

CZU: 577.15: 543.544

**EVALUAREA SPECTRULUI DE PEPTIDE LA FRAȚIONAREA
PRIN METODE CROMATOGRAFICE A HIDROLIZATELOR ENZIMATICE
ALE FICOCIANINEI ȘI Se-FICOCIANINEI**

*Angela RUDAKOVA., Valentina BULIMAGA, Maria PISOVA,
Veaceslav REVA, Natalia CLIMOVA, Sergiu RUDAKOV, Liliana ZOSIM*

Universitatea de Stat din Moldova

A fost efectuată evaluarea comparativă a hidrolizatelor papainice și triptice ale ficocianinei și Se-ficocianinei în urma separării prin metoda HPLC cu faze inverse pe coloana de ResourceTMRPC. A fost analizat profilul cromatografic al hidrolizatelor papainice și triptice ale ficocianinei la separare prin gel-filtrare pe coloana de sefadex G-50. Spectrele UV-VIS ale fracțiilor peptidice obținute la separarea prin gel-filtrare a hidrolizatelor ficocianinei au scos în evidență prezența peptidelor legate cu cromoforul.

Cuvinte-cheie: ficocianină, Se-ficocianină, hidroliză, peptide, separare.

EVALUATION OF PEPTIDES SPECTRUM AT FRACTIONATION OF ENZYMATIC HYDROLYSATES OF PHYCOCYANIN AND Se-PHYCOCYANIN BY CHROMATOGRAPHIC METHODS

A comparative evaluation of papain and trypsin hydrolysates of phycocyanin and Se-phycocyanin after separation by HPLC with reverse phase on the ResourceTMRPC column was performed. The chromatographic profile of peptides from the trypsin and papain hydrolysates of phycocyanin at separation by gel filtration on Sephadex G-50 column was analyzed. UV-VIS spectra of peptides fractions obtained by gel filtration separation of phycocyanin hydrolysates revealed the presence of chromopeptides.

Keywords: phycocyanin, Se-phycocyanin, hydrolysis, peptides, separation.

Introducere

În conformitate cu cercetările recente, cianobacteria *Spirulina platensis* și, în special, proteina pigment – C-ficocianina pot acționa în calitate de eliminatori de specii reactive de oxigen și pot diminua acumularea de radicali liberi *in vivo*. Mai mult ca atât, ficocianina poate întârzia senescența, diminua procesele de formare a celulelor canceroase și posedă acțiune antihipertensivă [1]. Prin urmare, este oportună utilizarea spirulinei nu doar ca supliment alimentar, dar și ca sursă de obținere a ficocianinei, precum și a hidrolizatelor ei peptidice pentru utilizare în profilaxia și tratarea unor afecțiuni cauzate de radicalii liberi, inclusiv a cancerului.

Un rol important în acest context ar putea reveni spirulinei îmbogățite cu seleniu legat organic, precum și ficocianinei cu conținut de Se. Biodisponibilitatea înaltă a seleniului la administrarea spirulinei îmbogățite cu seleniu și a Se-ficocianinei a fost demonstrată în unele studii anterioare, efectuate pe șobolani [2]. Pentru obținerea biomasei de spirulină cu un conținut bogat de Se, mai mulți cercetători au utilizat cultivarea spirulinei în prezența Na₂SeO₃ [3-8].

Cercetările noastre recente au demonstrat posibilitatea utilizării Fe₂Se₃O₉·6H₂O pentru obținerea biomasei de spirulină cu conținut bogat de seleniu [9,10]. Prezintă interes nu doar elaborarea procedurilor de obținere a biomasei de spirulină îmbogățite cu seleniu și Se-ficobiliproteine, dar și a peptidelor din Se-ficocianină prin hidroliza enzimatică, pentru a fi utilizate în calitate de remedii naturale în profilaxia și tratarea cancerului.

Scopul lucrării constă în evaluarea spectrului de peptide din hidrolizatele enzimatică ale ficocianinei și Se-ficocianinei la fracționare prin metode cromatografice.

