

CZU: 579.873.71:579.22

PROCEDEU DE OBTINERE A SE-EXOPOLIZAHARIDELOR PRODUSE DE CIANOBACTERIA *SPIRULINA PLATENSIS*

Valentina BULIMAGA, Liliana ZOSIM, Maria PISOVA, Veaceslav REVA

Universitatea de Stat din Moldova

Au fost obținute preparate de Se-EPZ și EPZ din cianobacteria *Spirulina platensis* cultivată pe mediu nutritiv cu și fără adaos de selenit. Extractele parțial purificate (după înlăturarea fracției proteice) au fost supuse separării prin metoda HPLC pe coloana de Toyo-Pearl HW40F. Au fost scanate spectrele UV ale preparatelor de exopolizaharide și elaborată schema tehnologică de realizare a unui procedeu de obținere a Se-EPZ produse de *Spirulina platensis*.

Cuvinte-cheie: exopolizaharide, selenium, *Spirulina platensis*, acumularea Se, FPLC.

PROCESS FOR OBTAINING OF Se-EXOPOLISAHARIDES PRODUCED BY CYANOBACTERIUM *SPIRULINA PLATENSIS*

Selenium-containing (Se-EPS) and EPS from *Spirulina platensis* cyanobacterium grown on the nutritive medium with and without selenite supplementation were obtained. The partially purified extracts (after removal of the proteins fraction) were subjected to HPLC separation on the Toyo-Pearl HW40F column. The UV spectra of the exopolysaccharide preparations have been scanned and the technological scheme for obtaining of Se-EPZ produced by *Spirulina platensis* has been developed.

Keywords: exopolysaccharides, selenium, *Spirulina platensis*, Se accumulation, FPLC.

Introducere

Polizaharidele reprezintă un grup structural divers de macromolecule biologice active, fiind compuse din monozaharidele structurale repetitive legate între ele prin legături glicozidice. La momentul actual polizaharidele algale și cianobacteriene sunt în atenția cercetătorilor datorită posibilităților largi de utilizare potențială în diferite ramuri ale industriei, inclusiv cea farmaceutică, de producere a produselor cosmetice, în industria alimentară etc. [1,2]. Exopolizaharidele pot fi eliminate în mediul de cultivare fiind solubile în mediul apos și/sau formează un strat gelatinos în jurul celulelor, fiind atașate de pereții celulari. Datorită importanței aplicative vădite a polizaharidelor, obținerea, izolarea și purificarea acestora capătă o atenție sporită în cercetările ficobiotehnologice din ultimii ani. Cu toate că a fost definit rolul important al EPS cianobacteriene, multe aspecte legate de producerea, extragerea și obținerea EPS la diverse specii de cianobacterii, inclusiv spirulina, rămân încă puțin studiate.

Asupra producerii exopolizaharidelor pot influența atât factorii biotici, cât și cei abiotici. În cercetările efectuate anterior referitoare la influența diferitelor surse de azot asupra producerii exopolizaharidelor la cultivarea cianobacteriei *Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flah. (Cyanophyta) a fost stabilit că conținutul lor depinde de forma de azot utilizată. Sursele de azot sub formă de azotat (NaNO_3 , KNO_3) și limitarea azotului promovează accelerarea creșterii culturii și creșterea rezervei de carbohidrați în celulele trihomilor, a poliglucanilor tecii mucilagenoase și a celor eliminați în mediul de cultură. Azotul sub formă de săruri de amoniu (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), indiferent de adaptarea anterioară a culturii la prezența amoniului, inhibă procesele de creștere și acumulare a carbohidraților atât în celulele trihomilor, cât și în teaca mucilagenoasă [3].

Alți factori care pot influența producerea de exopolizaharide la cianobacteria *Spirulina platensis*, pe lângă deficitul de azot, sunt deficitul de fosfor, salinitatea, metalele grele, temperatura și varierea intensității de iluminare etc. Astfel de date au fost raportate în unele lucrări mai recente [4-7].

