

STUDIUL ACȚIUNII COMPUȘILOR COORDINATIVI NOI AI Fe(III) ȘI AI Cr(III) ASUPRA PROCESULUI DE ACUMULARE A UNOR PRINCIPII BIOACTIVE ÎN BIOMASA DE SPIRULINĂ

Daniela CIUMAC, Liliana ZOSIM*, Tatiana CHIRIAC, Denis PRODIUS, Olga OLAN*,
Veaceslav POPA, Daniela SADOVNIC, Iulia IAȚCO, Cornel CORDELEANU, Veronica DONI**

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

* LCȘ „Ficobiotehnologie”

** Institutul de Chimie al AȘM

The study of stimulative effect of some Fe(III) heterotrinnuclear clusters and Cr(III) coordinative compounds on peptides and proteins content in *Spirulina platensis* biomass has been carried out.

The protein content decreases with the growth of concentrations in the case of utilization of all coordinative compounds tested. The peptides content increases in the limits of 5,00-50,00 mg/l for Fe(III) coordinative compounds and 10,00-40,00 mg/l for Cr(III) coordinative compounds.

Introducere

Reprezentantele genului *Spirulina* (*Oscillatoriales*): *S. subsalsa*, *S. maxima* și, în special, *S. platensis* sunt printre cele mai solicitate la momentul actual obiecte ale explorărilor biotehnologice. O sursă importantă de compuși bioactivi valoroși, spirulina, revine în atenția cercetătorilor biotehnologi prin capacitatea înaltă de acumulare și biotransformare a macro- și microelementelor în elemente legate organic – bioelemente, capacitate valorificată pentru obținerea de noi preparate antianemice, hepatoprotectoare, antidiabetice, anticancerigene [3,8,10,17,18,20,21]. Cu toate că spirulina a servit ca obiect de studiu în numeroase cercetări biotehnologice și biomedicale, mai rămân neexplorate și alte posibilități de modificare a potențialului ei biosintetic.

Numeroase cercetări întreprinse în ultimii ani au demonstrat că obținerea conținutului maxim al unor principii bioactive în biomasa de spirulină poate fi prognozată prin dirijarea unor căi metabolice aparte, modificând componența mediului nutritiv, parametrii cultivării: intensitatea luminii, durata cultivării, temperatura și pH-ul mediului, sau utilizând unii compuși coordinativi ai metalelor [3,9,10,16,17].

Cromul și fierul reprezintă microelemente de o importanță majoră pentru organismul uman. Se știe că fierul intră în componența hemoglobinei, participă în reacțiile de oxidoreducere, iar carența lui în organismul uman duce la anemie. Cromul, la rândul său, participă în metabolismul glucozei servind în calitate de stimulator al activității insulinei, făcând parte din structura factorului de toleranță al glucozei, reglementează distribuția internă a energiei, facilitează asimilarea aminoacizilor și intensifică majoritatea proceselor metabolice [1,6,15]. Remediile antidiabetice propuse azi pe piața farmaceutică sunt obținute în urma sintezei chimice, iar unele din ele s-au dovedit a avea efecte nocive, precum afectarea procesului de replicare a ADN-ului, apariția tumorilor cancerigene etc. De menționat că preparatele utilizate în prezent pentru tratarea anemiei sunt slab efective, deoarece fierul se află sub formă de săruri simple, relativ toxice pentru organism, administrarea lor fiind însoțită de numeroase reacții adverse [1,5,7,14]. Din aceste considerente, remediile care urmează a fi utilizate în profilaxia și tratamentul acestor afecțiuni trebuie direcționate spre o eficiență sporită, reducând la minim apariția reacțiilor adverse, impunându-se astfel necesitatea de a căuta și a evidenția unele surse alternative de crom și fier. Drept sursă de crom și fier poate servi biomasa de spirulină cultivată în prezența unor compuși coordinativi ai Cr(III) și Fe(III). Obținerea unei biomase de spirulină cu un conținut majorat de crom și fier metabolizate ar putea contribui la ameliorarea stării unui număr impunător de bolnavi de diabet zaharat și anemie fierodeficientă. Pentru utilizarea în scopuri profilactice și terapeutice a biomasei de spirulină îmbogățite cu fier sau crom, obținute la cultivare în prezența unor compuși coordinativi ai Fe(III) și Cr(III), trebuie stabilită componența ei biochimică. Scopul prezentului studiu constă în a efectua analiza modificării conținutului de proteine și peptide în biomasa de spirulină cultivată în prezența noilor compuși coordinativi ai Fe(III) și Cr(III).