Pentru realizarea scopului au fost trasate următoarele obiective:

- fracționarea peptidelor prin gel-filtrare pe coloana de sefadex G-50 și/sau separarea lor de restul de proteină nehidrolizată (în cazul hidrolizatelor triptice);
- UV-VIS spectrul fracțiilor după gel-filtrare pe coloana de sefadex G-50;
- cromatografia HPLC cu faze inverse pe coloana de Resource RPC și evaluarea comparativă a spectrului de peptide obținute la hidroliza papainică și triptică a ficocianinei și Se-ficocianinei.

Material și metode

Cultivarea și obținerea biomasei de spirulină îmbogățite cu seleniu. Cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* a fost efectuată conform procedurii descris anterior [9]. Biomasa a fost separată de lichidul cultural

prin filtrare, spălată cu 1,5% soluție acetat de amoniu și apă bidistilată. Biomasa obținută a fost suspendată în apă (20 mg/ml) și supusă congelării.

Extragerea și purificarea ficocianinei și Se-ficocianinei. Ficocianina a fost obținută conform protocolului descris anterior [11]. Extractul sumar de Se-ficocianină a fost obținut prin extragere cu apă bidistilată din biomasa de *Spirulina platensis* îmbogățită cu seleniu, supusă în prealabil congelării-decongelării repetate pentru distrugerea pereților celulari. În acest scop, la 1 volum suspensie de spirulină (20 mg/ml) au fost adăugate 2 volume de apă distilată și, după agitarea suspensiei la 4°C timp de 15-30 min., proba a fost supusă centrifugării la 10000 rot/min. Extractul de Se-ficocianină a fost supus fracționării cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ în două etape: până la 25% saturație, după care precipitatul a fost înlăturat, iar la supernatant a fost adăugat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ până la 50% saturație. Precipitatul a fost separat prin centrifugare la 6000 rot/min și dizolvat în soluție 3M NaCl, pH 8,0. Purificarea ficocianinei a fost efectuată pe coloana de phenyl-sepharose ($\varnothing = 1,7\text{cm}$, $h = 5\text{cm}$), echilibrată cu soluție 3M NaCl, pH 8,0. Viteza de eluție 80 ml/oră. Eluția a fost efectuată consecutiv cu soluție de 1M, 0,5 NaCl și H_2O , respectiv. Se-ficocianina a fost colectată în principal la eluție cu 1M NaCl. Puritatea ficocianinei la fiecare etapă de purificare a fost evaluată prin raportul A_{620}/A_{280} .

Obținerea hidrolizatului de ficocianină și separarea fracțiilor peptidice. Hidroliza ficocianinei a fost efectuată cu tripsină și papaină în raport de (1:10) în decurs de 10 ore, la temperatura de 30°C. Hidroliza enzimatică a soluției de ficocianină (3 mg/ml) a fost efectuată în 0,5M soluție NaCl, pH 8,0, în prezența mercaptoetanolului (2 mcl/ml), la temperatura de 30°C. Hidroliza cu papaină a fost stopată prin adăugarea inhibitorului E64, iar fracția de proteină parțial hidrolizată era absentă. După gel-filtrare pe coloana de sephadex G-50 (Sigma Aldrich) a fost efectuată dializa probelor de peptide și analizat spectrul UV-VIS al fracțiilor polipeptidice. Din hidrolizatele ficocianinei și Se-ficocianinei cu tripsina fracția proteinei parțial hidrolizate a fost în prealabil separată de peptide la filtrare prin centricon (cut-off < 30 kDa). Cromatografia HPLC cu faze inverse a fost efectuată pe coloana de ResourceTM RPC (Sigma Aldrich), efectuând eluția peptidelor în gradient de concentrații de acetonitril în soluție de 0,1% CF_3COOH : sol. A – 0,1% CF_3COOH în H_2O și B – 50% sol. A și 50% acetonitril.

