

MODIFICAREA COMPONENTEI CALITATIVE A PROTEINELOR LA CIANOBACTERIA *SPIRULINA PLATENSIS* CULTIVATĂ ÎN PREZENȚA UNOR COMPUȘI COORDINATIVI AI CR(III)

Valeriu RUDIC*, Valentina BULIMAGA, Daniela CIUMAC*, Liliana ZOSIM*,
Tatiana CHIRIAC*, Nadejda EFREMOVA

LCȘ „Ficobiotehnologie”, USM

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

SDS-electrophoresis of polypeptide chains of total protein fraction obtained from *Spirulina* cultivated in the presence of Cr(III) coordination compounds have been carried out. New bands with apparent molecular mass 60, 4 kDa and 66, 7 kDa have been detected in the presence of Cr(III) coordination compounds.

Introducere

În prezent, cercetările axate asupra studiului interacțiunii cianobacteriilor cu cromul se desfășoară sub două aspecte. În unele este studiată posibilitatea utilizării cianobacteriilor (ex. *Oscillatoria sp.*, *Nostoc sp.*, *Synechococcus sp.*, *Spirulina sp.* etc.) în calitate de sorbenți naturali ce neutralizează și micșorează titrul ionilor toxici de Cr(VI) în ape și soluri [1]. În altele este studiată capacitatea cianobacteriilor (în special a celor din genul *Spirulina*) de a acumula acest bioelement în procesul de cultivare și de a-l bioconverti prin încorporarea lui în diverse fracții de principii bioactive ale biomasei, valorificate în calitate de sursă nonconvențională de nutraceutice și remedii medicamentoase cromocomponente [2]. În procesele de stocare a cromului un rol important revine liganzilor biologici, printre care pot fi evidențiați aminoacizii, peptidele și proteinele cu rol de agenți intracelulari de chelatare și de coordonare a ionilor de Cr³⁺ [3].

Prezintă interes cercetările consacrate evaluării și stabilirii unor schimbări calitative și cantitative ale proteinelor în biomasa de spirulină, obținută la cultivare în prezența unor concentrații înalte ale cromului. Acestea sunt importante în vederea furnizării de noi date asupra sintezei unor componente proteice noi, ca reacție de răspuns la stresul provocat de acțiunea cromului în concentrații excesive.

Astfel, scopul prezentului studiu rezidă în evaluarea modificărilor survenite în componența calitativă a proteinelor sumare la tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 cultivată în prezența unor compuși coordinativi ai Cr(III).

Material și metode

Obiectul cercetărilor expuse a fost tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 (CYANOPHYTA), depozitată în Colecția Națională de Microorganisme de pe lângă Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei.

Biomasa de spirulină a fost obținută conform unor procedee care au inclus inocularea cianobacteriei pe mediul nutritiv SP-1, cultivarea ei în retorte Erlenmeyer a câte 250 ml cu 100 ml suspensie timp de 6 zile, suplimentarea la a 3-a zi cu unul din compușii coordinativi ai Cr(III) – K₂[Cr(NTA)(C₂O₄)(H₂O)]•2H₂O, în care NTA – acidul nitrilotriacetic (varianta experimentală I) sau [K₂Cr₂(SO₄)₄]•12H₂O (varianta experimentală II) în concentrație de 30 mg/l. Pe durata cultivării a fost respectată temperatura de 30-32°C și iluminarea în limitele a 2000-3000 lx.

Extragerea proteinelor a fost realizată conform metodei descrise în [4]. Determinarea calitativă a proteinelor prin SDS-PAGE a fost realizată în sistemul de tampon Laemmli, în plăci verticale de poliacrilamidă de 15% cu grosimea de 1 mm, în condiții denaturante cu SDS. Operațiile postelectroforetice au fost efectuate conform metodei standard [5]. Masele moleculare relative ale fracțiilor polipeptidice separate au fost determinate în funcție de indicii mobilității electroforetice, folosind curba de etalonare a proteinelor standard. Pentru a nu admite pierderile fracțiilor cu masa moleculară mai mică de 10kD la extractul de proteine sumare a fost adăugat un volum de tampon pentru proteină cu o concentrație de 2 ori mai mare decât cea recomandată în protocolul standard.

