

STATUTUL ANTIOXIDANT ÎN CORELARE CU COMPONENȚA BIOCHIMICĂ A BIOMASEI UNOR MICROALGE ÎN CONDIȚII DE TEHNOLOGII INTENSIVE

Liliana CEPOI

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei,
2028 MD, mun. Chișinău, 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 Porphyrinium 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 Porphyrinium 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, Porphyrinium cruentum; test ABTS, dialdehidă malonică, carotenoizi

Creșterea populației Terrei, scăderea fertilității solurilor arabile, degradarea agroecosistemelor – fenomene ce prezintă o adevărată provocare pentru oamenii de știință – impun o abordare mai deosebită a problemei asigurării omeniului cu alimente și 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 substanțe bioactive, fiind elemente cheie în numeroase lanțuri trofice, dar și producători de nutrienți pentru alimentația omului. Printre avantajele acestor obiecte se numără randamentul înalt, posibilitatea de a crește fără utilizarea terenurilor arabile, fixarea unei cantități enorme de dioxid de carbon (după unele estimări, aproximativ 1,8 kg CO₂ la 1 kg biomasă microalgală uscată), capacitatea multor specii de microalge de a crește pe medii ce conțin diferite deșeuri și ape reziduale, utilizându-le pe acestea în calitate de surse de azot și fosfor, excluderea utilizării fertilizanților tradiționali și a pesticidelor, posibilitatea modificării componenței biochimice a biomasei microalgale prin manipularea condițiilor de cultivare și a componenței mediilor nutritive, precum și posibilitatea reciclării mediilor și biomasei reziduale [2-4, 6-9, 13].

Tendința de a obține o cantitate cât mai mare de biomasă cu un nivel tehnologic justificat al componentelor de interes major este absolut firească, în condițiile când cultivarea lor în aer liber este destul de dificilă din mai multe motive (așa ca condițiile climaterice, pericolul infectării culturilor ș.a.) iar cultivarea în fotobio-

reactoare este una din cele mai energointensive procese. În aceste condiții rentabilitatea procesului tehnologic este un indicator ce determină succesul producătorului. Pentru întreprinderile biotehnologice mici o soluție care permite de a spori eficiența procesului de producere este implementarea tehnologiilor intensive care permit obținerea a mai multor produse în cadrul unui singur flux tehnologic. Experiența arată, însă, că intensitatea fluxului tehnologic este invers proporțională cu confortul fiziologic al culturilor implicate. În aceste condiții, asigurarea siguranței biomasei ficologice pentru consumul direct ori intermediat uman este primordială. Conținutul 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 compoziției biochimice în procesul de cultivare industrială a microalgelor trebuie să fie examinată în contextul statutului antioxidant al biomasei.

Materiale și metode

În calitate de *obiecte de cercetare* au servit: microalga roșie *Porphyridium cruentum* (Näg) CNM-AR-01 și microalga verde *Haematococcus pluvialis* Flotow CNM-AV-05 depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene.

Mediul nutritiv mineral VP 2 (Brevet MD Nr. 690) pe care este efectuată creșterea microalgei *P.cruentum* are următoarea componență chimică: Macroelemente în g/L – NaCl-7,0; KCl-7,5; MgSO₃·7H₂O-1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O-0,15; KBr-0,05; KI-0,05; K₂HPO₄-0,2; Soluție de microelemente (din care se aplică 1ml/L), ce conține în mg/L: FeCl₃·6H₂O-2,7; ZnSO₄·5H₂O-0,02; CuSO₄·5H₂O-0,05; MnSO₄·5H₂O-0,3; H₃BO₃-0,6; MoO₃-0,02; NaVO₃-0,05 [1].

Cultivarea s-a efectuat cu menținerea următorilor parametri: pH-ul 6,8-7,2, temperatura de 23-25°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 componență a macroelementelor (g/l): NaNO₃ – 0,3; KH₂PO₄ – 0,02; K₂HPO₄ – 0,08; MgSO₄·7H₂O – 0,01; CaCl₂ – 0,0474; NaCl – 0,02, și microelementelor (mg/l): ZnSO₄·7H₂O – 0,0001; MnSO₄·5H₂O – 0,0015; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; H₃BO₃ – 0,0003; (NH₄)₆Mo₂₄·4H₂O – 0,0003; FeSO₄·7H₂O – 9,3; Co(NO₃)₂·H₂O – 0,0002; EDTA – 0,0075.