SDS-electroforeza în gel de poliacrilamidă. Ficocianina obținută în rezultatul purificării a fost precipitată cu acid tricloracetic, spălată cu acetonă și dizolvată în soluție tampon pentru proteină. SDS-electroforeza a fost efectuată în gel de poliacrilamidă de 15% în sistemul Laemli [12]. Pentru determinarea masei moleculare a proteinelor au fost utilizați markeri Eichprotein cu mase moleculare 14,3, 20,1, 26,6, 39,2 și 55,6 kDa. Benzile proteice în gelul de poliacrilamidă au fost fixate cu amestec etanol: apă: acid acetic (5:5:1) și colorate cu Coomassie G-250 (Serva, Germania) în decurs de 10-20 min., cu spălarea ulterioară a gelului cu soluție 7% CH_3COOH . Scanarea gelurilor a fost efectuată la Image Scanner III. Masele moleculare ale benzilor electroforetice au fost determinate utilizând programa Kodak.

Rezultate și discuții

Hidrolizatele ficocianinei cu papaina au fost supuse separării prin gel-cromatografie pe coloana de G-50, iar soluțiile eluate, care se deosebeau după culoare, au fost separate în 4 fracții aparte, care au inclus și cele 2 picuri proeminente (fracția 2 – primul pic și fracția 3 – al doilea pic) (Fig. 1a). La separarea hidrolizatului triptic al ficocianinei prin gel-filtrare (Fig. 1b) se observă 4 picuri, primul dintre care este colorat în albastru se eluează după volumul liber și poate reprezenta restul de proteină nehidrolizată, după care urmează 2 picuri peptidice (fr. 2 și 3) și ultima – fracția 4, care, probabil, reprezintă fracția de aminoacizi liberi.

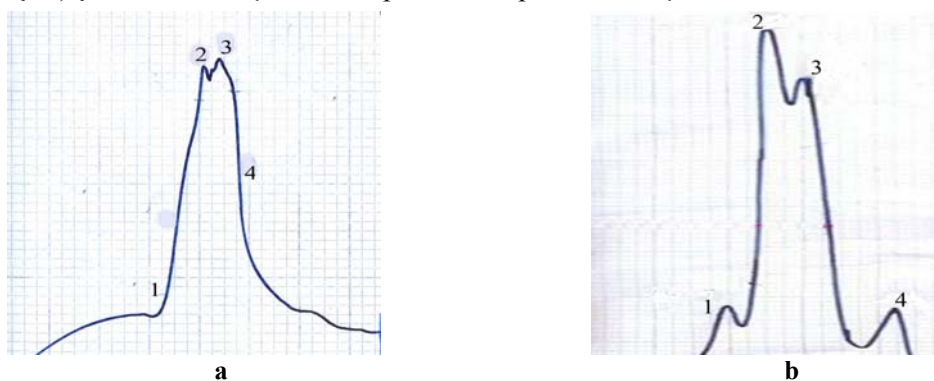


Fig.1. Gel-filtrarea pe coloana de sefadex G-50 a hidrolizatelor peptidice obținute la hidroliza ficocianinei cu papaina (a) și tripsina (b).

A fost trasat spectrul UV-VIS al fracțiilor colectate separat după gel-filtrare și efectuată analiza lor comparativă (Fig. 2a și 2b). Spectrul UV-VIS al fracțiilor peptidice 3 și 4 din hidrolizatul papainic diferă de fracțiile 1 și 2 prin prezența a 2 maximumuri de absorbție la 620 și 350 nm, caracteristice pentru cromopeptide. Prezența cromopeptidelor în hidrolizat a fost observată și de Swanson la analiza spectrului de absorbție al peptidelor obținute la hidroliza ficocianinei cu tripsina [13]. Din rezultatele obținute se observă că absorbția peptidelor la 280 nm variază de la caz la caz, valorile maxime fiind înregistrate în fracțiile 3 și 4, ceea ce demonstrează predominarea peptidelor legate cu cromoforul.

