

PIGMENTII FOTOSINTETICI LA *PORPHYRIDIVM CRUENTUM* ÎN CONDIȚII DE STRES OXIDATIV INDUS

Dr. Liliana CEPOI
Institutul de Microbiologie
și Biotehnologie

PORPHYRIDIVM CRUENTUM PHOTOSYN- THETIC PIGMENTS UNDER THE INDUCED OX- IDATIVE STRESS

Summary. Fe (III) coordination compounds with Schiff bases and Fe (II) with dioximines induce a state of oxidative stress in culture of *Porphyridium cruentum* expressed in a significant reduction of biomass and accumulation of lipid peroxidation products (malondialdehyde). In these conditions is registered the β -carotene content fluctuation, decreasing of phycoerythrin and significantly increasing of phycocyanin content in biomass. Correlation analysis makes evident the phycocyanin implication in antiradical protection of *Porphyridium cruentum* in the condition of induced oxidative stress.

Keywords: oxidative stress, antiradical activity, *Porphyridium cruentum*, phycocyanin, phycoerythrin, β -carotene.

Rezumat. Compușii coordinativi ai Fe(III) cu bazele Schiff și ale Fe(II) cu dioximinele, induc o stare de stres oxidativ pronunțat în cultura de *Porphyridium cruentum*, exprimat prin diminuarea semnificativă a biomasei și supraacumularea produselor peroxidării lipidelor (dialdehidei malonice). În aceste condiții, se înregistrează fluctuații ale conținutului de β -caroten, diminuarea cantității de ficoeritrină și creșterea semnificativă a conținutului de ficocianină în biomasă. Analiza corelațională efectuată a permis de a evidenția implicarea ficocianinei în protecția antiradicalică la *Porphyridium cruentum* în condiții de stres oxidativ indus.

Cuvinte-cheie: stres oxidativ, activitate antiradicalică, *Porphyridium cruentum*, ficocianină, ficoeritrină, β -caroten.

Introducere

Stresul oxidativ, caracterizat prin predominarea procesului de formare a radicalilor liberi asupra celui de anihilare a lor, constituie fenomenul care duce în cele din urmă la moartea celulelor vii. În cazul

producerii de biomasă cu diferite utilizări practice, stresul oxidativ este responsabil de degradarea calității acesteia. Mai mult decât atât, în cazul acumulării excesive a radicalilor liberi în produsele finite, acestea se transformă în surse potențiale periculoase de prooxidanți, capabile să declanșeze reacții de oxidare în lanț cu urmări extrem de negative asupra organismelor – consumatoare ale acestor produse.

Biomasa microalgelor și cianobacteriilor este tot mai solicitată pe piață pentru conținutul biochimic valoros și diversitatea produselor care pot fi obținute din ea. Cererea în creștere duce inevitabil la instalarea unei tendințe de sporire a producției ficologice. Condițiile de creștere în masă a microalgelor sunt din start stresante pentru aceste organisme și, prin urmare, există pericolul, ca în anumite împrejurări, biomasa obținută să prezinte un potențial prooxidant vădit. Astfel, studiul modificărilor componenței calitative și cantitative a biomasei în situație de stres oxidativ este o condiție a elaborării bazelor de apreciere a siguranței produselor ficologice.

Reacția organismelor vii la intervenții xenobiotice și la modificarea condițiilor de viață se exprimă în modificarea statutului antioxidant, care tinde spre menținerea homeostaziei și eliminarea stării de stres indus. Componentele nonenzimatice ale biomasei microalgelor și cianobacteriilor au un rol foarte important în procesul de prevenire a formării radicalilor liberi și de înlăturare a celor deja formați. Din această categorie fac parte *ficobiliproteinele* formate prin asocierea apoproteinelor cu ficobilinele, care acționează drept cromofori (partea activă ce capturează lumina). Funcția lor de bază constă în absorbția energiei solare cu lungimea de undă de 495-650 nm și transferul ei spre clorofilă în centrele reactive ale aparatului fotosintetic. În calitate de antioxidanți eficienți, ficobiliproteinele se manifestă în procesul de neutralizare a radicalilor liberi. Astfel, s-a stabilit că acești compuși elimină radicalii alcoxil, hidroxil și peroxil. Efectul lor protector este exprimat prin protecția membranelor fiziologic active de procesul de peroxidare [8, 11, 12].