Cultura a fost cultivată în condițiile 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 capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului cation ABTS^{•+}. Radicalul ABTS^{•+} este generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) cu persulfat de potasiu. Se prepară soluția stoc a reagentul ABTS de 7 mM în apă deionizată. Persulfatul de potasiu se adăugă în concentrația de 2,45 mM.

Reacția de formare a radicalului ABTS^{•+} decurge la întuneric, la temperatura camerei cel puțin timp de 12-16 ore. Soluția de lucru a ABTS se prepară din soluția stoc de ABTS^{•+}, care se dizolvă în etanol sau apă distilată până la stabilizarea absorbantei de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm.

Amestecul reagent constă din 0,3 ml probă și 2,7 ml soluție ABTS^{•+}. Reacția de decolorare decurge la temperatura camerei timp de 6 minute, iar procentul de inhibiție se calculează conform ecuației: **% Inhibiție** = $(\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=6 \text{ min}}) / \text{Abs}_{t=0} * 100$, unde $\text{Abs}_{t=0 \text{ min}}$ este valoarea extincției de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm a soluției ABTS^{•+}, $\text{Abs}_{t=6 \text{ min}}$ este valoarea extincției după incubare [12].

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

Au fost utilizate metodele standardizate pentru cercetările ficologice: determinarea spectrofotometrică a biomasei algale; determinarea carotenoizilor [12]. Compușii coordinativi au fost sintetizați de colaboratorii laboratorului Compuși coordinativi, IC, AȘM, șef Laborator I. Bulhac.

Rezultate și discuții

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

În același timp bazele Schiff sunt cunoscute ca produse care induc apoptoza celulară, și deci ca factori de toxicitate înaltă, iată de ce a fost luată decizia de a utiliza compuși, care au în componența 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 reacțiilor de protecție antioxidantă.

Pentru ambele microalge au fost aplicate aceleași concentrații a compușilor – 20 mg/l. Parametrii monitorizați în cadrul experiențelor 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 compuși coordinațivi ai fierului sunt prezentate în figura 1(A). Pentru toți compușii se înregistrează o scădere semnificativă a cantității de biomasă acumulată la finele ciclului vital al microalgei cu 12-43% față de varianta martor. Pentru hematococ, din contra, atât la etapa de celule verzi mobile (fig.1(B)), cât și la cea de ciști roșii (fig.1(C)) au fost înregistrați indici de productivitate care depășesc valorile respective în probele martor cu 18-62%.