Astfel, analizând publicațiile la tema de studiu, constatăm că practic lipsește informația referitoare la influența Na_2SeO_3 asupra producerii de exopolizaharide la cianobacterii. Mai mult ca atât, prezintă interes și acumularea seleniului nu doar în biomasă, dar și în fracția de exopolizaharide, întrucât acest oligoelement este esențial pentru buna funcționare a organismului uman și animal. El este parte integrantă a selenoproteinelor și a câtorva enzime antioxidante care protejează celulele de efectele dăunătoare ale radicalilor liberi care sunt generați în timpul procesului de oxidare [8]. Atât biomasa îmbogățită cu seleniu, cât și polizaharidele cianobacteriene produse pot servi drept surse polifuncționale pentru obținerea suplimentelor alimentare și a remediilor cu efecte antioxidante, antiproliferative, anticancer etc.

Cianobacteria *Spirulina platensis* reprezintă un obiect biotehologic potențial, datorită metabolismului rapid și capacității de adaptare, exprimate printr-un nivel ridicat de interacțiune cu mediul extracelular. O caracteristică de bază a culturii de spirulină este creșterea intensă a biomasei celulare. În consecință, în structura celulară a spirulinei are loc asimilarea și conversia eficientă a unor oligoelemente, inclusiv a seleniului [9-11]. Merită subliniat faptul că mecanismul de acumulare a seleniului și transformarea lui în structuri celulare, inclusiv în exopolizaharide, nu este pe deplin elucidat. În această lucrare este testată influența selenitului de sodiu asupra producerii de exopolizaharide și posibila lui acumulare în componența acestora.

Scopul lucrării constă în elaborarea unui procedeu de obținere a exopolizaharidelor cu conținut de Se din cianobacteria *Spirulina platensis*.

Material și metode

Cultivarea spirulinei în două etape, cu și fără adaos de Na_2SeO_3 . Suspensia de spirulină (0,4 mg/ml) a fost cultivată în vase de sticlă cu volumul de 10 l în mediul Zarrouk modificat [12] timp de 7 zile la iluminarea 3500 lx, iar începând cu a 8-a zi cultivarea a fost continuată la 5500 lx. În cazul cultivării cu adaos de Na_2SeO_3 la suspensia de spirulină au fost suplimentate 45 mg/l de Na_2SeO_3 a câte 15 mg/l Na_2SeO_3 în primele 3 zile de cultivare. După 14 zile de cultivare biomasa a fost separată de lichidul cultural și au fost colectate probe pentru determinarea productivității și pentru extragerea și determinarea exopolizaharidelor.

Extragerea EPZ. Suspensia de spirulina cultivată în decurs de 14 zile a fost filtrată pentru separarea biomasei de lichidul cultural. Biomasa a fost suspendată în 200 ml de apă distilată pentru extragerea exopolizaharidelor atașate pe suprafața peretelui celular și după agitare timp de 4-5 min a fost filtrată cu pompa de vid, iar biomasa a fost spălată cu încă 50 ml de apă bidistilată. Frația de exopolizaharide a fost tratată cu soluție 20% acid tricloracetic (3:1, V/V) și supusă centrifugării pentru înlăturarea fracției proteice, iar supernatantul obținut a fost concentrat de 5-10 ori la un evaporator cu vacuum și supus dializei. După dializă EPZ au fost precipitate cu acetonă rece și recuperate prin centrifugare.

Determinarea Se în fracția proteică și în EPZ. Probe a câte 9,3 mg proteine și 16,2 mg EPZ, respectiv, au fost supuse mineralizării cu amestec de soluție de acizi concentrați (HCO_4 și HNO_3 în raport de 3:1 (V/V)). Restul mineralizat obținut în ambele cazuri a fost dizolvat în soluție 1M HCl și după neutralizare a fost analizat conținutul de seleniu. La 0,1 ml probă s-au adăugat 0,5 ml soluție 4,5M HCl, s-a efectuat agitarea și după 10 min s-au adăugat 0,75 ml soluție 0,25% KI (preparată extempore), iar după agitare la un interval de 2 min s-au adăugat 0,5 ml soluție de 0,2% amidon și 1,0 ml H_2O . Probele au fost măsurate în decurs de 10 min la 570 nm față de proba oarbă. Calculul a fost efectuat conform curbei de calibrare, unde în calitate de standard a fost utilizat Na_2SeO_3 .

Cromatografia de separare a fracțiilor de exopolizaharide cu și fără Se, precum și a fracțiilor proteice separate anterior din extractul de exopolizaharide a fost efectuată pe coloana de Toyo-Pearl HW40F (Sigma Aldrich) (25 cm x 4,6 mm), echilibrată cu soluție tampon 1 mM CuSO_4 , pH=4,5. Viteza de eluție 0,5 ml/min. Detectarea fracțiilor de exopolizaharide a fost efectuată la $\lambda=240$ nm.

