

Preparatul de ficocianină a fost supus hidrolizei cu tripsina, în raport de 1:20. După separarea proteinei nehidrolizate prin filtru centricon (masa moleculară 10 kDa), hidrolizatului a fost analizat prin scanarea spectrului UV-VIS (Fig.2).



a

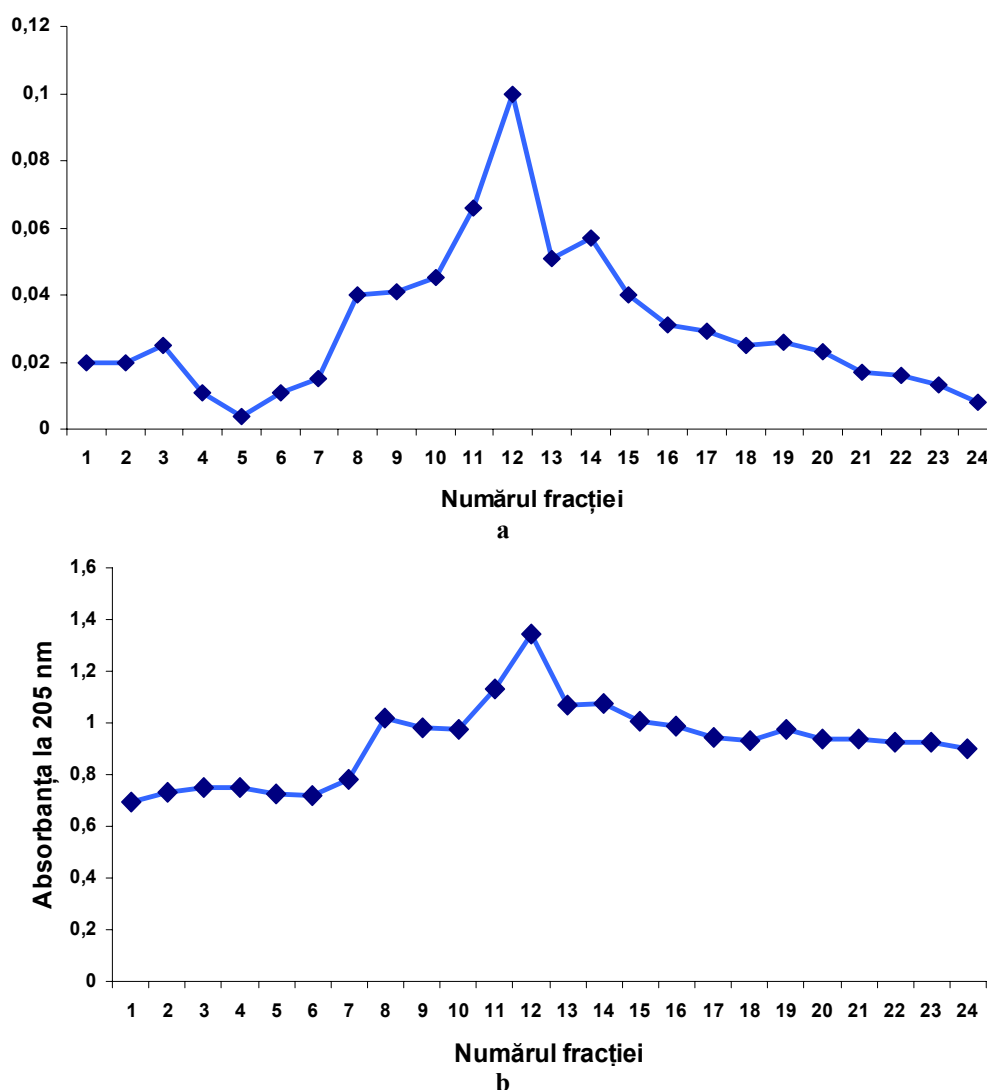


b

**Fig.2.** Spectrele UV-VIS ale hidrolizatorilor peptidice ale ficocianinei obținute la tratarea cu tripsina (1: 20) până la (a) și după înlăturarea proteinei nehidrolizate (b) prin filtru centricon.

Se observă diminuarea picului cromoforului la 616 nm până la dispariția lui aproape completă, precum și a celui al proteinei la 280 nm. Se majorează ponderea peptidelor după hidroliză, ceea ce duce la creșterea absorbantei în intervalul 190-220 nm.

Cromatografia HPLC cu fază inversă pe coloana de Sephasil Peptide C8 (echilibrată cu 0,1%CF<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O (v/v)) cu utilizarea gradientului linear 0,1%CF<sub>3</sub>COOH și 50% acetonitril în 0,1%CF<sub>3</sub>COOH a permis separarea peptidelor în 3 fracții principale (Fig.3).



**Fig.3.** Profilul peptidelor din hidrolizatul triptic al ficocianinei separate prin metoda cromatografică HPLC pe coloana de Sephasil Peptide C8 la determinare: a – prin metoda Lowry (A750) și b – prin determinarea absorbanta la 205 nm. Vfracției =2,5 ml, viteza de eluție =1 ml/min.

