

Invenția se referă la biotehnologie, în special la un procedeu de obținere a preparatului antioxidant din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, utilizat în industria farmaceutică și cosmetologie.

Este cunoscut faptul, că SOD joasă un rol principal în sisteme de protecție a celulelor contra influenței negative a stresului oxidativ. Superoxiddismutaza (SOD) este o enzimă cu efect antioxidant, capabilă de a distruge radicalii liberi, protejând astfel organismul de acțiunea lor distrugătoare. Preparatele antioxidante pe baza enzimei SOD sunt utilizate cu succes la tratarea osteoartriei, alveolitei pulmonare, la profilaxia și combaterea cancerului, preîntâmpinarea îmbătrânirii pielii, protecția contra razelor UV, etc.

Este cunoscut procedeu de producere și extragere a antioxidanților din cultura de microorganisme. Procedeu constă în cultivarea microalgelor în fotoreactor închis, suspendarea microalgelor în mediul de cultură, colectarea oxigenului, produs de microalge, și reinjectarea în mediul de cultură, separarea de la mediul de cultură, diluarea microalgelor, distrugerea în ciclu presiune-vacuum în omogenizator ATV la presiune  $2...5 \cdot 10^7$  Pa, adăugarea solvenților pentru obținerea antioxidanților lipofili și separarea fazelor lichide [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că necesită cultivatoare închise ermetic cu utilizarea colectorului și injectorului de  $O_2$  precum și distrugerea celulelor de microorganisme la presiune înaltă, precum și adăugarea solvenților organici, care pot influența asupra activității enzimei antioxidante SOD.

Mai este cunoscut și procedeu de obținere a superoxiddismutazei termostabile din celulele microorganismelor fotosintetizante. Procedeu constă în: a) cultivarea microorganismelor la temperatura de la  $40^\circ$  până la  $80^\circ C$  în fotoreactor închis din material transparent și termorezistent; b) separarea microorganismelor din mediul de cultură, distrugerea microorganismelor, extragere din ele a lichidului ce conține SOD și alte proteine, concentrarea așa numitului lichid, separarea selectivă a altor proteine de SOD prin precipitare cu sulfat de amoniu [2].

Dezavantajul acestui procedeu constă în faptul că necesită cultivatoare închise ermetic cu adăugarea  $CO_2$  sau  $O_2$  și o temperatură înaltă de cultivare ( $40...80^\circ C$ ), precum și distrugerea celulelor de microorganisme la pres industrial sub presiunea de  $2 \cdot 10^7$  Pa, precum și centrifugarea omogenatului la o viteză înaltă de rotație ( $10000...450000$  g), timp de 1 oră, ceea ce este însoțit de consum de energie și aparataj costisitor și nu este economic avantajos. Un alt dezavantaj mai este că în cazul utilizării culturilor mezofile, preparatul antioxidant, care conține SOD, este puțin termostabil, deoarece activitatea SOD obținută din aceste culturi (inclusiv și SOD din cianobacteria *Cyanidium caldarium*) la temperatura de  $60^\circ C$  scade cu 50% peste 30 min.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea preparatului antioxidant termostabil cu o capacitate antioxidantă înaltă din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*.

Procedeu conform invenției include cultivarea biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis* în reactoare de tip deschis pe un mediu de cultură Gromov (И.Е. Гороновский, Ю.П. Назаренко, Е.Ф. Некрич. Краткий справочник по химии. Киев, 1974, с.424) cu adăugarea compusului coordinativ cu acidul tartric și imiduzol  $[Mn(COO(CHOH)_2COO)(C_3N_2H_4)_2(H_2O)_2] \cdot nH_2O$  în concentrație de 20 mg/L, la temperatura de  $30...35^\circ C$ , separarea biomasei de mediul de cultură, distrugerea celulelor prin congelare-decongelare repetată, extragerea fracției proteice cu 0,1 M tampon fosfat de Na cu pH 7,8...8,0 cu adăugarea a 10 mM EDTA, fracționarea fracției proteice prin precipitare izoelectrică la pH 3,8...4,0, centrifugarea cu separarea ulterioară a precipitatului, concentrarea supernatantului cu conținut de superoxiddismutază și ficocianină utilizând reagentul polietilenglicol Mr 40000 Da și congelarea.