Spectrele UV-VIS ale exopolizaharidelor au fost trasate la aparatul UV-VIS Spectrometer T60 (Alma-Parc, England).

Rezultate și discuții

Probe de exopolizaharide și Se-exopolizaharide, obținute conform protocolului descris mai sus, în cantitate de 0,5 ml, au fost introduse în coloana cu Toyo-Pearl HW40F (Sigma Aldrich) (25 cm x 4,6 mm), echilibrată cu soluție tampon 1 mM CuSO_4 , pH=4,5. Eluția complexului de polizaharide cu Cu^{2+} a fost efectuată cu soluție 1 mM CuSO_4 , pH=4,5. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 1.

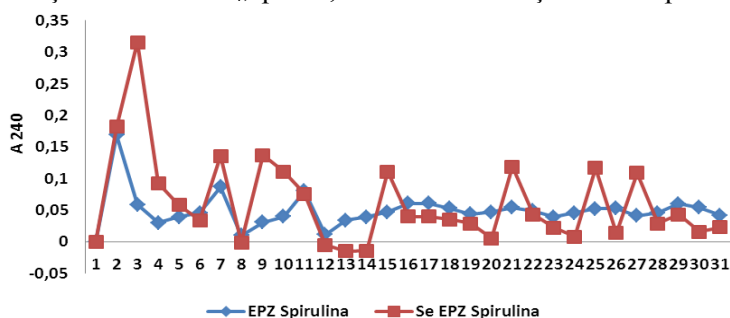
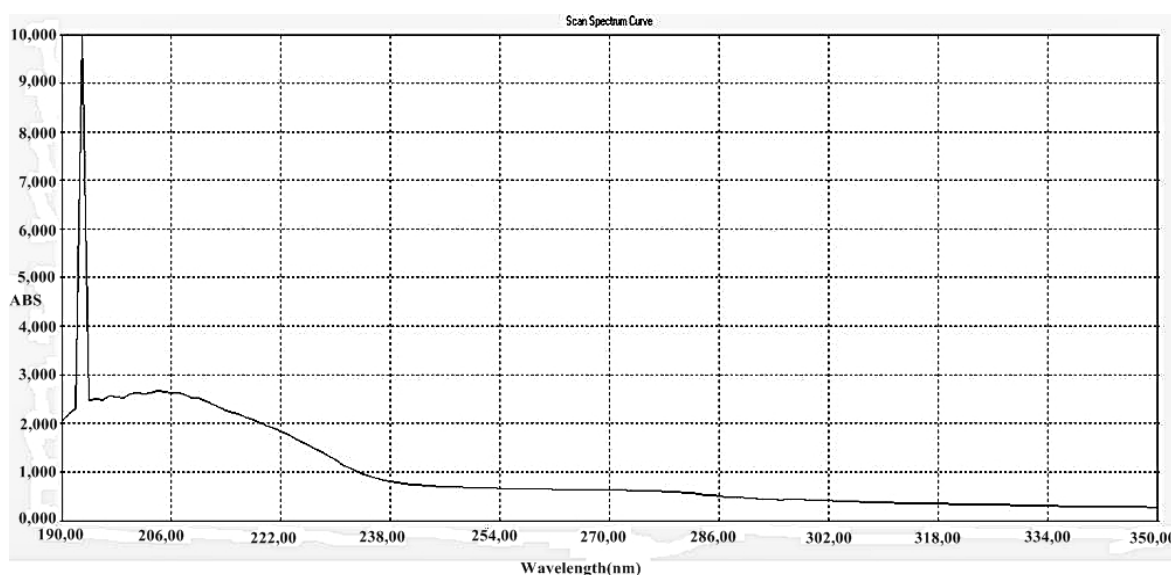


Fig.1. Cromatografia FPLC pe coloana de Toyo-pearl HW40F a preparatelor de exopolizaharide obținute din cianobacteria *Spirulina platensis* cultivată pe mediu nutritiv cu și fără adaos de SeO_3^{2-} .