Material și metode

Obiectul cercetărilor expuse a fost tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neptogene de pe lângă Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM. Pentru cultivare s-a utilizat mediul nutritiv mineral *SP-1* cu o compoziție echilibrată de macro- și micronutrienți necesari creșterii și dezvoltării spirulinei [11].

În calitate de reglatori ai creșterii și activității biosintetice a *S. platensis* au fost utilizați 4 compuși coordinativi ai Cr(III): $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6\text{Cl}_3$, $\text{Ca}[\text{Cr}(\text{EDTA})]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Cr}(\text{HSSA})]_2\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{EDTA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sintetizați și acordați cu amabilitate de către Aurelian Gulea, membru corespondent al AȘM, șeful Catedrei Chimie Anorganică și Fizică a USM, și 6 compuși coordinativi ai Fe(III): $[\text{Fe}_2\text{NiO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$, $[\text{Fe}_2\text{MgO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$,

$[\text{Fe}_2\text{CoO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$, $[\text{Fe}_2\text{Ca}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$, $[\text{Fe}_2\text{MnO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$, $[\text{Fe}_2\text{ZnO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$ sintetizați și acordați cu amabilitate de colaboratorii Laboratorului „Chimie Bioanorganică” de la Institutul de Chimie al AȘM, sub conducerea membrului corespondent al AȘM Constantin Turta.

Determinarea productivității spirulinei s-a efectuat fotocolorimetric prin recalcularea masei celulare la biomasa absolut uscată (BAU) conform metodei descrise în [10,13].

Cantitatea de proteină și peptide în biomasa de spirulină a fost determinată prin metode spectrofotometrice specificate în [12].

Analiza statistică și regresională a valorilor obținute în trei serii de determinări ale productivității și conținutului de principii bioactive a fost realizată prin metodele propuse de Maximov [19].

Rezultate și discuții

Spirulina se caracterizează printr-o plasticitate înaltă la acțiunea diversilor factori, fapt ce se răsfrânge și asupra parametrilor biochimici. Pentru a stabili efectul acțiunii compușilor coordinativi ai Fe(III) și Cr(III) asupra stării fiziologice a spirulinei, ne-am propus să stabilim modificarea conținutului de proteină și peptide în biomasa de spirulină cultivată în prezența acestor compuși coordinativi. Rezultatele obținute sunt prezentate în figurile 1-2 și în Tabelul 1.

În mod general, utilizarea sărurilor anorganice ale Cr(III) în concentrații mai mici decât cele testate în cercetările noastre pentru compușii coordinativi provoacă degradarea structurilor interne, micșorarea conținutului de pigmenți și proteină. În cazul nostru, aceste procese sunt prevenite de prezența ligandului, care în complex cu Cr(III) diminuează acțiunea lui toxică. Totuși, nu putem neglija faptul că, odată cu creșterea concentrațiilor compușilor, la valori mai mari de 20-30 mg/l, se observă o reducere semnificativă a conținutului de proteine (Fig.1).

Compușii $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$ și $[\text{Cr}(\text{HSSA})_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ au demonstrat un efect stimulator nesemnificativ asupra procesului de acumulare a proteinelor, sporul maximal constituind 9% (Fig.1).

