

CAPACITATEA ANTIOXIDANTĂ A FRAȚIILOR DE PEPTIDE OBȚINUTE DIN FICOCIANINĂ LA HIDROLIZA ENZIMATICĂ

*Valentina BULIMAGA¹, Angela RUDAKOVA¹, Ludmila RUDI²,
Maria PISOVA¹, Liliana ZOSIM¹, Natalia CLIMOVA¹*

¹Universitatea de Stat din Moldova,

²Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

Investigațiile unor cercetători au demonstrat că peptidele bioactive obținute din proteine alimentare manifestă proprietăți antimicrobiene, antihipertensive, antitrombotice și de diminuare a nivelului de colesterol, de îmbunătățire a absorbției minerale, precum și efect imunomodulator [1]. Un interes sporit față de identificarea unor noi peptide bioactive de origine naturală a permis comunității științifice să cerceteze nu doar plantele, dar și algele ca o resursă abundentă de substanțe cu efect benefic asupra organismului uman.

Spirulina este pe larg utilizată în ultimele decenii nu doar în alimentație, dar și în scopuri medicinale, datorită proprietăților sale nutritive și curative înalte. Un interes aparte din punct de vedere aplicativ prezintă ficobiliproteinele (proteine-pigmenți) din spirulină, în special C-ficocianina, care posedă un șir de proprietăți bioactive, astfel ca efect antitumoral, activitate antivirală și antioxidantă, acțiune hematopoietică, antialergică și imunomodulatorie [2-6]. Cu toate că a fost stabilită activitatea antitumorală a ficocianinei, totuși cercetările referitoare la activitatea biologică a peptidelor obținute prin hidroliza enzimatică a ficocianinei sunt într-un număr foarte limitat [7,8]. Există oportunități enorme de a valorifica eficient peptidele bioactive obținute din ficocianină pentru utilizarea lor în tratamentul, prevenirea și atenuarea diferitelor afecțiuni, inclusiv a cancerului. Scopul lucrării a constituit studiul capacității antioxidante a peptidelor produse din ficocianină la hidroliza ei cu tripsina și pepsina.

Materiale și metode de investigații. Ficocianina a fost extrasă și purificată conform schemei descrise anterior [8]. Hidroliza ficocianinei a fost efectuată cu tripsină sau papaină în raport de 1:10 și 1:100, în decurs de 6 ore. Hidroliza enzimatică a soluției de ficocianină (3mg/ml) a fost efectuată în soluție 0,5M NaCl, pH 8,0, în prezența mercaptoetanolului (2mcl/ml), la temperatura de 30°C. După dializă

proteina nehidrolizată a fost separată de fracția peptidică prin filtrare cu centricon (cut-off <30 kDa). Conținutul de peptide a fost determinat prin metoda Lowry. Fracțiile obținute au fost păstrate la -20°C și decongelate înainte de utilizare.

Activitatea antioxidantă a fracțiilor de peptide a fost determinată prin metoda ABTS⁺.

Rezultate și discuții. Obținerea hidrolizatelor de peptide din ficocianină a inclus etapele:

- Prepararea soluției sau suspensiei de ficocianină supusă hidrolizei;
- Ajustarea pH-ului de hidroliză (acid/alcalin) în funcție de enzima utilizată pentru hidroliză și selectarea temperaturii optime, precum și a raportului enzimă/proteină și a duratei de hidroliză;
- Inactivarea enzimei;
- Procesul de posthidroliză (separarea hidrolizatului de peptide de fracția proteică nehidrolizată, separarea fracțiilor de peptide, determinarea lor calitativă și cantitativă);
- Concentrarea și conservarea peptidelor bioactive.

În hidrolizatele peptidice ale ficocianinei, obținute după separarea proteinei nehidrolizate la filtrare prin centricon (cut off 30kDa), a fost determinată activitatea lor antioxidantă, fiind precedată de determinarea cantitativă a conținutului de peptide prin metoda Lowry și standardizarea probelor (Tab.).

