

PROCEDEU INOVATIV DE SPORIRE A CONȚINUTULUI DE POLIZAHARIDE ACIDE LA CIANOBACTERIA *SPIRULINA PLATENSIS*

DR. LILIANA ZOSIM,

CONFERENȚIAR- CERCETĂTOR, CERCETĂTOR ȘTIINȚIFIC SUPERIOR LCȘ „FICBIOTEHNOLOGIE”,
INSTITUTUL DE CERCETARE ȘI INOVARE, UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

DR. VALENTINA BULIMAGA,

CONFERENȚIAR- CERCETĂTOR, CERCETĂTOR ȘTIINȚIFIC COORDONATOR, LCȘ „FICBIOTEHNOLOGIE”,
INSTITUTUL DE CERCETARE ȘI INOVARE, UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA,

DOC. HAB., ACAD. VALERIU RUDIC,

PROFESOR UNIVERSITAR, ȘEFUL CENTRULUI CERCETĂRI BIOTEHNOLOGICE, INSTITUTUL
DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

DOC. HAB., ACAD. AURELIAN GULEA,

PROFESOR UNIVERSITAR, ȘEF DE LABORATOR LCȘ „MATERIALE AVANSATE ÎN BIOFARMACEUTICĂ
ȘI TEHNICĂ”, INSTITUTUL DE CERCETARE ȘI INOVARE, UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA,

DR. VICTOR ȚAPCOV, CONFERENȚIAR UNIVERSITAR, CERCETĂTOR ȘTIINȚIFIC COORDONATOR,

LCȘ „MATERIALE AVANSATE ÎN BIOFARMACEUTICĂ ȘI TEHNICĂ”, INSTITUTUL DE CERCETARE
ȘI INOVARE, UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA

POLIZAHARIDELE REPREZINTĂ RESURSE REGENERABILE CARE FAC PARTE DINTR-O CLASĂ IMPORTANTĂ DE MATERIALE POLIMERICE DE INTERES BIOTEHNOLOGIC. DATORITĂ PROPRIETĂȚILOR SALE CHIMICE, FIZICE ȘI BIOLOGICE, POLIZAHARIDELE OFERĂ O MARE VARIETATE DE PRODUSE POTENȚIAL UTILE PENTRU OMENIRE. UNELE POLIZAHARIDE INTRA- ȘI EXTRACELULARE DIN MICROALGE ȘI CIANOBACTERII AU DIFERITE BIOACTIVITĂȚI CARE IMPLICĂ ACTIVITATE ANTITUMORALĂ, ANTIINFLAMATORIE ȘI ANTIVIRALĂ, OFERIND PERSPECTIVE PROMIȚĂTOARE PENTRU APLICAȚII FARMACEUTICE [1, 3,7-9].

De asemenea, este cunoscut că biomasa de spirulină conține polizaharide cu activitate biologică pronunțată, în special polizaharide sulfatate. Polizaharidele sulfatate posedă nu doar proprietăți anticoagulante, dar sunt și inhibitori ai unor tumori, afectând direct celulele tumorale. Ele s-au manifestat și ca inhibitori ai virusului HIV de tip 1 și 2 [4, 6].

În cercetările anterioare întreprinse în LCȘ „Ficbiotehnologie” în calitate de reglatori chimici ai sintezei substanțelor bioactive la cianobacteria *Spirulina platensis* au fost utilizați unii compuși chimici, precum și un șir de compuși coordinați ai Zn (II), Fe(III), Cr(III) etc.[5]. Utilizarea reglatorilor chimici în ficbiotehnologie s-a soldat cu elaborarea unui șir

de procedee de sporire a productivității spiulinei și a conținutului de substanțe bioactive în biomasă, inclusiv și a bioelementelor.

Este actuală investigarea unor reglatori chimici noi cu conținut de molibdeniu, dat fiind rolul important al acestui microelement în metabolismul organismelor procariote și eucariote. Molibdenul este un microelement esențial pentru organismul uman. El joacă rolul-cheie în formarea/activarea aldehidoxidazei, care contribuie la detoxifierea aldehydei acetice – o substanță toxică care poate provoca cancerul. Molibdenul mai este cofactorul enzimei sulfitoxidazei. El este foarte important în tratarea bolnavilor cu astmă și alte afecțiuni respiratorii care sunt sensibili la sulfiți. Molibdenul poate preveni anemia prin suportul mobilizării fierului și majorării nivelului lui în organism.