Un grup important și foarte bine studiat de compuși cu efect antioxidant și antiradicalic, făcând parte din biomasa microalgelor și cianobacteriilor, îl constituie *carotenoizii*, care realizează stingerea radicalilor clorofilei prin acumularea asupra lor a energiei și eliberarea ei în formă de căldură la relaxarea termică [6]. Prin această acțiune, carotenoizii previn formarea oxigenului singlet ori sting oxigenul singlet format prin aplicarea mecanismului de transfer de energie. După cum s-a mai stabilit,

carotenoizii posedă capacitatea de a stinge prin intermediul reacțiilor chimice astfel de specii reactive ale oxigenului ca superoxid radicalul și radicalii peroxilipidici [4, 7, 9, 13].

Scopul acestei lucrări a fost urmărirea modificării acumulării pigmentilor ficobilinici și β -carotenului în biomasa microalgei roșii *Porphyridium cruentum* în condiții de stres oxidativ indus prin acțiunea xenobioticelor (compuși coordinativi cu efect potențial toxic ai fierului bivalent și trivalent cu bazele Schiff și dioximinele).

Materiale și metode

În calitate de *obiect de cercetare* a servit microalga roșie *Porphyridium cruentum* (Näg) CNM-AR-01 depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neptogene, cultivarea căreia s-a efectuat timp de 14 zile pe *mediul nutritiv mineral VP 2* [1] cu menținerea următorilor parametri: pH-ul 6,8-7,2, temperatura de 23-25°C, iluminare de 8000-12000 erg/m²s, agitare lentă periodică. Cantitatea de inoculum a fost de 0,5-0,6 g/L biomasa absolut uscată (BAU).

Determinarea productivității a fost efectuată fotometric cu recalculul masei celulare la BAU conform formulei:

$$(g/l \text{ BAU}) = A_{545} \times \eta \times k \quad (1)$$

unde: A_{545} – densitatea optică a culturii de porfiridium; η – diluția probei; k – coeficient de recalcul pentru cultura de porfiridium în g/l BAU, conform curbei de calibrare (de determinare a BAU).

Determinarea produselor oxidării lipoproteinelor a fost efectuată în baza cuantificării substanțelor reactive ale acidului tiobarbituric – dialdehida malonică [5]. La probele de biomasa a fost adăugat 1 ml acid tiobarbituric de 0,67% și 1 ml acid tricloracetat de 15%, după care probele au fost supuse incubării pentru 1 oră la 95 °C. În continuare, probele au fost răcite pe gheață timp de 5 minute și au fost centrifugate timp de 15 minute la 3000 g. Concentrația dialdehidei malonice a fost măsurată la 535 nm, iar calculul s-a efectuat prin utilizarea coeficientului molar de extincție a complexului dialdehidei malonice calculat la cantitatea de proteină sau în % inhibiție față de proba martorului pozitiv.

Determinarea capacității antiradicalice cu utilizarea radicalului cation ABTS^{•+}. Radicalul ABTS^{•+} a fost generat prin oxidarea ABTS (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic acid) cu persulfat de potasiu. A fost preparată soluția stoc a reagentului ABTS de 7 mM în apă deionizată. Persulfatul de potasiu a fost adăugat în concentrația de 2,45 mM.

Reacția de formare a radicalului ABTS^{•+} a de-

curs la întuneric, la temperatura camerei, timp de cel puțin 12-16 ore. Soluția de lucru a ABTS^{•+} a fost preparată din soluția stoc de ABTS^{•+}, care a fost dizolvată în etanol sau apă distilată până la stabilizarea absorbantei de $0,700 \pm 0,020$ la 734 nm.

Amestecul reagent a constat din 0,3 ml probă și 2,7 ml soluție ABTS^{•+}. Reacția de decolorare a decurs la temperatura camerei timp de 6 minute, iar procentul de inhibiție a fost calculat conform ecuației:

$$\% \text{ Inhibiție} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=6 \text{ min}}) / \text{Abs}_{t=0} * 100, \quad (2)$$

unde $\text{Abs}_{t=0}$ 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 [10].

Determinarea conținutului de ficobiliproteine în extractul hidric s-a efectuat prin aplicarea spectrometriei. Absorbanța extractului a fost citită la 565, 620 și 650 nm la spectofotometrul T60 PG Instruments, iar calculul cantitativ a fost realizat prin aplicarea formulelor descrise de Gantt și Lipschultz [3].

