

MECANISMUL DE PROTEOLIZĂ A FICOCIANINEI, PROTEINEI BIOACTIVE DIN SPIRULINĂ SUB ACȚIUNEA PAPAINEI

*Angela RUDAKOVA, Andrei SHUTOV, Serghei RUDACOV,
Valentina BULIMAGA, Natalia CLIMOVA,
Irina KAHOVSKAIA, Maria PISOVA*

Universitatea de Stat din Moldova

Elaborarea unor procedee de obținere a peptidelor bioactive din ficocianină prin intermediul hidrolizei proteolitice prezintă un interes sporit pentru cercetători în contextul utilizării acestora în calitate de remedii anticancer și pentru alte proprietăți terapeutice. Peptidele derivate din ficocianină ar putea manifesta proprietăți terapeutice mult mai pronunțate comparativ cu ficocianina. În prezenta lucrare sunt studiate dinamica proteolizei ficocianinei cu papaina și mecanismul de hidroliză a acestei proteine.

Cuvinte-cheie: *Spirulina, C-ficocianina, proteoliză, peptide bioactive.*

MECHANISM OF PROTEOLYSIS OF C-PHYCOCYANIN, BIOACTIVE PROTEIN FROM SPIRULINA, UNDER THE ACTION OF PAPAINE

The elaboration of the procedures of obtaining of bioactive peptides derived from phycocyanin, as a result of its proteolytic hydrolysis presents great interest for researchers in the terms of their use as anti-cancer drugs and for other therapeutic properties. It can be assumed that peptides derived from phycocyanin could manifest more pronounced therapeutic effects compared to phycocyanin. Dynamics of phycocyanin proteolysis by papain, as well as mechanism of phycocyanin hydrolysis were studied in the present work.

Keywords: *Spirulina, phycocyanin, proteolysis, bioactive peptides.*

În ultimii ani se observă un interes sporit la nivel mondial față de potențialul terapeutic al peptidelor bioactive pentru explorarea activității lor biologice *in vivo*. Peptidele bioactive pot manifesta anumite proprietăți utile, cum ar fi activitățile antioxidante, antimicrobiene, antihipertensive, cito- și imunomodulatorii în sistemul organismului viu. Există oportunități enorme de a valorifica eficient peptidele bioactive pentru utilizarea lor în tratamentul, prevenirea și ameliorarea diferitelor afecțiuni, inclusiv a cancerului [13,25].

Din punct de vedere nutrițional, peptidele sunt mai biodisponibile decât proteinele sau aminoacizii liberi [21]. În plus, s-a stabilit că peptidele cu greutate moleculară mică obținute prin hidroliză sunt mai puțin alergene decât proteinele native, ceea ce explică și faptul, de ce hidrolizatele de proteine din lapte sunt utilizate pe scară largă în formularea alimentelor hipoalergenice pentru sugari [11,12]. Există o mare varietate de activități fiziologice induse de peptide bioactive, ceea ce este condiționat de numărul, ordinea și proprietățile aminoacizilor prezenți în peptidă [1,2,7]. Prin urmare, peptidele bioactive sunt candidații potriviți pentru o nouă eră a produselor farmaceutice, mai ales datorită efectelor secundare minime și acțiunii benefice asupra organismului.

Un interes sporit față de identificarea unor noi peptide bioactive de origine naturală, care să înlocuiască substanțele medicamentoase, produse pe cale chimică, a permis comunității științifice să cerceteze algele ca o sursă abundentă de substanțe cu efect benefic asupra organismului uman [17,21,23]. Conform datelor din literatură, din reziduul proteic rezultat la procesarea biomasei de *Chlorella vulgaris* și *Spirulina platensis* a fost obținut un peptid cu proprietăți antioxidante și care s-a dovedit a fi inhibitor al enzimei de conversie a angiotensinei [27,30].

Rezultatele numeroaselor cercetări au scos în evidență că ficobiliproteinele, în special ficocianina, posedă un șir de proprietăți bioactive, astfel ca: efect antitumoral, activitate antivirală și antioxidantă, acțiune hematopoetică, antialergică etc. [3,5,6,9,10,14,22,26]. Cu toate că a fost stabilită activitatea antitumorală a ficocianinei [18,29], totuși publicațiile privind obținerea peptidelor prin hidroliza enzimatică a ficocianinei și proprietățile lor bioactive sunt într-un număr foarte limitat [4,8,31,34]. Utilizarea hidrolizei enzimatice pentru obținerea peptidelor bioactive din ficocianină și studiul mecanismului acestui proces va permite lărgirea spectrului de remedii naturale cu calități sanogene mai pronunțate.