Tabel

Capacitatea antioxidantă a fracțiilor de peptide obținute din ficocianină la hidroliza ei cu tripsina și papaina, determinată prin metoda ABTS⁺ (Abs 734nm)

Nr. probei analizate	Proba de polipeptide obținute din ficocianină (0,5 mg/ml)	% de inhibiție
1	Proba de referință – ficocianina	56,70
2	Hidrolizat cu tripsină – 1 (<30kDa)	83,27
3	Hidrolizat cu tripsină – 2 (<30kDa)	89,37
4	Hidrolizat cu tripsină – 3 (<30kDa)	65,69
5	Hidrolizat cu papaină – 1 (<10kDa)	13,86
6	Hidrolizat cu papaină – 2 (<30kDa)	97,02

Studiul comparativ al hidrolizatorilor peptidice ale ficocianinei (Tab.) scoate în evidență activitatea antioxidantă maximă a hidrolizatului cu papaina (97,02% de inhibiție), care întrece valoarea probei de referință (56,7%) de 1,71 ori. Hidrolizatele peptidice cu tripsina din trei experimente diferite (probele 2, 3 și 4) atestă, de asemenea, valori relativ înalte (83,27; 89,37 și 65,69% inhibiție, respectiv), ce depășesc capacitatea antioxidantă a ficocianinei de 1,15-1,57 ori. Hidrolizatul peptidic cu papaină cu masa moleculară <10kDa posedă o capacitate antioxidantă minimă (13,86%). Rezultatele obținute indică asupra faptului că la separarea peptidelor bioactive din ficocianină prin filtrare cu centricon este rațională utilizarea membranei cu dimensiunile porilor mai mari (cut-off <30kDa), deoarece permite obținerea unui spectru mai larg de peptide. Astfel, se evită pierderile cauzate de acumularea unor peptide pe suprafața membranei la filtrare din cauza gradientului de presiune, ceea ce afectează transportul lor selectiv prin membrana cu pori de dimensiuni mai mici (cut-off <10kDa).

După cum am menționat *supra* și conform datelor din literatură, varierea spectrului de peptide poate fi realizată la hidroliza ficocianinei cu enzime de specificitate diferită și depinde și de alți factori. Pentru a optimiza procesul hidrolitic de producere a peptidelor antioxidante din ficocianină cu alcalaza, cercetătorii chinezi au studiat efectul raportului [E]/[S], a temperaturii și duratei de enzimoliză asupra gradului de hidroliză. Condițiile de hidroliză optime pentru prepararea peptidelor din ficocianină au fost următoarele: temperatura enzimolizei – 44.9°C, durata – 6,4 ore și [E]/[S] – 3,6%. În acest caz, a fost obținut un hidrolizat de peptide din șocianină cu o capacitate de anihilare a radicalilor anionului de superoxid de 75,39% [7]. Astfel, rezultatele cercetărilor noastre demonstrează că peptidele produse din ficocianină la hidroliza ei cu tripsina și papaina posedă valori sporite ale capacității antioxidante și care întrec valoarea capacității antioxidante a ficocianinei de 1,15-1,57 ori și de 1,71 ori, respectiv. Hidrolizatul papaic cu conținut de peptide cu masa moleculară mai joasă (cut-off <10kDa) a manifestat o capacitate antioxidantă de circa 4 ori mai joasă, comparativ cu cea a ficocianinei, fapt cauzat de pierderea unor peptide acumulate pe membrană pe parcursul filtrării.

Concluzii:

1. Pigmentul purificat ficocianina și hidrolizatele peptidice produse la enzimoliza ficocianinei cu tripsina și pepsina (separate de

proteina nehidrolizată la filtrare prin membrană (cut-off<30kDa)) posedă o capacitate antioxidantă înaltă, valorile maxime fiind atestate cu preponderență pentru hidrolizatele peptidice.

Referințe:

1. RUTHERFURD-MARKWICK, K.J., MOUGHAN, P.J. Bioactive peptides derived from food. In: *J AOAC Int.*, 2005, vol.88, no.3, p.955-966.
2. 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.
3. ZHOU, Z.P. et al. Factors that effect antioxidant activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. In: *Journal of Food Biochemistry*, 2005, vol.29, p.313-322.
4. WANG, H. *The phycocyanin/beta-protein inhibits cancer cells proliferation* / Thesis for master degree, 2008. 70 p.
5. 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, no.4, p.733-738.
6. FERNÁNDEZ-ROJAS, B., HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J., PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. In: *J. Functional Foods*, 2014, vol.11, p.375-392. DOI:10.1016/j.jff.2014.10.011.
7. TANG, Z. H., JIAO, X.D , ZHOU, Y.I, et al. Optimization for antioxidant phycocyanin peptide production by enzyme hydrolysis using response surface methodology. In: *Marine Science*, 2012, vol. 36, no. 11, p.54-60.
8. BULIMAGA V. et al. Peptide bioactive algale și perspectiva de utilizare a lor în calitate de agenți terapeutici. În: *Studia Universitatis, Seria „Științe ale naturii”*, 2015, nr.1 (81), p.109-116.