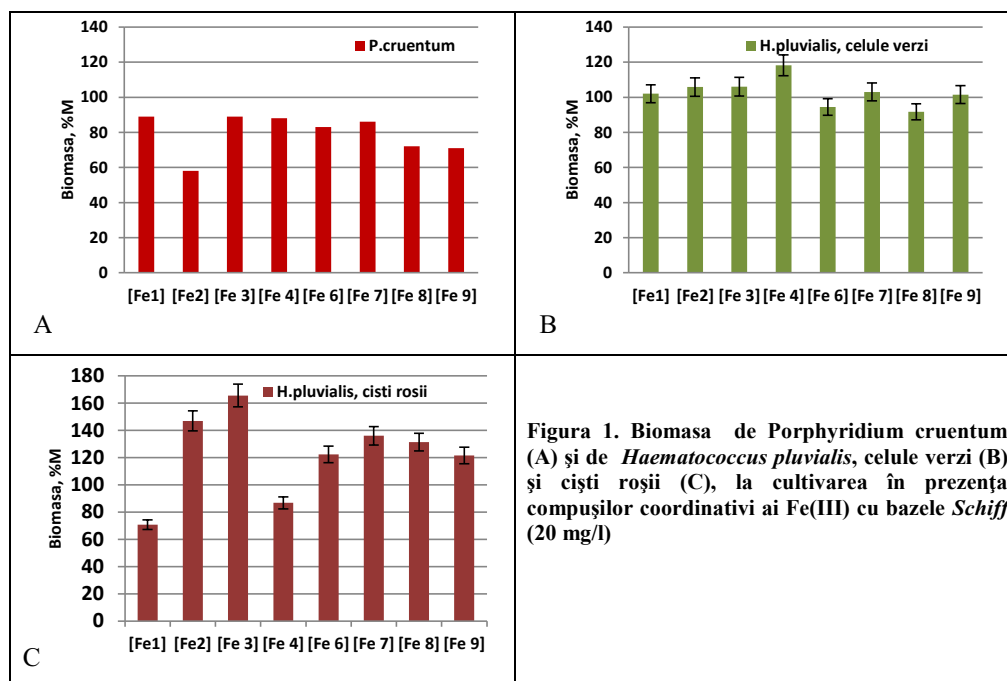


Figura 1. Biomasă de *Porphyridium cruentum* (A) și de *Haematococcus pluvialis*, celule verzi (B) și ciști roșii (C), la cultivarea în prezența compușilor coordinațivi ai Fe(III) cu bazele Schiff (20 mg/l)

Activitatea antiradicalică a extractelor din biomasă microalgală a fost testată cu aplicarea testului de reducere a radicalului cation ABTS. Rezultatele obținute 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 biomasă standard. În cazul microalgei verzi *Haematococcus pluvialis* activitatea antiradicalică a extractelor din biomasă în cazul prezenței compușilor fierului de asemenea scade, proces care este mai evident în ciști roșii (fig.2B) decât în celulele verzi mobile (fig.2C). Trebuie să menționăm, că scăderea activității antiradicalice a extractelor din biomasă este o tendință generală, care se dezvoltă atât în condiții de creștere considerabilă a cantității de biomasă, cât și în condiții de diminuare vădită a productivității.

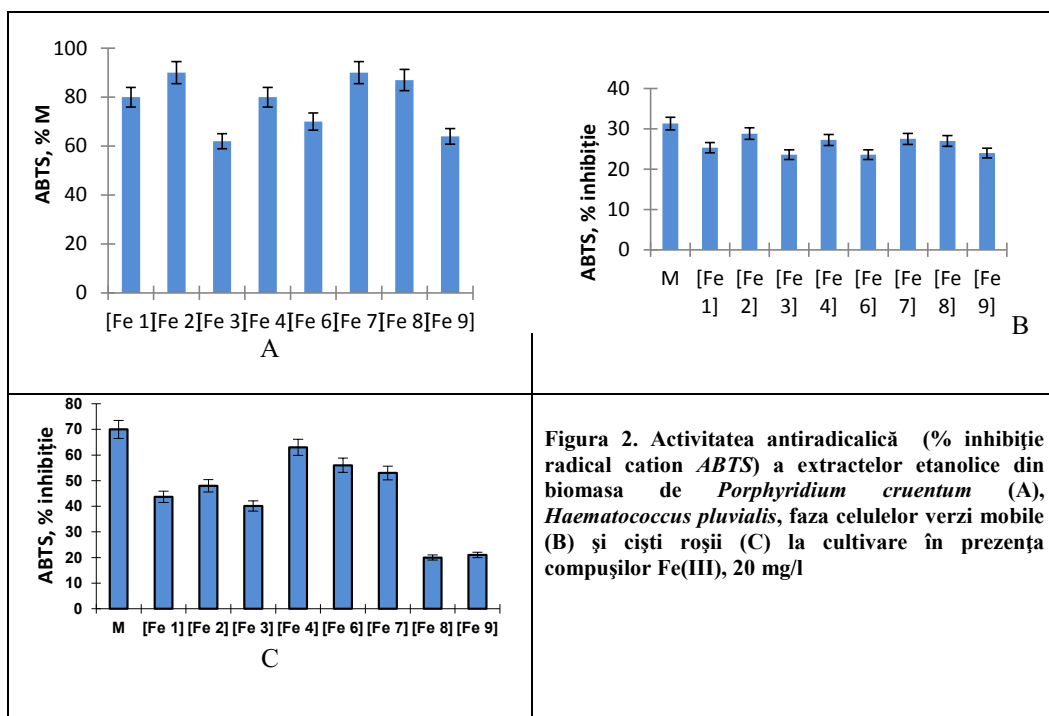


Figura 2. Activitatea antiradicalică (% inhibiție radical cation *ABTS*) a extractelor etanolice din biomasa de *Porphyridium cruentum* (A), *Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile (B) și ciști roșii (C) la cultivare în prezența compușilor Fe(III), 20 mg/l