Avantajul procedeuului propus constă în obținerea unui preparat antioxidant termostabil și cu capacitate antioxidantă înaltă (o activitate antioxidantă a enzimei SOD de 1,54 ori mai înaltă în comparație cu SOD conform soluției apropiate), dar și o capacitate antioxidantă suplimentară a ficocianinei – proteinei cu proprietăți antioxidante, precum și economisirea resurselor materiale și energetice (cultivarea la temperatura de  $35^\circ C$  față de  $40...80^\circ C$ ), descris în soluția cea mai apropiată, distrugerea celulelor cianobacteriei se efectuează prin congelare-decongelare repetată față de distrugerea celulelor de microorganisme la pres industrial sub presiunea de  $2 \cdot 10^7$  Pa, descris în soluția cea mai apropiată, precum și centrifugarea omogenatului la o viteză de rotație ( $6000...7000$  g) timp de 20 min față de centrifugarea omogenatului la o viteză înaltă de rotație ( $10000...450000$  g) timp de 1 oră, descris în soluția cea mai apropiată.

Rezultatul constă în obținerea unui preparat termostabil cu activitate antioxidantă înaltă.

Rezultatul obținut se datorează cultivării cianobacteriei *Spirulina patensis* în regim de iluminare permanentă și adăugării ca sursă suplimentară de C, N și Mn la mediul de cultivare a compusului coordinativ al Mn, influențează asupra sintezei antioxidanților de natură proteică – ficocianină și SOD. Rezultatele determinării activității SOD și capacității antioxidante a ficocianinei din preparatului antioxidant obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina patensis* sun prezentate în tabele 1-2.

Tabelul 1

Determinarea activității SOD la diferite etape de obținere a preparatului antioxidant

Etapile de obținere a preparatului antioxidant	Activitatea SOD, unități/ml	V, ml	Peoteina, mg/ml	Unități/mg proteină
Extragerea (Extractul inițial)	4,58	2100	2,5	1,83
Precipitarea izoelectrică (Supernatant)	4,16	2310	0,9	4,62
Concentrare	16,64	577,5	3,6	4,62

După cum se vede din Tabelul 1, după precipitarea izoelectrică se păstrează 100% de activitate a SOD, care rămâne în supernatant și se înlătură 64% de proteine balast, deci are loc separarea selectivă a SOD de alte proteine. Activitatea SOD a fost determinată după reducerea colorației Tetrazolium Nitroblue (NBT) în prezența riboflavinei (Winterbourn, 1987).

Tabelul 2

Determinarea capacității antioxidante a ficocianinei din preparatul antioxidant obținut din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*

Soluția cercetară	Volumul soluției de antioxidant titrate, ml	Volumul soluției de 2,6 diclorfenolindofenolat de sodiu 0,001 M, consumat la titrare, ml	Capacitatea antioxidantă, %
Acid ascorbic (0,05 mg/ml)	0,1	0,8	100
Ficocianină (0,05 mg/ml)	0,1	0,186	23,25

Datele din Tabelul 2 demonstrează că, în comparație cu prototipul, procedeul propus în invenție asigură o activitate antioxidantă mai înaltă datorită prezenței nu doar a enzimei SOD, dar și a proteinei cu capacitate antioxidantă – ficocianină, a căreia capacitate antioxidantă constituie 23,25% comparativ cu acidul ascorbic luat în calitate de oxidant standard, a cărui valoare este considerată 100%. Capacitatea antioxidantă a fost determinată după metoda titrării cu 2,6 diclorfenolindofenolat de sodiu (Pavel Grigorcea, Aliona Glijin. Biochimia tehnologică. Lucrări de laborator, 2003).