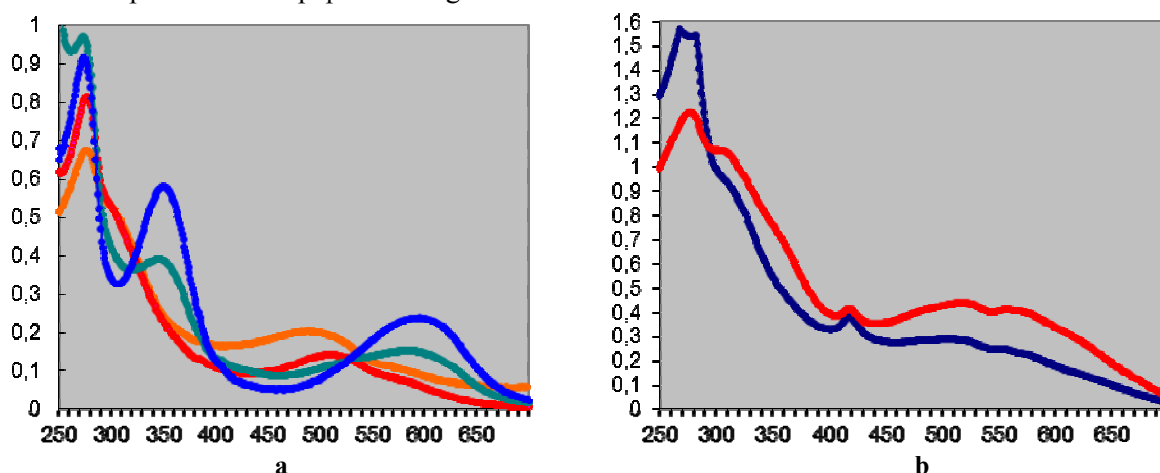


Fig.2. Evaluarea spectrului UV-VIS al fracțiilor peptidice obținute la gel-filtrare.

- a) hidrolizatul papainic al ficocianinei: fr.1 – cul. oranj, fr.2 – cul. roșie, fr.3 – cul. verde și fr.4 – cul. albastră;
b) hidrolizatul triptic al ficocianinei: fr.2 – cul. roșie și fr. 3 – cul. albastră.

Scanarea spectrului UV-VIS al fracțiilor obținute la gel-filtrare în cazul hidrolizatului triptic al ficocianinei (Fig. 2b) a scos în evidență că cele 2 picuri (fr. 2 și 3, Fig. 1b) sunt peptide legate cu cromoforul. Totuși, în rezultatul hidrolizei are loc modificarea cromoforului în fracțiile peptidice și apariția unui platou întins în diapazonul de 450-620 nm și a 2 picuri proeminente la 420 nm. Prezența picului de absorbție la 420 nm ar putea aparține unor cromopeptide izomere [14]. Acest fapt poate fi legat de transformarea cromoforului în condiții de hidroliză mai avansată a subunităților α și β . A fost detectată și prezența unei fracții cu masa moleculară relativ joasă în hidrolizatul triptic, care posibil denotă prezența aminoacizilor liberi (Fig. 1b).

Pentru evaluarea comparativă a componenței peptidice, hidrolizatele ficocianinei și Se-ficocianinei cu papaina și tripsina au fost supuse cromatografiei prin metoda HPLC cu faze inverse pe coloana de ResourceTM RPC. (Vcol=3ml, 1 ml/min, gradient: sol. A – 0,1% CF₃COOH în H₂O și B – 50% sol. A și 50% acetonitril), fiind filtrate prealabil prin centricon (cut-off < 30kDa). În ambele hidrolizate papainice se observă prezența în principal a 3 fracții de peptide și doar în hidrolizatul ficocianinei (în cantități minime) a unei fracții neadsorbite, care se eluează cu tamponul inițial (Fig. 3a).