Se observă un spectru mai diversificat după componența fracțiilor în cazul Se-exopolizaharidelor (7 fracții), comparativ cu exopolizaharidele fără seleniu (3 fracții). Cantitativ predomină primul pic, care este constituit din exopolizaharide cu masa moleculară înaltă.

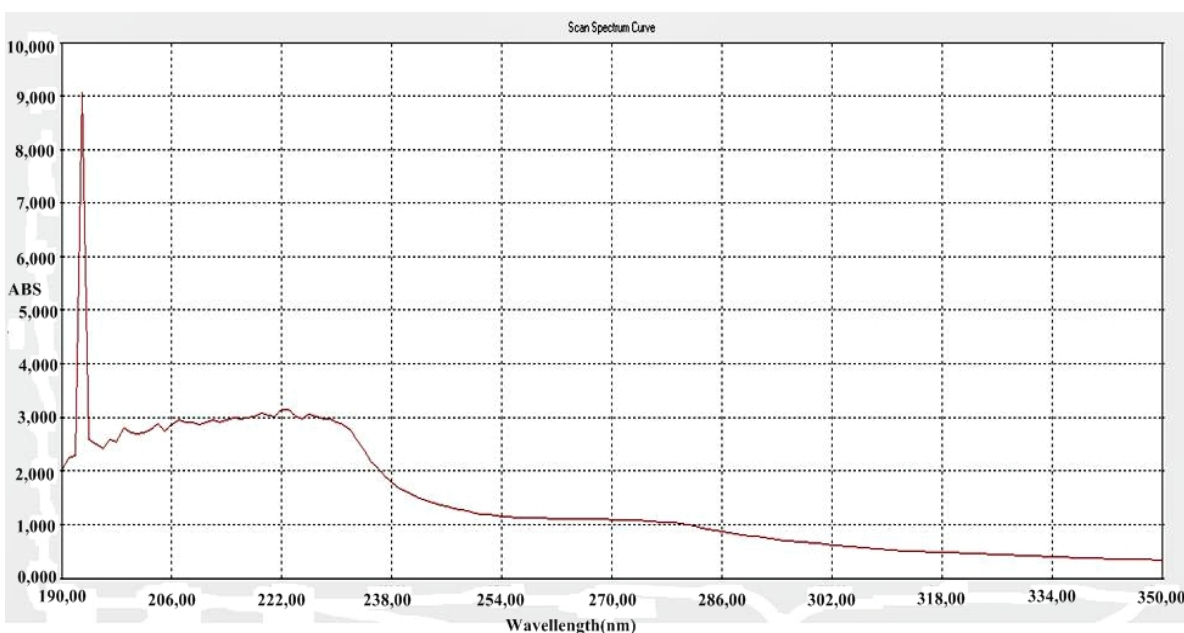
Analiza spectrelor UV a EPZ și Se-EPZ (Fig.2 și 3) a scos în evidență că picul cel mai semnificativ se observă la lungimea de undă 192,8 nm. Putem constata absența proteinei și acizilor nucleici (lipsa absorbției la 260 și 280 nm), fapt datorat purificării prealabile a extractului de EPZ și înlăturării fracției de proteine. Maximul de absorbție la 192,8 nm poate fi condiționat de prezența în componența EPZ a acizilor uronici [13].



A

Fig.2. Spectrul UV al preparatului de exopolizaharide obținut din cianobacteria *Spirulina platensis* cultivată pe mediu nutritiv fără adaos de SeO_3^{2-} .

În cazul Se-EPZ se observă prezența unor componente în diapazonul lungimilor de undă de 195-230 nm, valorile absorbției menținându-se în limitele 2,8-3,3 (Fig.3).



B

Fig.3. Spectrul UV al preparatului de exopolizaharide obținut din cianobacteria *Spirulina platensis* cultivată pe mediu nutritiv cu adaos de SeO_3^{2-} .

A fost determinat și conținutul de seleniu inclus în componența EPZ și în fracția proteică obținută la precipitare cu acid tricloracetic din extractul rezultat în urma extragerii cu apă purificată a EPZ legate pe suprafața externă a peretelui celular și la filtrare sub vid (*a se vedea* Tabelul). În baza rezultatelor obținute s-a constatat că 37,6% din seleniul detectat în extract revine fracției de EPZ parțial purificate, iar 60,53% de seleniu revine fracției proteice din extractul apos de EPZ.