Rezultate și discuții

Mecanismele de reglare a sintezei proteinelor sunt determinate de diverși factori, inclusiv de adaptabilitatea înaltă a cianobacteriilor la modificările componenței chimice a mediilor de cultivare. Dat fiind faptul că proteinele sunt componentele de bază structurale și funcționale ale celulei, pentru a stabili componența lor calitativă tot mai des se recurge la metoda fracționării în diverse tipuri de geluri prin metoda electroforetică.

Studiul comparativ al spectrului polipeptidic al proteinelor sumare extrase din biomasa de spirulină, cultivată în prezența compușilor coordinați ai Cr(III) și supuse SDS-electroforezei în gel de poli-acrilamidă de 15% a permis evidențierea unor noi benzi cu masele moleculare aparente de 60,4 kDa și de 66,7 kDa (Fig.1).

Sinteza peptidelor cu masa moleculară de 66,2 kDa a fost observată și în cazul cultivării cianobacteriei *Spirulina platensis* în prezența concentrațiilor înalte de ioni de Na⁺ [6]. Proteinele cu mase moleculare similare fac parte din familia șaperonilor, care au rolul de reparare a proteinelor cu o conformație spațială eronată [7].

Masa moleculară aparentă de 60,7 kDa este caracteristică fitochelatin sintazei (EC 2.3.2.15), enzimă responsabilă de sinteza din glutatation a fitochelatinelor (PC) – o clasă de peptide sintetizate posttranslațional ce joacă un rol important în reglarea concentrațiilor intracelulare ale metalelor [8].

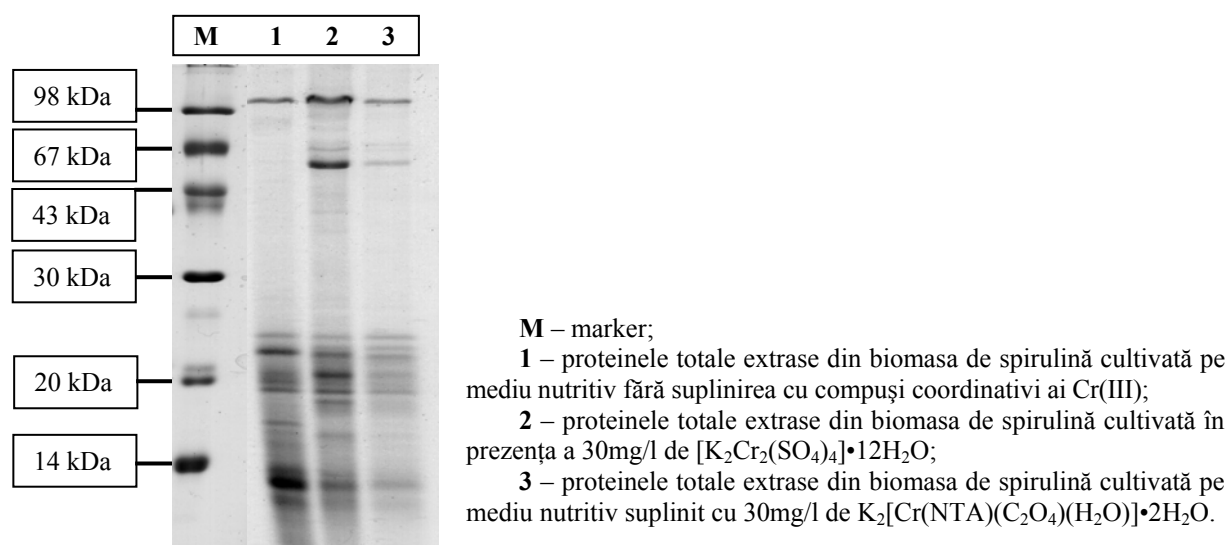


Fig.1. Electroforegrama proteinelor sumare extrase din biomasa de spirulină.