Identificarea fracțiilor peptidice după cromatografie a fost efectuată prin două metode: după absorbanta la 205 nm și prin metoda Lowry. La compararea celor două metode utilizate pentru determinarea peptidelor, putem constata că metoda bazată pe măsurarea absorbanta la 205 nm este cu mult mai sensibilă, comparativ cu metoda Lowry. Conform datelor din literatură, s-a stabilit că absorbanta la 205 nm se datorează prezenței legăturilor peptidice și a fost propusă formula empirică de determinare a proteinei individuale, bazată pe măsurarea absorbanta la 280 și 205 nm [24]. Sunt raportate și alte tentative de determinare a proteinelor (peptidelor) și propuse formule de calcul după Abs 205 și 225 nm [32]. Rezultatele obținute confirmă posibilitatea utilizării ambelor metode pentru determinarea peptidelor atât în fracții separate prin cromatografie (Fig.3), cât și în hidrolizatele inițiale ale ficocianinei.

Analiza spectrului peptidic al hidrolizatului triptic al ficocianinei obținut la separare prin electroforeză în tamponul tris-tricină în gel de poliacrilamidă în trei straturi (4, 10 și 16%) (Fig.4) scoate în evidență prezența a 4 benzi peptidice cu masele moleculare 1,84, 3,46, 5,49 și 6,33 kDa, precum și benzile abundente cu mase moleculare 17,8 și 19,5 kDa ale subunităților ficocianinei rămase nehidrolizate și care se separă la filtrare prin centricon, înainte de a efectua cromatografia pe coloana de Sephasil Peptide C8. Se observă diminuarea cantității  $\beta$  subunității ficocianinei, comparativ cu cea a subunității, care rămâne abundentă și după hidroliza

cu tripsina (Fig.4). Deci, putem presupune că  $\beta$  subunitatea este mai sensibilă la hidroliză, ceea ce poate fi explicat prin particularitățile ei structurale și accesibilitatea mai mare a legăturilor peptidice pentru hidroliză.

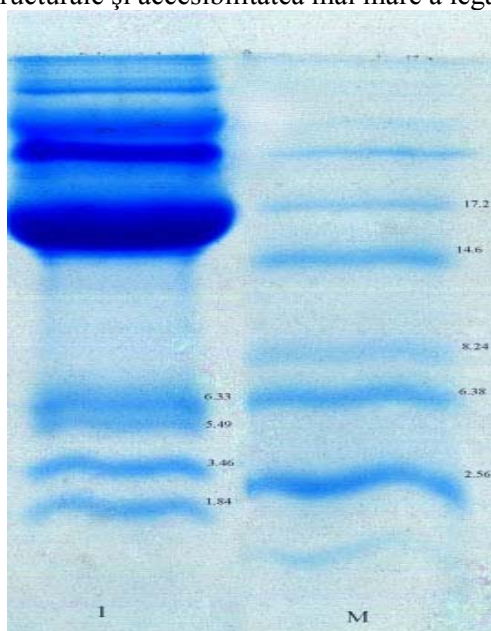


Fig.4. Tricine SDS-electroforeza hidrolizatului triptic al ficocianinei în gel de poliacrilamidă.

Așadar, rezultatele cercetărilor efectuate privind posibilitatea obținerii peptidelor în urma hidrolizei triptice a ficocianinei au scos în evidență că la acțiunea tripsinei asupra ficocianinei (1:20) în prezența mercaptoetanolului după 24 ore are loc hidroliza parțială a ficocianinei, cu preponderență a  $\beta$  subunității. În rezultat se obține partea proteică nehidrolizată și fracțiile peptidice cu masele moleculare mai joase de 10 kDa. Restul nehidrolizat ar putea fi supus hidrolizei ulterioare cu papaină sau pepsină pentru a obține un spectru mai variat de peptide cu diverse proprietăți terapeutice.

### Concluzii

1. A fost obținut hidrolizatului triptic al ficocianinei și a fost analizată componența lui calitativă prin metoda electroforetică în tampon de tris-tricină și prin scanarea spectrului UV-VIS.
2. A fost evaluat profilul fracțiilor peptidice obținute la hidroliza ficocianinei după separarea lor prin cromatografie HPLC cu fază inversă pe coloana de Sephasil Peptide C8 (prin metoda Lowry și după absorbanta la 205 nm).
3. Tripsina asigură hidroliza parțială a ficocianinei, în special a  $\beta$  subunității, și este rațional de a rata restul proteic nehidrolizat cu alte enzime proteolitice.

### Bibliografie:

1. SHEIH, I.C.; FANG, T.J., WU, T.K. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae waste. In: *Food Chem.*, 2009 a, vol.115, p.279-284.
2. AGYEI, D, DANQUAH, M.K. Industrial scale manufacturing of pharmaceutical grade bioactive peptides. In: *Biotechnol. Adv.*, 2011, vol.29, no.3, p.272-277.
3. AGYEI, D, DANQUAH, M.K.. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. In: *Trends Food Sci Technol.*, 2012 e b; vol.23, p.62-69.
4. BERTOLIN, T.E., FARIAS, D., GUARIENTI, C. et al. Antioxidant effect of phycocyanin on oxidative stress induced with monosodium glutamate in rats. In: *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2011, vol.54, no4, p.733-738.
5. DANQUAH, M.K., AGYEI, D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. In: *OA Biotechnology*, 2012, vol.1, no 2, p.5.
6. DENG, W.,WANG, X.-Q. Progress of anti-tumor activity of Phycocyanin and it's enzymolied products. In: *Marine Science Bulletin*, 2010, no.3, p.357-360.
7. ERIKSEN, N.T. Production of phycocyanin – a pigment with application in biotechnology, foods and medicine. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol.80, p.1-14.