Tabel

Conținutul de seleniu acumulat în fracția de EPZ

Proba examinată	Masa probei, mg	Conținutul seleniului acumulat, mg%	Seleniu, %
Extract inițial de exopolizaharide	29,15±0,14	17,66±0,11	100%
Fracția de EPZ parțial purificată	16,20± 0,10	6,64±0,04	37,60
Fracția proteică din extractul de EPZ	9,30±0,5	10,69±0,05	60,53

Acumularea seleniului în aceste fracții se datorează toxicității ionului de SeO_3^{2-} care induce sinteza exopolizaharidelor și a proteinelor pentru imobilizarea seleniului în exteriorul celulei. Probabil, are loc imobilizarea parțială a seleniului în EPZ prin includerea lui posibilă în polizaharidele acide la substituirea sulfurii din grupările sulfatate ale acestora, precum și în fracția proteică în componența aminoacizilor cu conținut de sulf [14].

Cromatografia pe coloana de Toyo-Pearl a fost utilizată și pentru separarea componentelor fracțiilor proteice, obținute din extractul de exopolizaharide la precipitare cu soluție de 20% acid tricloracetic (Fig.4). Se observă diferența dintre componența picurilor fracțiilor detectate după Lowry și cele ale complexului polizaharidelor cu Cu^{2+} , detectate după absorbanta la 240 nm. În fracțiile 6, 7 și 8 a fost detectat un pic mai prominent, caracteristic pentru complexul proteoglicanilor cu Cu^{2+} la 240 nm (Fig.4B). Astfel, putem presupune că împreună cu proteina la precipitare cu soluție de 20% acid tricloracetic în raport de 3:1 (V/V) se precipită și proteoglicani.

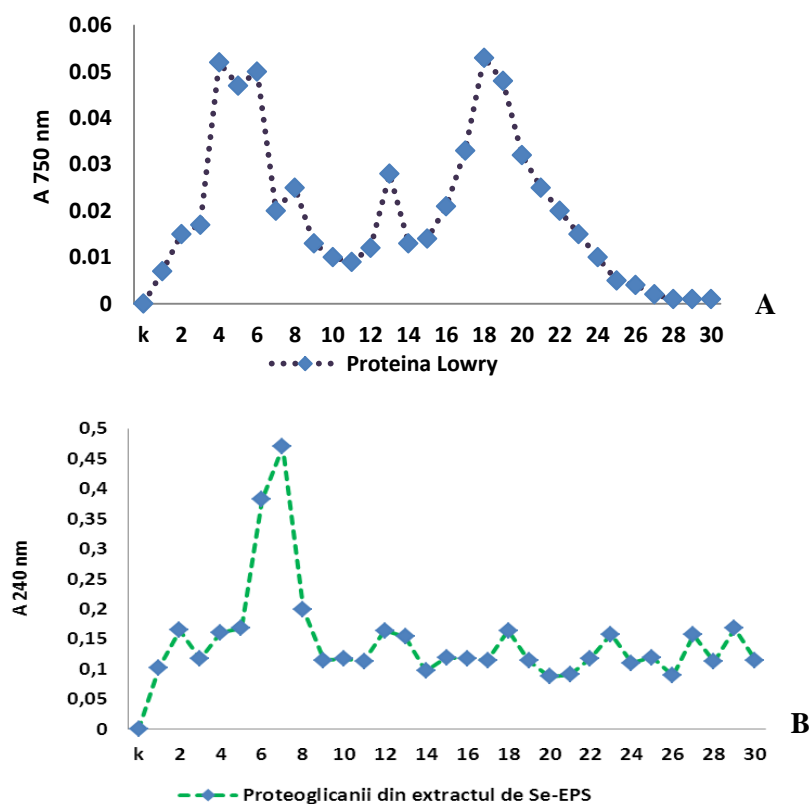


Fig.4. Cromatografia pe Toyo-Pearl a fracției proteice separate din extractul exopolizaharidic cu conținut de Se la determinare prin metoda Lowry (A) și după absorbanta la 240 nm a complexului polizaharidic cu Cu^{2+} (B).

Așadar, în rezultatul cercetărilor efectuate putem constata că la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* cu suplimentarea la mediul de cultură a Na_2SeO_3 are loc acumularea seleniului în fracția de substanțe extracelulare atașate de peretele celular, constituite în principal din exopolizaharide și proteine. A fost propusă o schemă tehnologică de obținere și purificare a Se-exopolizaharidelor (Fig.5).