Determinarea β -carotenului în biomasa de *Porphyridium cruentum* a fost efectuată conform schemei: la 10 mg biomasa s-a adăugat 2 ml alcool etilic absolut. Extragerea pigmentilor a avut loc la temperatura camerei, prin agitare timp de 30 min. Extractul a fost separat de biomasa prin centrifugare și apoi a fost citită absorbanta la lungimea de undă 450 nm. Conținutul β -carotenului a fost calculat conform formulei

$$C = \text{Abs}_{450} \times 10^3 / 2620 \quad (3)$$

unde C = concentrația β -carotenul, mg/100g; Abs_{450} = absorbanta extractului etanolic de β -caroten la lungimea de undă de 450 nm; 2620 – coeficientul de extincție specific a β -carotenului în etanol.

Compușii coordinativi utilizați pentru inducerea stresului oxidativ în cultura de porfiridium au fost sintetizați de colaboratorii Laboratorului Compuși Coordinativi, IC, AȘM, șef laborator I. Bulhac.

Rezultate și discuții

Pentru inducerea stresului oxidativ au fost utilizați patru compuși coordinativi ai Fe(III) cu bazele Schiff (notați în continuare prin abrevierile [Fe 1] ... [Fe 4]) și patru compuși ai Fe(II) cu dioximinele (notați în continuare prin abrevierile [Fe 5] ... [Fe 8]). Aceștia au fost introduși în mediul nutritiv destinat creșterii culturii de porfiridium până la inoculare în cantitate de 30 mg/L. Parametrii monitorizați la prima etapă a experienței au fost cantitatea de biomasa acumulată la finele ciclului vital și nivelul dialdehidei malonice în biomasa. Aceștia permit a determina prezența și intensitatea stresului oxidativ în sistemul studiat. Rezultatele

obținute sunt prezentate în figura 1. Biomasa în variantele experimentale constituie de la 80% la 47% din nivelul ei normal, care se înregistrează în proba martor, evidențiind o scădere esențială în unele probe de peste 2 ori (compușii [Fe 4], [Fe 6] și [Fe 8]) (fig.1(A)).

În același timp, în toate variantele se înregistrează o creștere substanțială a produselor peroxidării lipidelor, nivelul de dialdehidă malonică depășind valorile normale de 1,5-2,2 ori (fig.1(B)). Corelarea negativă foarte strânsă (valoarea coeficientului de determinare fiind de 0,943) între cantitatea biomasei acumulate și nivelul DAM în ea este o dovadă a unui stres oxidativ pronunțat, care împiedică derularea normală a proceselor vitale în celulele de porfiridium.

În aceste împrejurări, supraviețuirea culturii microalgale poate fi asigurată de mecanismele de protecție care funcționează în baza componentelor nonenzimatică. În biomasa de *Porphyridium cruentum* sunt prezenți numeroși compuși care pot realiza această funcție: compuși fenolici, polizaharide, în special cele sulfatate, tocoferoli. Pigmenții fotosintetici secundari – ficobilinele și carotenoizii – de asemenea posedă capacitatea de a stinge radicalii liberi formați în urma reacțiilor normale ori patologice din celule. Pentru a evidenția modificările produse sub influența compușilor fierului, în biomasa de porfiridium a fost determinat conținutul de pigmenți ficobilinici și β -caroten în biomasa obținută în condiții de stres oxidativ. La fel, în extractele hidrice (în care trec ficobilinele) și cele etanolice (în care trec carotenoizii) a fost evaluată capacitatea de inhibiție a radicalului cation ABTS^{•+}.

Rezultatele pentru β -caroten sunt prezentate în figura 2(A), iar cele pentru activitatea antiradicalică ale extractelor etanolice – în figura 2(B).

Cantitatea de β -caroten variază în probele experimentale în limite destul de largi, înregistrând valori ce depășesc substanțial valorile normale (cu 60% în cazul compusului [Fe 3], dar și valori în limita normei ori cu o reducere nesemnificativă. În cazurile studiate de noi nu putem evidenția o tendință sigură de implicare generalizată a carotenoizilor în protecția antioxidantă a celulelor în cazul unui stres oxidativ pronunțat. Extractul etanolic din biomasa de porfiridium obținută în condiții de stres oxidativ este mai puțin activ din punct de vedere al inhibiției radicalului cation ABTS^{•+} față de cel obținut din biomasa probei martor. Astfel, componentele liposolubile cu efecte antioxidante ale biomasei de porfiridium în condițiile experimentale analizate în această lucrare sunt mai puțin active și asigură o protecție antioxidantă mai puțin eficientă a celulelor decât în condiții normale. În același timp, corelarea pozitivă destul de pronunțată ($R^2=0,657$) între % de inhibiție a radicalului cation ABTS^{•+} de către extractul etanolic din biomasa și conținutul de caroten în ea, arată că în mare măsură activitatea antioxidantă a extractelor etanolice este determinată anume de prezența carotenoizilor.