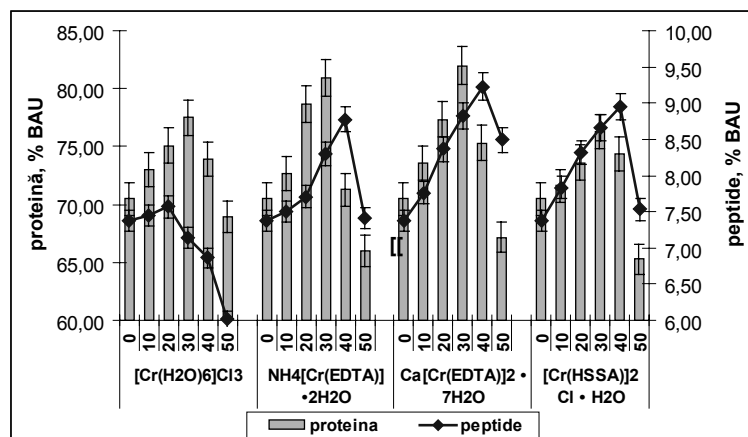


Fig.1. Modificarea conținutului de proteină și peptide în biomasa de spirulină la cultivare în prezența unor compuși coordinativi ai Cr(III).

Un conținut mai mare de proteine cu 11,5-16,3% a fost obținut la administrarea compușilor $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{EDTA})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Ca}[\text{Cr}(\text{EDTA})]_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ în concentrații de 30 mg/l.

Compușul coordinativ $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$ manifestă un efect nefast asupra acumulării peptidelor, al cărui conținut scade semnificativ la administrarea acestui metalocomplex. Pentru ceilalți trei compuși ai Cr(III) supuși testării am remarcat o majorare a conținutului de peptide cu 19,1-26,2% față de martor la utilizarea a 40 mg/l de metalocomplex. Un conținut majorat de peptide a fost obținut la utilizarea a 40 mg/l de $[\text{Cr}(\text{HSSA})]_2\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Fig.1). Conform datelor din literatură, utilizarea acidului salicilic la cultivarea algei verzi *Chlorella vulgaris* a dus la majorarea conținutului de proteină cu până la 60% față de proba de referință [4]. Deci, majorarea conținutului de peptide cu până la 20% față de proba de referință, în biomasa de spirulină cultivată în prezența $[\text{Cr}(\text{HSSA})]_2\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ se datorează, posibil, implicării restului acidului salicilic în procesul de sinteză a fracțiilor proteice. Majorarea cantității de peptide la cultivarea spirulinei în prezența $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{EDTA})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și a $\text{Ca}[\text{Cr}(\text{EDTA})]_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se datorează, probabil, prezenței în sfera internă a compușilor coordinativi a ligandului EDTA, care în urma degradării eliberează aminoacizi, ce se pot include în structura fitochelatinelor – peptide implicate în procesul de stocare intracelulară a metalelor [2].

Analiza comparativă a conținutului de peptide și proteine determinat în biomasa de spirulină cultivată în prezența compușilor coordinativi ai Cr(III) relevă faptul că pentru conținutul maxim de proteine am stabilit concentrația optimă de 30 mg/l, după care în biomasă scade ponderea proteinelor și crește cea a peptidelor. Dar, pentru ambele fracții proteice din biomasa spirulinei concentrațiile mai mari de 40 mg/l de metalocomplex au demonstrat un efect toxic, care se manifestă prin reducerea semnificativă a conținutului de proteine și peptide.

Al doilea grup de metalocomplecși testați l-au format compușii coordinativi heterotrinerari ai Fe(III) cu calciu, magneziu, mangan, nichel, cobalt și zinc. Rezultatele studiului comparativ al influenței diferitelor concentrații ale com-

pușilor coordinativi ai Fe(III) asupra conținutului de proteine în biomasa de spirulină sunt expuse în Tabelul 1. Datele obținute în experiențe denotă că pentru compușii $[\text{Fe}_2\text{ZnO}]$, $[\text{Fe}_2\text{MnO}]$ și $[\text{Fe}_2\text{CoO}]$ valorile experimentale obținute depășesc valoarea matorului cu 8-27% doar la administrarea compușilor în concentrații de până la 20 mg/l. Conținutul de proteine scade odată cu creșterea concentrației compușilor coordinativi pentru toate cazurile studiate, cele mai mari valori înregistrându-se la administrarea concentrației minime de compuși, valorile fiind cu 4,73-28,67% mai mari ca în proba mator. Pentru compușii $[\text{Fe}_2\text{MgO}]$ și $[\text{Fe}_2\text{CaO}]$, deși odată cu creșterea concentrației de compuși descrește conținutul de proteine, valorile cantitative totuși se mențin la nivelul matorului. Pentru compusul $[\text{Fe}_2\text{NiO}]$ s-au semnalat valori mai sporite față de proba mator doar la administrarea concentrației de 5 mg/l de compus, iar la administrarea concentrației de 20 mg/l de compus conținutul de proteine scade cu 15% față de proba mator, constituind doar 52,88% din BAU. Conținutul maxim de proteine a fost obținut în cazul administrării $[\text{Fe}_2\text{CaO}](5 \text{ mg/l})$ și $[\text{Fe}_2\text{ZnO}](5 \text{ mg/l})$, valorile fiind, respectiv, cu 27,53 și 28,67% mai mari ca în proba mator (Tab.1).