Până în prezent la procariote și, în special, la cianobacterii nu au fost identificate nici PC, nici gene care ar codifica PC-sintaza. Totuși, în urma secvențării genomului cianobacteriei *Nostoc sp.* PCC7120, a fost stabilită prezența genei care codează o proteină similară PC sintazei – *alr0975*. În rezultatul recombinării a fost demonstrat că proteina Alr0975 este o formă primară a PC sintazelor descrise la organisme eucariote [9].

De asemenea, conform datelor experimentale obținute în acest studiu, au fost depistate benzi cu mase moleculare de 24,5, 22,2, 20,0 și 19,1 kDa, care, conform rezultatelor obținute de alți cercetători, corespund α și β -subunităților ficocianinei și aloficocianinei [10]. Benzile cu masele moleculare aparente de 11,6 kDa corespund citocromului c550 din fotosistema II, iar cele de 11,03 kDa posibil fac parte din familia feridoxin-reductazelor care participă la procesul de transfer al electronilor [11].

Așadar, în baza analizei rezultatelor obținute se poate concluziona că la cultivarea tulpinei cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în prezența unor compuși coordinați ai Cr(III) se produc schimbări calitative în componența proteinelor sumare. Are loc sinteza unor noi polipeptide cu masa moleculară de 60,4 kDa, apropiată proteinelor din familia șaperonilor și 66,7 kDa, caracteristică fitochelatin sintazei (EC 2.3.2.15), enzimă responsabilă de sinteza fitochelatinelor.

Referințe:

1. Chen H., Pan G., Yan H., Qin Y. Toxic effects of hexavalent chromium on the growth of blue-green microalgae // Huan Jing Ke Xue. - 2003. - Vol.24. - No.2. - P.13-18.

2. Rudic V., Cojocari A., Cepoi L., Chiriac T., Rudi L., Gudumac V., Macari V., Codreanu Sv., Bulimaga V., Dudnicenco T., Dencicov L., Ghelbet V., Crudu D., Miscu V., David Sv. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice. - Chișinău: Elena VI SRL, 2007. - 365 p.
3. Зарецкая Е., Мазо В. Распределение эссенциальных микроэлементов во фракциях биомассы пищевой микроводоросли *Spirulina platensis* // Вопросы Питания. - 2004. - №2. - С.28-31.
4. Reva V., Ciobanu V., Mueller-Uri F. Strategia și tactica izolării și purificării proteinelor. - Chișinău, 2001. - 186 p.
5. Ibidem.
6. Verma K. Mohanti P. Alterations in the structure of phycobilisomes of the cyanobacterium, *Spirulina platensis* in response to enhanced Na⁺ level // World Journal of Microbiology and Biotechnology – 2000. - Vol.16. - No8-9. - P.795-798.
7. Horwich A., Fenton W., Charman E., Farr G. Two families of chaperonin: physiology and Mechanism // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. - 2007. - No23. - P.115-145.
8. Hirata K., Tsuji N., Miyamoto K. Biosynthetic regulation of phytochelatin, Heavy Metal-Binding Peptides // J. Biosci. Bioengin. - 2005.- Vol.100. - No6. - P.593-599.
9. Tsuji N., Nishikori S., Iwabe, O., Shiraki K., Miyasaka, H., Takagi M., Hirata K., Miyamoto K. Characterization of phytochelatin synthase-like protein encoded by alr0975 from a prokaryote, *Nostoc sp.* PCC 7120 // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2004. - No315. - P.751-755.
10. Soundarapandian P., Vasanthi B. Effects of chemical parameters on *Spirulina platensis* biomass production: optimized method for phycocyanine extraction // International Journal of Zoological Research. - 2008. - Vol.4. - No1. - P.1-11.
11. Minami Y., Wada, K., Matsubara H. The isolation and characterization of a cytochrome b6f complex from the cyanobacterium *Spirulina sp.* // Plant and Cell Physiology. - 1989. - Vol.30. - No1. - P.91-98.

Notă: Materialele au fost prezentate la Simpozionul Internațional *Mecanisme molecular-genetice ale proceselor metabolice*, 4 septembrie 2008, Chișinău, Moldova.