În acest context, îmbogățirea biomasei de spirulină cu molibden și alte substanțe bioactive, cum sunt polizaharidele acide și sulfatate ar deschide noi perspective în vederea obținerii și utilizării spirulinei cu noi proprietăți curative. A prezentat interes utilizarea unui compus coordinațiv nou – $(PPh_4)_2[Mo_2O_2S_2(IDA)_2] \cdot 2,8H_2O$ (ce conține cationul

hidrofobic tetrafenilfosfoniu și cationul $[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2]^{2+}$ în calitate de sursă de molibden la cultivarea spirulinei, precum și studiul efectului acestui compus asupra producerii polizaharidelor acide.

Astfel, scopul cercetării a constituit elaborarea unui procedeu nou de sporire a conținutului de polizaharide acide la cianobacteria *Spirulina platensis* cu utilizarea în calitate de regulator a compusului coordinativ $(\text{PPh}_4)_2[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2(\text{IDA})_2] \cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$.

Materiale și metode de cercetare

Ca obiect de studiu a servit tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-11-(CYANOPHYTA) depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Nematogene al IMB al AȘM.

Cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* a fost efectuată pe durata de 10 zile în prezența sursei de molibden: MoO_3 în calitate de probă de referință și compusul coordinativ $(\text{PPh}_4)_2[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2(\text{IDA})_2] \cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$, suplimentate în a 2-a zi de cultivare, la iluminarea de 3-4,8 mii lucși și temperatura de 30-35°C. La a 10-a zi de cultivare biomasa a fost separată de lichidul cultural prin filtrare, a fost spălată cu soluție de 1,5% acetat de amoniu și resuspendată în apă (10mg/ml). Extragerea polizaharidelor a fost efectuată cu apă bidistilată în raport de 1:4 (V/V) la fierbere pe baia de apă, timp de 60 min. După centrifugare, în extract a fost determinat conținutul de glucide și polizaharide acide și sulfatate.

În cazul polizaharidelor acide și sulfatate fracția de proteine din extract a fost înlăturată prin precipitare cu soluție de 20% acid tricloracetic în raport de 3:1 (V:V). Productivitatea spirulinei a fost determinată fotocolorimetric cu recalculul masei celulare la biomasa absolut uscată. Conținutul de glucide a fost apreciat prin metoda spectrofotometrică cu reagentul Antron sulfuric. Conținutul de polizaharide acide și sulfatate a fost determinat cu reagentul alcian blue la două valori ale pH-ului: pH 2,4 și 1,5, respectiv.

Rezultate și discuții

A fost studiat conținutul glucidelor totale și al polizaharidelor acide și sulfatate extrase din biomasa de spirulină cultivată 10 zile în prezența sursei de molibden: MoO_3 și $(\text{PPh}_4)_2[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2(\text{IDA})_2] \cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$, suplimentate în a 2-a zi de cultivare. Analiza rezultatelor obținute în prezentul studiu (Tab. 1) a scos în evidență faptul că la cultivarea spirulinei cu utilizarea compusului coordinativ al Mo(VI) ce includea concentrații de 2,95 și 4,425 mg/l de Mo se observă o creștere mai esențială a conținutului de polizaharide acide (2,08 și 2,22%, respectiv, sau de 1,5 și 1,82 ori mai mult) față de conținutul acestora în biomasa de spirulină cultivată cu adaos de MoO_3 constituind 1,38 și 1,20%, respectiv. Aceeași legitate se observă și la fracțiile de polizaharide sulfatate (incluse în polizaharidele acide) înregistrând valori cantitative de 1,76-1,82 ori mai înalte față de cele obținute în cazul cultivării spirulinei în prezența MoO_3 .