8. FERNÁNDEZ-ROJAS, B., HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J., PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. În: *J. Functional Foods.*, 2014, vol.11, p.375-392.
9. GARDEVA, E., TOSHKOVA, R., YOSSIFOVA, L. et al. Antitumor activity of C-phycocyanin from *Arthronema africanum* (Cyanophyceae). In: *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2014, vol.57, no.5, p.675-684.
10. HEO, S.J., PARK, E.J., LEE, K.W., JEON, Z. J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. În: *Bioresurce Technol.*, 2005, vol.96, p.1613-1623.
11. HOST, A, HALKEN, S. Hypoallergenic formulas – when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication! In: *Allergy.*, 2004, vol.59 (Suppl.78), p.45-52.
12. KIM, N.-H., JUNG, S.-H., KIM, J. et al. Purification of an Iron-Chelating Peptide from Spirulina Protein Hydrolysates. In: *J. of the Korean Soc. for Appl. Biol. Chem.*, 2014, vol.57, no.1, p.91-95.
13. KORHONEN, H. and PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. În: *International Dairy Journal*, 2006, vol.16, p.945–960.
14. KUDDUS, M., SINGH, P., THOMAS, G. AND AL-HAZIMI, A. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. In: *BioMed Research International.*, 2013, vol.2013, p.1-9.
15. LI, B., GAO, M.H., ZHANG, X.C., CHU, X.M. Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. In: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2006, vol.43, p.155-164.
16. LU, J, REN, D.F., XUE, Y.L. et al. Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of *Spirulina platensis*. In: *J. Agric. Food Chem.*, 2010, vol.58, no.12, p.7166–7171.
17. LU, X., CHE, Q., LV, Y., WANG, M. et al. A novel defensin-like peptide from salivary glands of the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. În: *Protein Sci.*, 2010, vol.19, no3, p.392-397.
18. PANDEY, V.D, PANDEY, A. and SHARMA, V. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. In: *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2013, vol.2, no9, p.89-97. ISSN: 2319-7706
19. PANKAJ, P.P. et al. In vitro antimalarial activity of C-phycocyanin from *Nostoc muscorum*. In: *The Bioscan: Special issue*, 2010, vol.1, p.69-78.
20. ROMAY, Ch., GONZÁLEZ, R., LEDÓN, N. et al. C- Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. In: *Current Protein and Peptide Science*, 2003, vol.4, p.207-216.
21. SAMARAKOON, K.W., JEON, Y.J. Biofunctionality of peptides derived from marine algae. In: *Food Research International*, 2012, vol.48, p.948–960.
22. SARADA, D.V., KUMAR, C.S., RENGASAMY, R. Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. In : *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011, vol.27, no4, p.779-783.
23. SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In: *Anal Biochem.*, 1987, vol.166, no.2, p.368-379.
24. SCOPES, R.K. Measurement of protein by spectrometry at 205 nm. In: *Analytical Biochemistry*, 1974, vol.59, p.277-282.
25. SHEIH, I.C., WU, T.K, FANG, T.J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. În: *Biores. Technol.*, 2009 b, vol.100, p.3419-3425.
26. SUETSUNA, K. and CHEN, J.R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. In: *Mar. Biotec.*, 2001, vol.3, no.4, p.305-330.
27. VO, T.-S., RYU, B.M., KIM, S.-K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. In: *Journal of Functional Foods*, 2013, vol.53, p.1336-1346.
28. WANG, H. *The phycocyanin/beta-protein inhibits cancer cells proliferation*. Thesis for master degree. 2008. 70p.
29. WANG, L.-F., PANG, G.-C., BAI, Y. Effects of Peptides Produced from Spirulina Protein Hydrolyzed by Pepsin on Cytokines. In: *Food Science*, 2008, vol.29, no.10, p.563-567.
30. WANG, X.-Q., FAN, M., YANG, C.-Y. et al. Study on Biological Functions of *Spirulina platensis* Phycocyanin and Its Hydrolysates by Trypsinase. In: *Food Science*, 2008, vol.29, no.10, p.433-435.
31. XIE, Q. *Enzymatic Hydrolysis And Utilization Of Spirulina*: Thesis of Master Degree, 2012-05-27.
32. <http://nptel.ac.in/courses/102103047/PDF/mod2.pdf>.

**Notă:** Rezultatele expuse în prezenta lucrare au fost obținute în cadrul Proiectului instituțional de cercetare 15.817.05.02F cu suportul financiar al AȘM și USM.

Prezentat la 08.06.2015