Culturile de microorganisme fotosintezatoare, care au în componența lor pigmenți ficobilinici, reacționează de obicei prompt la acțiunea xenobioticelelor prin modificări cantitative ale acestor pigmenți [11]. În biomasa de porfiridium a fost determinată cantitatea de ficoeritrină și de ficocianină, precum și activitatea antiradicalică (metoda ABTS) a extrac-

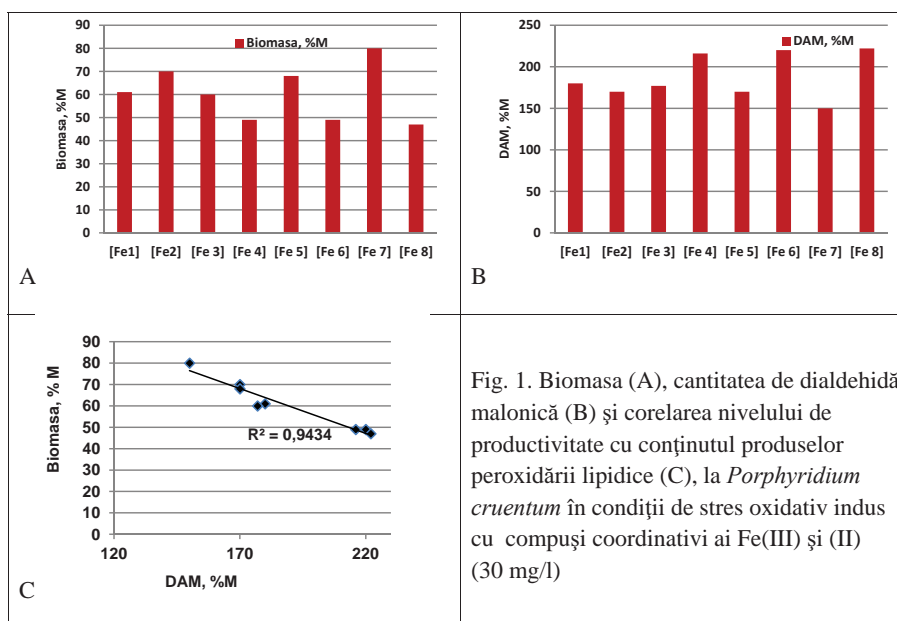


Fig. 1. Biomasa (A), cantitatea de dialdehidă malonică (B) și corelarea nivelului de productivitate cu conținutul produselor peroxidării lipidice (C), la *Porphyridium cruentum* în condiții de stres oxidativ indus cu compuși coordinați ai Fe(III) și (II) (30 mg/l)