Tabelul 1

**Conținutul de proteine determinat în biomasa de spirulină cultivată
în prezența compușilor coordinativi heterotrinerari ai Fe(III)**

Compusul	Concentrația compusului, mg/l	Proteine	
		%BAU	% M
		$\bar{X} \pm tS_x$	
Mator	0,00	62,15±1,52	100,00
$[\text{Fe}_2\text{MgO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$ - $[\text{Fe}_2\text{MgO}]$	5,00	74,78±1,14	120,32
	10,00	74,04±2,32	119,13
	20,00	67,51±2,20	108,62
	30,00	66,58±1,58	107,13
	40,00	64,90±2,79	104,42
	50,00	63,41±3,12	102,02
$[\text{Fe}_2\text{ZnO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$ - $[\text{Fe}_2\text{ZnO}]$	5,00	79,26±1,49	127,53
	10,00	76,46±2,12	123,02
	20,00	62,85±2,58	101,13
	30,00	61,54±1,32	99,02
	40,00	59,86±2,12	96,31
	50,00	57,81±2,01	93,02
$[\text{Fe}_2\text{CaO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$ - $[\text{Fe}_2\text{CaO}]$	5,00	79,97±1,29	128,67
	10,00	74,6±2,45	120,03
	20,00	70,49±2,74	113,41
	30,00	66,95±2,32	107,72
	40,00	63,96±2,20	102,91
	50,00	63,03±1,78	101,41
$[\text{Fe}_2\text{MnO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$ - $[\text{Fe}_2\text{MnO}]$	5,00	70,65±1,23	113,67
	10,00	68,23±3,35	109,78
	20,00	61,26±2,69	98,56
	30,00	56,44±4,29	90,81
	40,00	52,70±3,17	84,79
	50,00	49,70±2,12	79,96
$[\text{Fe}_2\text{CoO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$ - $[\text{Fe}_2\text{CoO}]$	5,00	72,61±2,27	116,83
	10,00	67,54±6,28	108,67
	20,00	61,50±3,63	98,95
	30,00	54,60±1,41	87,85
	40,00	52,29±3,27	84,13
	50,00	48,16±2,90	77,48
$[\text{Fe}_2\text{NiO}(\alpha\text{-fur})_6(\text{THF})_3]$ - $[\text{Fe}_2\text{NiO}]$	5,00	65,09±1,57	104,73
	10,00	56,09±2,16	90,24
	20,00	52,88±1,78	85,08

O situație contrară se observă în cazul peptidelor. Conținutul lor crește odată cu mărirea concentrației de compus coordinativ în mediu de cultivare a spirulinei (Fig.2). La concentrații ce depășesc 20 mg/l pentru compușii $[\text{Fe}_2\text{CaO}]$, $[\text{Fe}_2\text{MgO}]$, $[\text{Fe}_2\text{ZnO}]$, $[\text{Fe}_2\text{MnO}]$ și $[\text{Fe}_2\text{CaO}]$ și la concentrații ce depășesc 10 mg/l pentru compușii $[\text{Fe}_2\text{NiO}]$ și $[\text{Fe}_2\text{CoO}]$ conținutul de peptide întrece cu 4-43,4% valoarea matorului.