Studiul comparativ al activității și termostabilității SOD din preparatul antioxidant termostabil, obținut din cianobacteria *Spirulina platensis* conform invenției propuse și cel obținut din cianobacteria *Cyanidium caldarium* conform soluției apropiate este prezentat în tabele 3-4.

Tabelul 3

Compararea activității enzimei SOD, obținute din cianobacterii

Preparatul antioxidant	Activitatea SOD, unități/mg	Majorarea activității SOD
SOD din cianobacteria <i>Cyanidium caldarium</i> (conform soluției apropiate)	3	-
SOD din cianobacteria <i>Spirulina platensis</i> (conform soluției propuse)	4,62	1,54

Datele din Tabelul 3 demonstrează că, în comparație cu prototipul, procedeul propus în invenție asigură o activitate antioxidantă a enzimei SOD de 1,54 ori mai înaltă în comparație cu SOD, obținută din cianobacteria *Cyanidium caldarium*, conform soluției apropiate. Astfel, capacitatea antioxidantă în preparatul obținut în invenția propusă este mai înaltă și se datorează prezenței nu doar a enzimei SOD, dar și a ficocianinei – proteinei cu proprietăți antioxidante și care pot avea acțiune antioxidantă sinergică.

Tabelul 4

Compararea termostabilității enzimei SOD, obținute din cianobacterii

Preparatul antioxidant	Termostabilitatea preparatului antioxidant	
	la t° 60°C 30 min	la t° 60°C 60 min
Activitatea SOD din cianobacteria <i>Cyanidium caldarium</i> (conform soluției apropiate)	50% din activitatea inițială	-
Activitatea SOD din cianobacteria <i>Spirulina platensis</i> (conform soluției propuse)	100%	100%

Conform datelor Tabelului 4, după 60 și 30 de minute de încălzire la 60°C preparatul antioxidant din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* păstrează 100% din activitatea SOD, iar cel obținut din cianobacteria *Cyanidium caldarium* păstrează doar 50% din activitatea SOD după 30 de minute de încălzire la 60°C.

Exemplu de realizare a invenției în reactoare de tip deschis pe un mediu de cultură Gromov.

Se prepară 60 l suspensie de spirulină cu concentrația de 0,4 g/l. Cultura de *Spirulina platensis* se cultivă timp de 48 ore la t° de 35°C, pH 9-10, la iluminare permanentă de 4000 lx. După 48 ore se adaugă cu picătura soluție de  $[\text{Mn}(\text{OOCH}(\text{OH})_2\text{COO})(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot n\text{H}_2\text{O}$  în calitate de sursă suplimentară de mangan, carbon și azot cu concentrația finală de 20 mg/l, la agitare permanentă. Cultivarea este continuată până la ziua a 7-a, după care biomasa este separată de mediul de cultură prin filtrare. Biomasa obținută este suspendată în apă, astfel ca concentrația finală să fie egală cu 20 mg/l. Suspensia este congelată-decongelată de 3 ori și se supune extracție în

raport de 1:1 cu soluție 0,1 M tampon fosfat pH 7,8, ce conține EDTA (10 mM) timp de 1 oră, la temperatura de 4°C. Extractul obținut este supus centrifugării la 3,5 mii rot/min, timp de 20 min. Supernatantul obținut este supus precipitării izoelectrice cu adăugarea soluției de HCl 0,1N la pH 3,8...4,0. Se centrifughează la 3,5 mii rot/min, timp de 20 min pentru separarea precipitatului. Supernatantul obținut ce conține SOD și ficocianină este concentrat cu utilizarea agentului de concentrare – polietilenglicol ( $M_r = 40000$  Da) și soluția obținută este utilizată în calitate de preparat antioxidant. Soluția se congelează și se păstrează la frigider -15°C.