Statutul antioxidant al biomasei microalgale este determinat nu doar de (și nu atât de) activitatea antiradicalică și antioxidantă ca componentelor celulare, cât de echilibrul care se instalează între radicalii liberi și produsele cu activitate antioxidantă și antiradicalică. Cuantificarea radicalilor liberi este destul de complicat de realizat din cauza duratei scurte de viață a lor și complexitatea metodelor care urmează a fi aplicate. În schimb, efectele nocive ale acțiunii radicalilor liberi și produsele formate sunt stabile, și pot fi determinate prin metode destul de simple. Unul din efectele cele mai evidente ale acțiunii 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 experiențele efectuate au fost determinate produsele peroxidării lipidice (dialdehida malonică) și stabilită relația între cantitatea lor și 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 și cantitatea de dialdehidă malonică este de 0,5298, dependența 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 protecția celulelor de procesul de peroxidare a lipidelor. În cazul celulelor verzi mobile de *Haematococcus pluvialis* (fig.3B) și a ciștilor roșii (fig.3C) coeficienții de determinare între cei doi parametri sunt mult mai înalți: 0,9467 și 0,9175 respectiv. Acest rezultat de fapt poate fi considerat previzibil, dacă apelăm la rezultatele cu referire la productivitatea de biomasă a culturilor respective. La *H. pluvialis* suprimarea acumulării de biomasă sub influența compușilor fierului se observa doar în 2 cazuri și doar în ciștii roșii, deci și presiunea stresului oxidativ este mai mică, pe când la *P. cruentum* în toate variantele experimentale are loc scăderea biomasei.

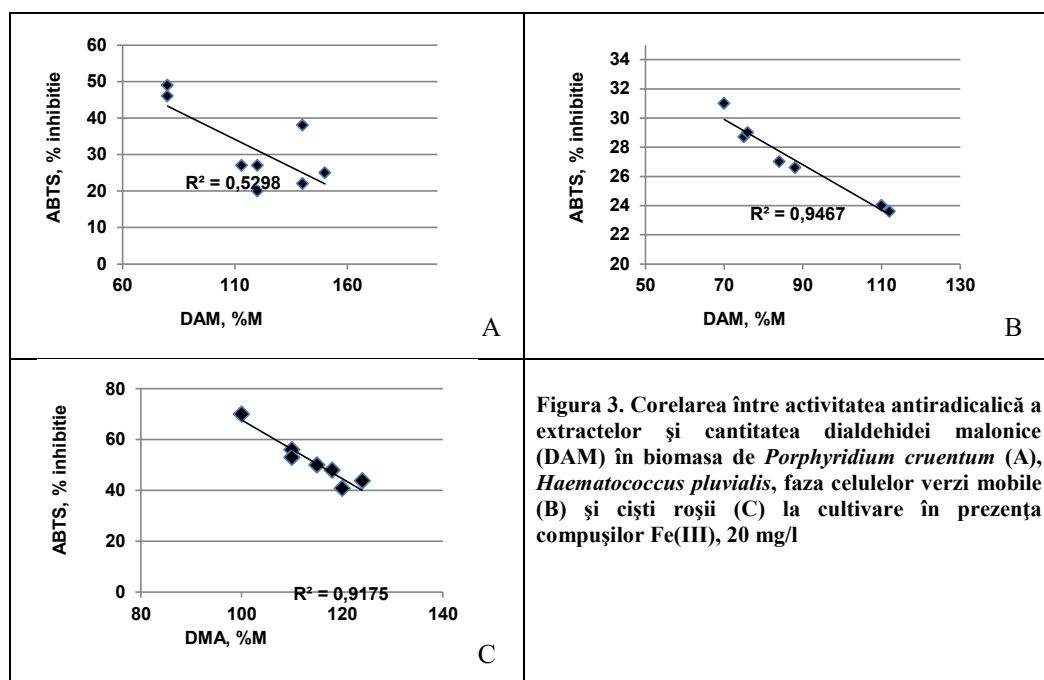


Figura 3. Corelarea între activitatea antiradicalică a extractelor și cantitatea dialdehidei malonice (DAM) în biomasă de *Porphyridium cruentum* (A), *Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile (B) și ciști roșii (C) la cultivare în prezența compușilor Fe(III), 20 mg/l

Dintre componentele cu efect antioxidant pronunțat ale biomasei de porfiridium poate fi menționat carotenu, iar în cazul culturii de hematococ, carotenu în celulele verzi și astaxantina în ciștii roșii, care de fapt, și determină protecția antioxidantă a celulelor. În figura 4 este ilustrată corelarea între activitatea antiradicalică și conținutul de carotenoizi în biomasă microalgor.