Tabelul 1
Conținutul de glucide, polizaharide acide și sulfatate în biomasa de spirulină cultivată în prezența diferitor surse de molibden [2]

Compusul molibdenului	Concentrația Mo, mg/l	Conținutul de glucide*, % din BAU	Conținutul de polizaharide*, % din biomasă	
			Acide	Sulfatate
MoO_3	0,01 (Martor)	10,60	1,18	0,09
	2,950	11,16	1,38	0,10
	4,425	11,68	1,20	0,08
	5,900	12,76	1,16	0,08
	7,375	13,22	1,11	0,08
	8,850	12,01	0,99	0,07
	10,325	11,96	0,88	0,06
$(\text{PPh}_4)_2[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2(\text{IDA})_2] \cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$	2,950	13,11	2,08	0,18
	4,425	13,02	2,22	0,17
	5,900	11,99	1,57	0,15
	7,375	11,10	1,40	0,13
	8,850	12,99	1,59	0,14
	10,325	12,84	1,39	0,12

* $p \leq 0,05$

În baza datelor obținute a fost elaborat un procedeu inovativ de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*.

Acest procedeu de cultivare include etapele: inocularea spirulinei pe un mediu nutritiv, ce conține următoarele componente, g/L: NaHCO_3 - 16,80, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,50, NaNO_3 - 2,50, NaCl - 1,00, K_2SO_4 - 0,50, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,04, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,20, H_3BO_3 -

0,00286, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,00181, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,000015, FeSO_4 - 0,01, EDTA - 0,08, sursă de molibden și apă, cultivarea ei la iluminarea de 3-4,8 mii lucși, la temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ în decurs de 7-8 zile, caracterizat prin aceea că în calitate de sursă de molibden în a 2-a zi de cultivare se adaugă la mediu 20-30 mg/l de compus coordinativ $(\text{PPh}_4)_2[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2(\text{IDA})_2] \cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$ (Fig.1).

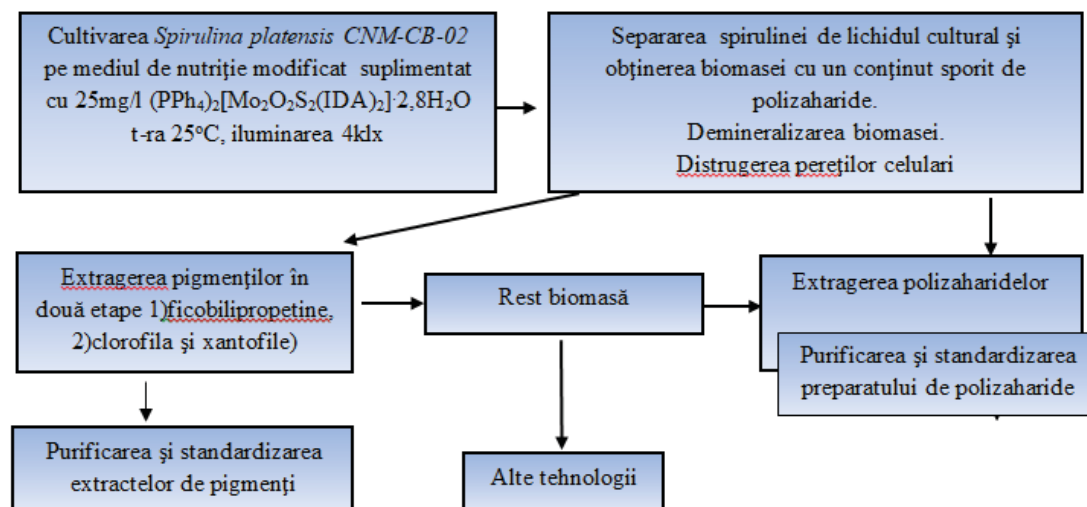


Figura 1. Shema de realizare a procedurii de sporire a conținutului de polizaharide acide la cianobacteria *Spirulina platensis* și de obținere a preparatului de polizaharide

Concluzii

În premieră în biotehnologia cultivării cianobacteriei *Spirulina platensis* a fost utilizat compusul coordinativ al molibdenului $(\text{PPh}_4)_2[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2(\text{IDA})_2] \cdot 2,8\text{H}_2\text{O}$ ce conține în componența sa nu doar molibden sub formă de cationul $[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2]^{2+}$, dar și cationul hidrofobic – tetraphenylphosphonium. A fost elaborat un procedeu nou de sporire a conținutului de polizaharide acide la cianobacteria *Spirulina platensis* cu utilizarea în calitate de reglator a compusului coordinativ al Mo(VI) și propusă schema de realizare a procedurii și de obținere a polizaharidelor din biomasa de spirulină.