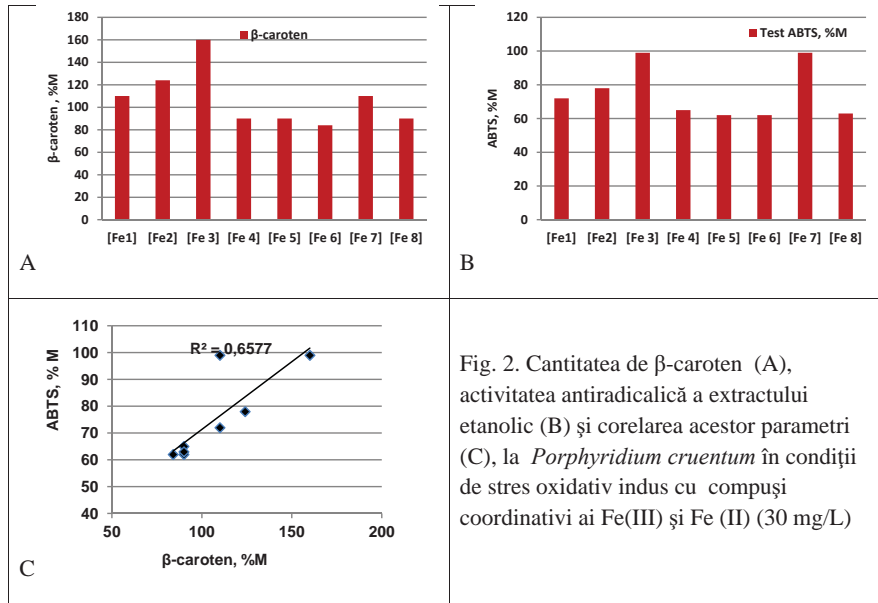


Fig. 2. Cantitatea de β -caroten (A), activitatea antiradicalică a extractului etanolic (B) și corelarea acestor parametri (C), la *Porphyridium cruentum* în condiții de stres oxidativ indus cu compuși coordinați ai Fe(III) și Fe (II) (30 mg/L)

telor hidrice care conțin acești pigmenți (figura 3). Activitatea antiradicalică totală a extractului hidric în cazul compușilor [Fe 1], [Fe 2] și [Fe 3] a fost mai înaltă decât capacitatea antiradicalică a extractului din biomasa probei martor. În celelalte cazuri avem valori similare ori mai mici ca martorul. Pentru a stabili dependența activității antiradicalice de conținutul ficobilinelor, în extract a fost calculată corelarea între valorile testului ABTS și valorile sumare absolute ale celor 2 pigmenți ficobilinici, suma cărora s-a calculat în % la biomasa absolut uscată – BAU (fig.3(D)).

Coefficientul de determinare înalt – de 0,837 – demonstrează că activitatea antiradicalică a extrac-

tului hidric este determinată în cea mai mare măsură de prezența cantitativă a pigmenților ficobilinici. Tendința generală pentru conținutul de ficoeritrină, cu excepția compusului [Fe 2], este în direcția micșorării cantității acesteia. Astfel, o diminuare moderată a cantității pigmentului roșu se înregistrează în 7 din 8 probe experimentale (fig.3(A)). În același timp, cantitatea de ficocianină crește simțitor în toate variantele experimentale, valorile relative fiind cu 10-50% mai mari ca în cazul martorului (fig.3(B)). Asemenea modificări ale conținutului de pigmenți ficobilinici au fost observate și anterior în experiențe cu alți compuși coordinați ai metalelor [2, 11]. După cum se observă în această lucrare, precum și

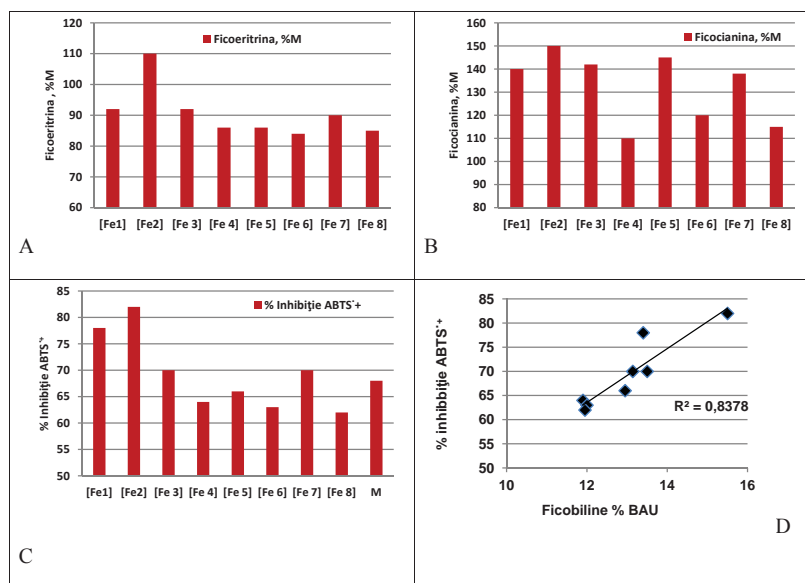


Fig. 3. Cantitatea de ficoeritrină (A), ficocianină (B), activitatea antiradicalică totală a extractului hidric (C) și corelarea între conținutul total de ficobiline și valorile testului ABTS (D) la *Porphyridium cruentum* în condiții de stres oxidativ indus cu compuși coordinați ai Fe(III) și Fe (II) (30 mg/L)