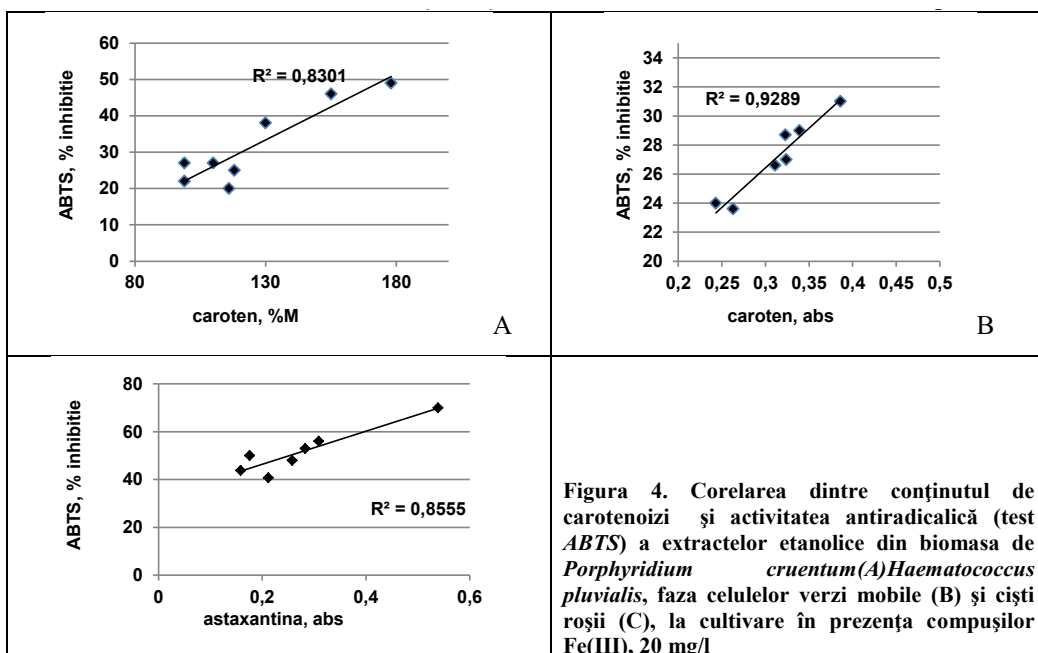


Figura 4. Corelarea dintre conținutul de carotenoizi și activitatea antiradicalică (test ABTS) a extractelor etanolice din biomasa de *Porphyridium cruentum* (A) *Haematococcus pluvialis*, faza celulelor verzi mobile (B) și ciști roșii (C), la cultivare în prezența compușilor Fe(III), 20 mg/l

În toate tipurile de biomasă studiate, corelarea între activitatea antiradicalică a extractelor etanolice și conținutul de carotenoizi în biomasă este semnificativă. Putem afirma, că în mare măsură protecția antioxidantă în celulele de porfiridium și hematococ supuse stresului oxidativ prin influența compușilor coordinativi, este asigurată de carotenoizii prezenți în biomasă (β -caroten în porfiridium și celulele verzi de hematococ și astaxantină în ciști roșii de hematococ).

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

Bibliografie

1. Brevet de invenție 690 G2 690. Mediu pentru cultivarea algei roșii *Porphyridium 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 triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. In: *Plant J.* 2008, vol. 54, p. 621–639.
8. Huntley M.E., Redalje D.G. CO₂ 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 obținere a preparatelor pe bază de astaxantină din *Haematococcus pluvialis*. Autoref. tezei dr.șt. biologice. Chișinău, 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. ș.a. Ficobiotehnologie –cercetări fundamentale și realizări practice. Chișinău: 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.