REFERINȚE

1. DE JESUS RAPOSO, M., DE MORAIS, A., DE MORAIS, R. *Marine polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications*. Mar Drugs. 2015, Vol.13, no 5, p. 2967–3028.
2. FLOQUET, S., CADOT, E., HIJAZI, A., GULEA, A., ȚAPCOV, V., BULIMAGA, V., ZOSIM, L., RUDIC, V. *Hi-*

*drat de bis[(iminodiacetat)oxotiomolibdat(V)] de tetrafenilfosfoniu și procedeu de cultivare a microalgei *Spirulina platensis* cu utilizarea acestuia*. Brevet de invenție 4319 MD. Data eliberării 2015.08.31.

3. MAJEE, S., AVLANI, D., BISWAS, G. *Pharmaceutical, pharmaceutical, cosmetic and diagnostic applications of sulfated polysaccharides from marine algae and bacteria*. Afr. J. Pharm. Pharmacol., 2017, Vol.11, no.5, p. 68-77.

4. MCCLURE, M., MOORE, J., BLANCO, D., SCOTTING, P., COOK, G., KEYNER, R., WEBER, J., DAVIES, D., WEISS, R. *Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro*. AIDS Res Human Retroviruses. 1992; Vol.8, p.19–26.

5. RUDIC, V. et.al. *Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău: Elena V.I., 2007. 364 p.

6. SCHAEFFER, D., KRYLOV, V. *Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria*. Ecotox Environ Safe. 2000, Vol.45, p.208–227.

7. SINGH, S. DAS, S. *Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, Vol. 27, no 9, p. 1971–1980.

8. SUTHERLAND, I. *Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides*. Biotech Adv, 1994, no.12, p.393–448.

9. TALYSHINSKY, M., SOUPRUN, Y., HULEIHEL, M. *Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses*. Cancer Cell Int., 2002, Vol. 2, p.1– 8.

Acknowledgment

Aducem mulțumiri colegilor francezi dr. în chimie: Floquet Sébastien, Cadot Emmanuel și Hijazi Akram, pentru colaborare și amabilitatea de a ne oferi compusul coordinativ sintetizat $(PPh_4)_2[Mo_2O_2S_2(IDA)_2] \cdot 2,8H_2O$.

REZUMAT

Procedeu inovativ de sporire a conținutului de polizaharide acide la cianobacteria *Spirulina platensis*. A fost elaborat un procedeu inovativ de sporire a conținutului de polizaharide acide la cianobacteria *Spirulina platensis*,

cultivată în prezența compusului coordinativ $(PPh_4)_2[Mo_2O_2S_2(IDA)_2] \cdot 2,8H_2O$. A fost propusă schema integrală de realizare a procedului de cultivare a spirulinei și de obținere a polizaharidelor din biomasă.

Cuvinte-cheie: polizaharide, cianobacteria *Spirulina platensis*, microalge, ficobiotehnologie, organisme procariote și eucariote, molibden.

ABSTRACT

Innovative Process for Increasing the Content of Acid Polysaccharides in *Spirulina platensis* cyanobacterium. An innovative process to increase the content of acid polysaccharides in *Spirulina platensis* cyanobacterium, cultivated in the presence of coordinative compound $(PPh_4)_2[Mo_2O_2S_2(IDA)_2] \cdot 2,8H_2O$ has been developed. The complete scheme for the realization of the process for cultivating spirulina and producing polysaccharides from biomass has been proposed.

Keywords: polysaccharides, *Spirulina platensis* cyanobacterium, microalgae, phycobiotechnology, prokaryotic and eukaryotic organisms, molybdenum.