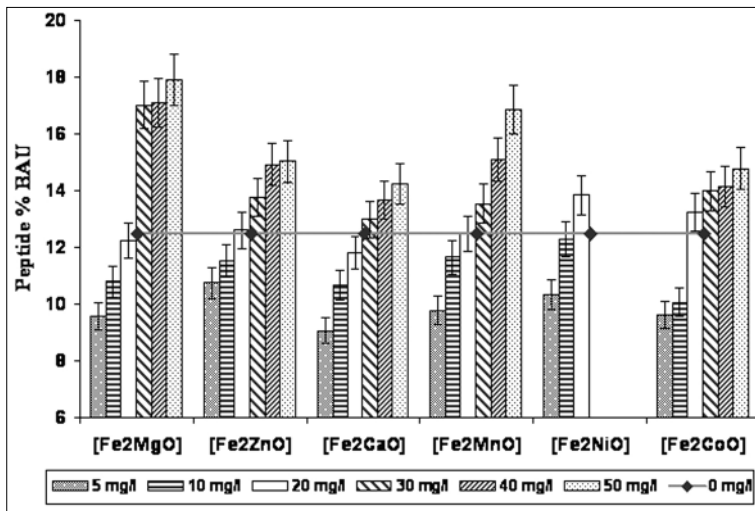


Fig.2. Modificarea conținutului de peptide în biomasa de spirulină la cultivare în prezența unor compuși coordinați ai Fe(III).

Astfel, conținutul peptidelor atinge valori cu 14,26-43,43% mai sporite ca în proba martor la concentrația maximă de compuși coordinați (50 mg/l), valorile cantitative constituind 14,26-17,90% din BAU (Fig.2). Se remarcă o legătură pentru toți compușii coordinați cercetați, și anume: că odată cu creșterea concentrației de compuși coordinați în mediul de cultivare are loc creșterea conținutului de peptide pe fondul descreșterii conținutului de proteine.

Concluzii

- Odată cu creșterea concentrațiilor compușilor coordinați ai Cr(III), la valori mai mari de 20-30 mg/l, se observă o reducere semnificativă a conținutului de proteine, iar rata mică a conținutului de proteină în biomasa spirulinei cultivată în prezența compușilor coordinați testați poate fi explicată prin efectul nefast al Cr(III) asupra mecanismelor de biosinteză a proteinelor.
- Compușii $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$ și $[\text{Cr}(\text{HSSA})_2]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ au demonstrat un efect stimulator nesemnificativ asupra procesului de acumulare a proteinelor, sporul maximal constituind 9%.
- Un conținut mai mare de proteine cu 11,5-16,3% a fost obținut la administrarea compușilor $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{EDTA})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Ca}[\text{Cr}(\text{EDTA})_2]\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ în concentrații de 30 mg/l.
- Compușul coordinați $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$ manifestă un efect nefast asupra acumulării peptidelor, al cărui conținut scade semnificativ la administrarea acestui metalocomplex. Pentru ceilalți trei compuși ai Cr(III) supuși testării am remarcat o majorare a conținutului de peptide cu 19,1-26,2% față de martor la utilizarea a 40 mg/l de metalocomplex.
- Conținutul de proteine scade odată cu creșterea concentrației compușilor coordinați ai Fe(III) pentru toate cazurile studiate, cele mai mari valori înregistrându-se la administrarea concentrației minime de compuși, valorile fiind cu 4,73-28,67% mai mari ca în proba martor.
- Conținutul maxim de proteine a fost obținut în cazul administrării $[\text{Fe}_2\text{CaO}](5 \text{ mg/l})$ și $[\text{Fe}_2\text{ZnO}](5 \text{ mg/l})$, valorile fiind cu 27,53 și 28,67%, respectiv, mai mari ca în proba martor.
- Conținutul de peptide crește odată cu mărirea concentrației de compuși coordinați ai Fe(III) în mediu, astfel încât, conținutul peptidelor atinge valori cu 14,26-43,43% mai sporite ca în proba martor la concentrația maximă de compuși coordinați (50 mg/l), valorile constituind 14,26-17,90% din BAU.