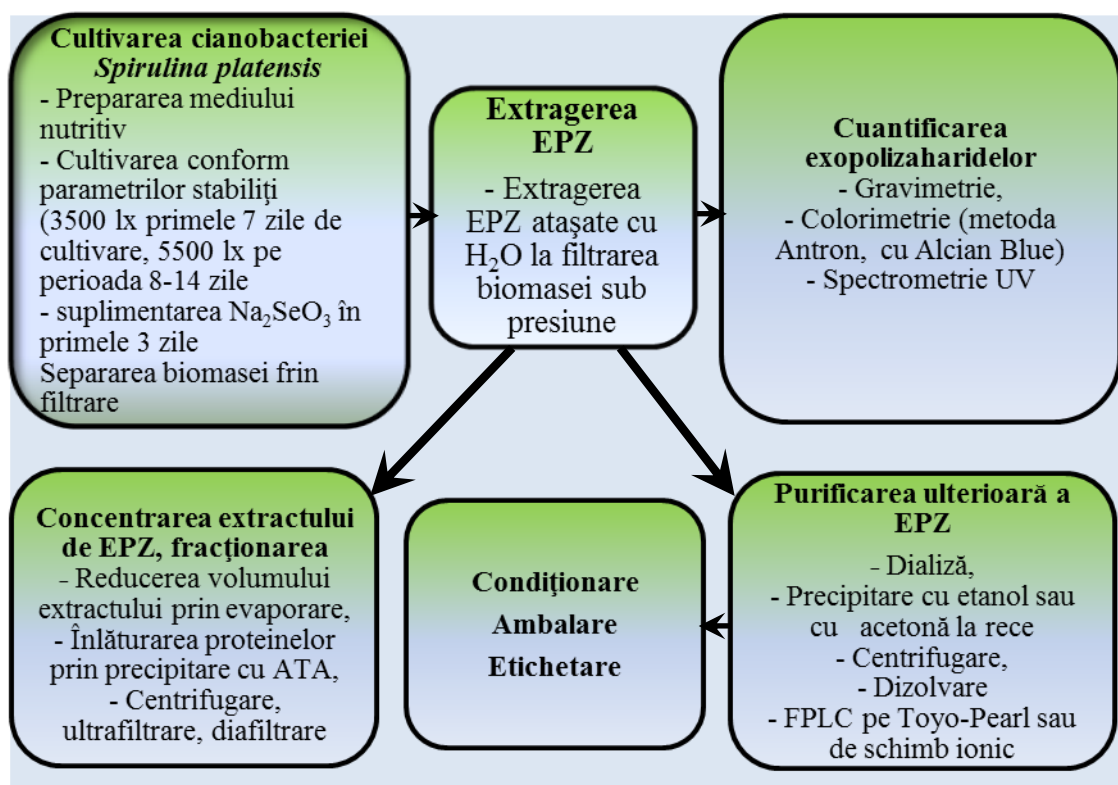


Fig.5. Schema tehnologică de realizare a procedurii de obținere a Se-EPZ produse de *Spirulina platensis*.

Schema elaborată ilustrează etapele de realizare a procedurii de obținere a Se-EPZ produse de *Spirulina platensis*, care include: cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediul nutritiv suplimentat cu Na_2SeO_3 , obținerea biomasei de spirulină cu conținut bogat de seleniu, extragerea Se-EPZ, concentrarea extractului de Se-EPZ, fracționarea Se-EPZ (înlăturarea fracției proteice prin precipitare cu ATA), purificarea ulterioară a Se-EPZ prin dializă și FPLC pe Toyo-Pearl sau de schimb ionic, cuantificarea Se-EPZ (determinarea EPZ acide și a seleniului), condiționarea, etichetarea și ambalarea.

Concluzii

1. Au fost obținute preparate de EPZ și Se-EPZ din cianobacteria *Spirulina platensis*. Componenta fracțiilor de exopolizaharide la separare prin FPLC pe coloana de Toyo-Pearl HW40F este mai complexă în cazul Se-exopolizaharidelor (7 fracții), comparativ cu exopolizaharidele fără seleniu (3 fracții). Cantitativ predomină primul pic, care este constituit din exopolizaharide cu masa moleculară înaltă.