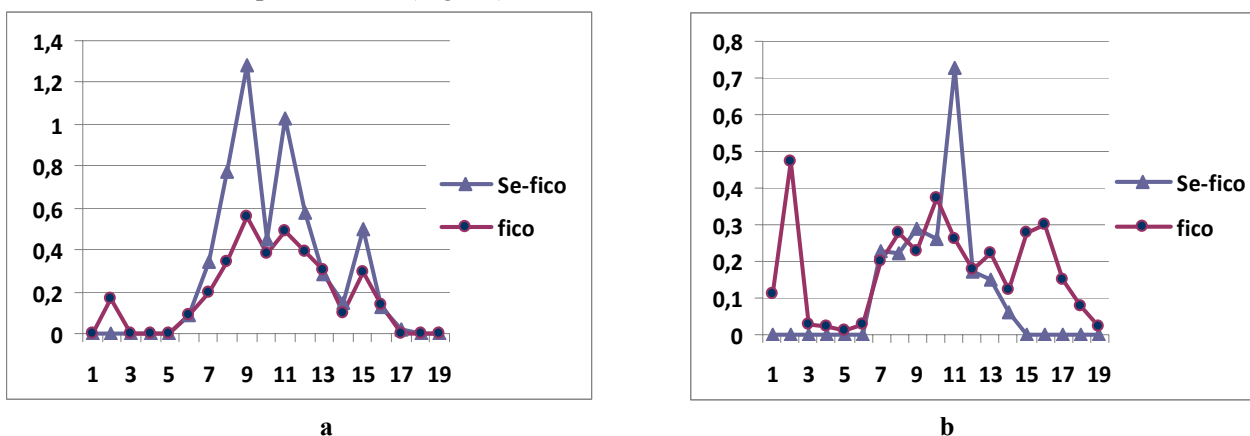


Fig.3. Evaluarea comparativă a profilului peptidelor din hidrolizatele ficocianinei și Se-ficocianinei cu papaina (a) și tripsina (b) după separarea lor prin cromatografia HPLC cu faze inverse pe coloana de ResourceTM RPC.

Peptidele din fracțiile obținute după separarea pe coloana de ResourceTM RPC a hidrolizator papainice și triptice (Fig. 3a și 3b) au fost determinate cantitativ prin metoda Lowry, iar în rezultatul analizei profilului peptidelor din ambele hidrolizate triptice putem constata că ele conțin și fracții de peptide care ar putea avea proprietăți similare (fr. 7-13). Totuși, în cazul hidrolizatului triptic al ficocianinei spectrul peptidelor este diferit de cel al hidrolizatului Se-ficocianinei și conține suplimentar încă 2 fracții: una nedsorbită și alta care se eluează la aplicarea gradientului cu concentrații mai înalte de acetonitril (fr. 15-18).

Studiul comparativ al electroforegramelor ficocianinei și Se-ficocianinei a scos în evidență prezența și în componența Se-ficocianinei a celor 2 subunități - α și β cu mase moleculare identice cu cele ale ficocianinei (Fig.4). Rezultate similare au fost relatate și de cercetătorii chinezi la compararea benzilor electroforetice ale preparatelor purificate de ficocianină și Se-ficocianină [15].

Așadar, rezultatele obținute în prezenta lucrare au scos în evidență similaritatea profilului fracțiilor de peptide obținute la hidroliza ficocianinei și Se-ficocianinei cu papaina la separarea lor prin HPLC cu faze inverse. Totodată, se observă un spectru mai variat de peptide în cazul hidrolizatului triptic al ficocianinei, comparativ cu cel al Se-ficocianinei. Prin analiza spectrelor UV-VIS a fost demonstrată prezența cromopeptidelor în hidrolizatele papainic și triptic ale ficocianinei.

Concluzii

1. Evaluarea comparativă a hidrolizator papainic și triptic ale ficocianinei și Se-ficocianinei în urma separării prin metoda HPLC cu faze inverse pe coloana de ResourceTM RPC a scos în evidență anumite particularități specifice: prezența a 3 fracții peptidice similare după profilul de eluție în hidrolizat papainic și un spectru mai variat de peptide în cazul hidrolizatului triptic al ficocianinei, comparativ cu cel al Se-ficocianinei.