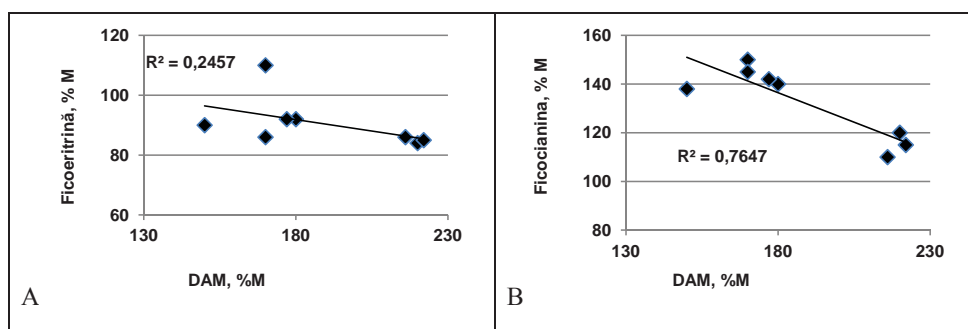


Fig.4. Corelarea între cantitatea pigmentilor ficobilinici (ficoeritrină (A) și ficocianină (B)) și a dialdehidei malonice în biomasa de *Porphyridium cruentum* obținută în condiții de stres oxidativ indus.

în publicațiile anterioare, conținutul de ficoeritrina repetă fluctuațiile productivității, ceea ce sugerează ideea implicării ei preferențial în procesele fotosintetice, în raport cu cele de protecție antioxidantă. În susținerea acestei afirmații vine și lipsa unei corelări între cantitatea de DAM și cea de ficoeritrină în biomasa de porfiridium obținută în condiții normale și de stres oxidativ (fig. 4 (A)).

Lipsa acestei corelări ar putea însemna că, în pofida potențialului antioxidant înalt, acest pigment în condițiile studiate nu se implică în procesul de stingere a radicalilor liberi, formați ca răspuns la acțiunea compușilor introduși în mediu. În schimb, se observă o corelare inversă destul de strânsă între conținutul ficocianinei și cel al dialdehidei malonice în biomasă, ceea ce ar putea exprima implicarea acestui pigment în procesele de protecție antiradicalică la microalga roșie *Porphyridium cruentum*.

Concluzii

Rezultatele expuse în această lucrare demonstrează că în condiții de stres oxidativ, indus de acțiunea compușilor coordinați ai fierului cu potențial toxic înalt, are loc o modificare pronunțată a componenței pigmentilor (β -carotenului, ficoeritrinei și ficocianinei). În condițiile unei diminuări esențiale a cantității de biomasă, în diferite variante se înregistrează atât creșterea, cât și diminuarea cantității de β -caroten, o diminuare a cantității de ficoeritrină și o creștere a conținutului de ficocianină în biomasă. Corelarea negativă înaltă între conținutul de ficocianină și produsele peroxidării lipidelor permite să afirmăm implicarea acestui pigment în protecția antiradicalică a celulelor la porfiridium în condițiile experimentale analizate.

Bibliografie

1. Brevet de invenție 690 G2 690. Mediu pentru cultivarea algei roșii *Porphyridium cruentum* (varianțele lui). / Cepoi Liliana, Valeriu Rudic. Data publicării 30.06.1995. BOPI nr.6/1995.

2. Cepoi L. Particularitățile fiziologo-biochimice de cultivare a microalgei roșii *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01 – sursă de substanțe bioactive. Autoref. Tezei de dr. în șt, boil., Chișinău, Tipografia USM, 1995, 24 p.

3. Gantt, E., Lipschultz, C.A., (1974): Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum* pigment analysis. Biochemistry, 13: 14-20 p.

4. Goiris K. et al. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. In: J Appl Phycol, 2012, vol. 24, p.1477-1486.

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. În: Planta, 1999, vol. 207, p. 604-610.

6. Jahns P., Holzwarth A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. In: Biochim Biophys Acta, 2012, vol.1817, p.182-193

7. Markou G., Nerantzis E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. In: Biotechnology Advances, 2013, vol. 31, p. 1532-1542

8. Pandey A., Pandey V.D. Evaluation of filamentous cyanobacteria for phycobiliprotein content and composition. In: Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. 2013, vol. 3, nr. 2, p. 222-227.

9. Ramel F. et al. Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. In: Plant Physiol, 2012, vol. 158, 1267-1278.

10. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26: 1231-1237.

11. Rudic V. ș.a. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. Ch.: Elena VI, 2007, 362 p.

12. Sekar S., Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. In: J Appl Phycol, 2008, vol. 20, p.113-136.

13. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. In: Mar Drugs, 2011, vol.9, p.1101-1118.