Referințe:

- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S. Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor // *Molecular and Cellular Biochemistry*. - 2001. - Vol.222. - P.149-158.
- Bucheli-Witschel M., Egli T. Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids // *FEMS Microb. Rev.* - 2001. - Vol.25. - P.69-106.
- Chiriac T. Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozat de zinc și principii bioactive valoroase: Autoreferat al tezei de doctor în științe, 2003.- 23 p.
- Czerpak R., Bajguz A., Gromek M., Kozłowska G., Nowak I. Activity of salicylic acid on the growth and biochemistry of *Chlorella vulgaris beijeirnick* // *Acta physiologiae plantarum*. - 2002. - Vol.24. - No 1. -P.45-52.
- Hepburn D., Xiao J., Bindom S., Vincent J., O'donnell J. Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2003. -Vol.100. - P.3766-3771.
- Mirsky N. Glucose tolerance factor reduces blood glucose and free fatty acids levels in diabetic rats // *J. Inorg. Biochem.* -1993. - Vol.49. - P.123-128.
- Norseth T. The carcinogenicity of chromium and its salts // *Br. J. IND. Med.* - 1983. - Vol.43. - P. 649-651.

8. Popova V.V., Kovshova J.I., Mazo V.K., Pronina N.A. Accumulation of trace elements by *Spirulina platensis*. Abstracts of International symposium „Plant under environmental stress”. - Moscow: Publishing House of People’s Friendship University, 2001, p.227-228”.
9. Rudi L. Sinteza orientată a acizilor grași de către cianobacteria *Spirulina platensis* (Nordst.)Geitl. CNM-CB-01 și microalga *Porphyridium cruentum* (Nag) CNM-AR-01și procedee de obținere a preparatelor lipidice: Autoreferat al tezei de doctor în biologie, 2006. - 24 p.
10. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. - Chișinău, 1993. -140 p.
11. Rudic V., Dencicov L. Optimizarea mediului nutritiv pentru cultivarea spirulinei // Anale Științifice ale Universității „Al.I. Cuza” din Iași. „Seria Biologie”. - 1991. - Vol.37. - P.91-94.
12. Rudic V., Gudumac V., Bulimaga V., Dencicov D., Ghelbet V., Chiriac T. Metode de investigații în ficobiotehnologie.- Chișinău, 2002.- 61 p.
13. Rudic V., Gudumac V., Gulea A. Metoda de determinare a biomasei absolut uscate de spirulină: Brevet de invenție, №.1078/92.08.788(RO). Publicat în Buletinul de Invenții și Mărci. - 1997. - Nr.6.
14. Stearns D., Wise J., Patierno S., Wettrnahahn K. Chromium (III) picolinat produces chromosome damage in chinese hamster ovary cells // FASEB J. - 1995. - Vol.9. - P.1643-1648.
15. Terpilowska S., Zaporowska H. The role of chromium in cell biology and medicine // Przegl. Lek.- 2004.- Vol. 3.- P.51-54.
16. Volkmann H., Imianovsky U., Oliveira J., Sant’Anna E. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile // Brazilian Journal of Microbiology. - 2008. - No 39. - P.4.
17. Zosim L. Biotehnologia cultivării spirulinei și obținerii produselor cu conținut prognozată de fier și alte substanțe bioactive valoroase: Autoreferat al tezei de doctor în biologie, 2007. -22 p.
18. Макасова С., Бульмага В., Санду М. Перспективы использования соединений селена для получения биомассы *Spirulina platensis*, обогащенной селеном и со сбалансированным биохимическом составом //Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”. - Chișinău, 2006, p.163-165.
19. Максимов В. Многофакторный эксперимент в биологии. - Москва: Изд-во МГУ, 1980. - 280 с.
20. Пронина Н., Попова В., Ковшова Ю. Влияние селенид-ионов и цинка на рост и накопление селена у *Spirulina platensis* // Физиология Растений. -2002. - Т.2. - С.264-271.
21. Тамбиев А., Кирикова Н., Лябушева О. Включение селена и меди в клетки цианобактерий *Spirulina platensis* и *Spirulina maxima* и эффект КВЧ-излучения // Микроэлементы в медицине. - 2002. - С.268-271.

Prezentat la 16.06.2008