2. A fost efectuată separarea cromatografică prin gel-filtrare pe coloana de sefadex G-50 a hidrolizator papainic și triptic ale ficocianinei. Spectrele UV-VIS ale fracțiilor peptidice obținute la separarea prin gel-filtrare au scos în evidență prezența peptidelor legate cu cromoforul.

Referințe:

1. ERIKSEN, N.T. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol.80, p.1-14.
2. KRAVCHENKO, L.V., GLADKIKH, O.L., GMOSHINSKIĬ, I.V., MAZO, V.K. Selenium enriched spirulina and phycocyanin are sources of bioavailable selenium. In: *Vopr. Pitan.*, 2008, vol.77, no.4, p.63-65.
3. TAMBIEV, A.K.H., KIRIKOVA, N.N., MAZO, V.K., AND SKAL'NYI, A.V. *Method for Production of Selenium-Containing Preparation from Spirulina Biomass*. Patent RF 2096037, class A 61 K 33/04, 1998.
4. 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*, 2002, vol.49, Issue 2, p.235-241.
5. MOSULISHVILI, L.M., KIRKESALI, E.I., BELOKOBYSKY, A.I., KHIZANISHVILI, A.I., FRONTASYEVA, M.V. Experimental Substantiation of the Possibility of Developing Selenium and Iodine Containing Pharmaceuticals Based on Blue-green Algae *Spirulina platensis*. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, p.87-97.
6. CHEN, T., ZHENG, W., YANG, F., BAI, Y., WONG, Y.S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, vol.39, no.1, p.103-107.
7. CHEN, T., ZHENG, W., WONG, Y.S., YANG, F., BAI, Y. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. In: *Bioresource Technology*, 2006, vol.97, no.18, p.2260-2265.
8. CHEN, T., WONG, Y.S., ZHENG, W., Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. In: *Phytochemistry*, 2006, vol.67, no.22, p.2424-2430.
9. ȘOVA, S., RUDIC, V., BULIMAGA, V., DJUR, S. Procedeu de obținere a selenitului de fier $Fe_2Se_3O_9 \cdot 6H_2O$ și procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu utilizarea acestui compus ca sursă de seleniu și fier. Brevet de invenție MD 4123. 2011-07-31.
10. 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.

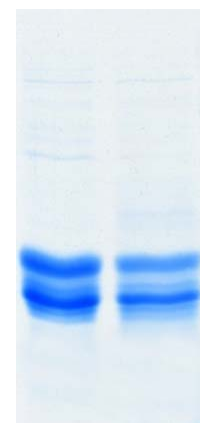


Fig.4. Electroforegrama preparatelor de ficocianină și Se-ficocianină, obținute la purificare prin cromatografie pe Phenyl-sepharose.

11. RUDAKOVA, A., SHUTOV, A., RUDACOV, S., BULIMAGA, V., CLIMOVA, N., KAHOVSKAIA, I., PISOVA, M. Mecanismul de proteoliză a ficocianinei, proteinei bioactive din spirulină, sub acțiunea papainei. În: *Studia Universitatis Moldaviae*. Seria „Științe reale și ale naturii”, 2016, no.86(6), p.15-20.
12. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, 1970, vol.227, p.680-685.
13. SWANSON, R.V., ZHOU, J., LEARY J.A., WILLIAMS, T., De LORIMIER, R., BRYANT, D.A., GLAZER, A.N. Characterization of phycocyanin produced by *cpcE* and *cpcF* mutants and identification of an intergenic suppressor of the defect in bilin attachment. In: *J. Biol. Chem.*, 1992, vol.267, p.16146-16154.
14. THUEMMLER, F. Models for the photoreversibility of phytochrome: Z,E Isomerization of chromopeptides from phycocyanin and phytochrome. In: *Tetrahedron*, 1983, vol.39, p.1943-1951.
15. CHEN, T., WONG, Y.S., ZHENG, W. Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. In: *Phytochemistry*, 2006, vol.67, no.22, p.2424-2430.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului instituțional 15.817.05.02F.

Prezentat la 15.11.2016