2. Spectrele UV ale preparatelor de exopolizaharide cu și fără seleniu au scos în evidență prezența unui pic mai semnificativ cu maximumul de absorbție la lungimea de undă 192,8 nm în ambele cazuri și prezența unor componente în diapazonul lungimilor de undă de 195-230 nm, care în cazul Se-EPZ atestă valori ale absorbției mai înalte (2,8-3,3) pe tot acest interval, comparativ cu cele ale EPZ fără seleniu.

3. A fost elaborată schema care ilustrează etapele de realizare a procedurii de obținere a Se-EPZ produse de *Spirulina platensis*.

Referințe:

- LI, P., HARDIN, S.E., LIU, Z. Cyanobacterial Exopolysaccharides: Their Nature and Potential Biotechnological Applications. In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2001, vol.18, p.375-404.
- DELATTRE, C., PIERRE, G., LAROCHE, C., MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. In: *Biotechnol. Adv.*, 2016, vol.34, no.7, p.1159-1179.

3. SHNIUKOVA, E., ZOLOTAREVA, E. Effect of different sources of nitrogen on production of exopolysaccharides from *Nostoc linckia* (Roth) Born. et Flah. (Cyanophyta). In: *J. Algae*, 2002, p.86-98.
4. BULIMAGA, V., PISOVA, M., ZOSIM, L. Sinteza orientată a polizaharidelor acide la cianobacteria *Spirulina platensis* CNM CB-02. În: *Studia Universitatis. Seria Științe reale și ale naturii*, 2011, nr.1 (101), p.46-50.
5. CHAKRABORTY, T., SEN, A., PAL, R. Stress induced extra cellular polysaccharide of *Spirulina subsalsa* and its chemical characterization. In: *J. Algal Biomass Util.*, 2015, vol.6, no.3, p.24-38.
6. EL-BAKY, H.A, ELBAZ, F.K., EL-LATIFE, S.A. Induction of Sulfated Polysaccharides in *Spirulina platensis* as Response to Nitrogen Concentration and its Biological Evaluation. In: *J. Aquac. Res. Development*, 2013, vol.5, no.1, p1-8.
7. LEE, M.-C., CHEN, Y.-C., PENG, T.-C. Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. In: *Journal Science of Food and Agriculture*, 2012, vol.92, no.7, p.1562-1569.
8. DRUTEL, A., ARCHAMBEAUD, F, CARON, P. Selenium and the thyroid gland: more 370 good news for clinicians. In: *Clin. Endocrinol.*, 2013, vol.78, no.2, p.155-164.
9. BULIMAGA, V., ZOSIM, L., PISOVA, M., RUDIC, V., ȘOVA, S. Influența selenitului de Fe(III) și a intensității de iluminare asupra conținutului de ficobiliproteine, seleniu și fier în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. În: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe reale și ale naturii*, 2016, nr.6(96), p.3-9.
10. RUDIC, V., DJUR(MAXACOVA), S., CEPOI, L., CHIRIAC, T., RUDI L., ȘOVA S. Cianobacteria *Spirulina platensis* – matrice pentru producerea compușilor organici selenocompenți. În: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*, 2014, vol.32, nr.1, p.83-88.
11. ZHANG, H., CHEN, T., JIANG, J., WONG, Y.S., YANG, F., ZHENG, W. Selenium-containing allophycocyanin purified from selenium-enriched *Spirulina platensis* attenuates AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes through inhibition of ROS generation. In: *J. Agric. Food Chem.*, 2011, vol.59, no.16, p.8683-90.
12. RUDIC, V. *Aspecte noi ale biotehnologiei moderne*. Chișinău: Știința, 1993. 140 p.
13. [www.http://frontisme.nl/methods_for_quantitative_analysis_of_uronic_acids_in_biomass.pdf](http://frontisme.nl/methods_for_quantitative_analysis_of_uronic_acids_in_biomass.pdf)
14. PRONINA, N.A., KOVSHOVA, Yu.I., POPOVA, V.V. et.al. The Effect of Selenite Ions on Growth and Selenium Accumulation in *Spirulina platensis*. In: *Russian Journal of Plant Physiology*, vol.49, no.2, 2002, p.235-241.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului Instituțional cu cifra 15.817.05.02F.

Prezentat la 13.10.2017