Material și metode

Biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* a fost obținută la cultivare pe mediul nutritiv Zarrouk, la 30°C și la iluminarea 2000-3000 lx. Cultura a fost agitată periodic în decurs de 10 zile. După filtrare biomasa a fost spălată de 2-3 ori cu apă bidistilată, suspendată în apă și congelată. Ficocianina a fost extrasă și purificată conform protocolului descris anterior [4].

Hidroliza ficocianinei cu papaina (ASC, Sigma) a fost realizată la diferite raporturi enzimă / substrat (1:200 și 1:10, w/w). Hidroliza cu papaina a fost efectuată în soluția tampon standard (0,037 M fosfat-citrat, pH 5,6 (ajustat la tăria ionică de 0,5 prin adăugarea NaCl), ce conținea 0,02% NaN₃, 1 mM EDTA și 10 mM ME). Hidroliza a fost efectuată la 30°C. Evoluția în timp a hidrolizei ficocianinei a fost urmărită prin analiza eșantioanelor de probe din amestecul de incubare la intervale stabilite. Reacția a fost stopată prin adăugarea acidului tricloracetic (TCA) la o concentrație finală de 5% (g/v). După centrifugare, precipitatele rezultate au fost spălate de 3 ori cu exces de acetonă rece, uscate la aer și analizate prin SDS-PAGE.

Electroforeza în gel poliacrilamidă în prezența dodecil sulfatului de sodiu (SDS-PAGE), a proteinelor intacte și a fragmentelor de polipeptide după proteoliză s-a realizat în PAG de 15% în sistemul tampon Laemmli [15].

Pentru separarea peptidelor cu greutate moleculară joasă (1-20 kD) din hidrolizatul ficocianinei a fost utilizată metoda de SDS-PAGE în tamponul Tris-tricină cu utilizarea sistemului de gel discontinuu (4-10-16.5% PAAG) conform metodei Shägger [25]. Pentru determinarea masei moleculare aparente a polipeptidelor au fost utilizați markerii PageRuler (Thermo Scientific, SUA, Eichprotein (Roche) și SD-SDS Marcaj (GE Healthcare, SUA).

Canțitatea de proteină în fracții și preparate a fost determinată prin metoda Lowry [16]. Proteina restantă din hidrolizate, după precipitare cu acid tricloracetic, a fost determinată prin legarea colorantului Brilliant blue [32].

Concentrarea hidrolizatelor de ficocianină și separarea proteinei nehidrolizate a fost efectuată la centrifugare prin filtre Vivaspın (Sartorius Stedium Biotech) de 20 sau 2 ml (cut off 10 și 30 kD) la 5000 rpm, la temperatura de 15°C în decurs de 40 min.

Analiza densitometrică. Electroforegramele au fost scanate (Image Scanner III, GE Healthcare) și cantitățile molare relative ale polipeptidelor detectate prin metoda SDS-PAGE au fost calculate utilizând masele lor moleculare și concentrațiile ponderii relative, determinate prin densitometria electroforegramelor, utilizând Phoretix 1D Gel Analysis, v.5.10 (www.totallab.com/products/1d/).

Analiza bioinformatică. Nivelul de accesibilitate la solvent a resturilor aminoacide din structura terțiară a proteinei (ca % de accesibilitate la solvent a restului X în tripeptida GXG) a fost calculată utilizând <http://cib.ct.ocha.ac.jp/biotool/ASA/>. Programul *DeepView/Swiss-PdbViewer v.3.7.* a fost utilizat pentru construirea diagramei pe bandă (strip chart) a structurii terțiare a ficocianinei. Punctele sensibile la atacul proteolitic din secvența aminoacidică a ficocianinei au fost calculate cu utilizarea programului *PeptideCutter* (http://web.expasy.org/peptide_cutter/).

Rezultate și discuții

Mecanismul de proteoliză a ficocianinei. Preparatele de ficocianină hidrolizată cu papaina au fost analizate prin metoda SDS-PAGE (Fig.1). Papaina, o enzimă cu specificitate largă, hidrolizează profund ficocianina, formând 4 grupuri de peptide (p1-p4) cu o vastă heterogenitate, principala bandă peptidică fiind p3 (Fig.1). În rezultatul analizei legăturilor peptidice (*PeptideCutter* program) în fiecare subunitate α și β a ficocianinei, care ar putea fi supusă scindării, au fost găsite mai mult de 40 puncte sensibile la acțiunea papainei (Fig.2).

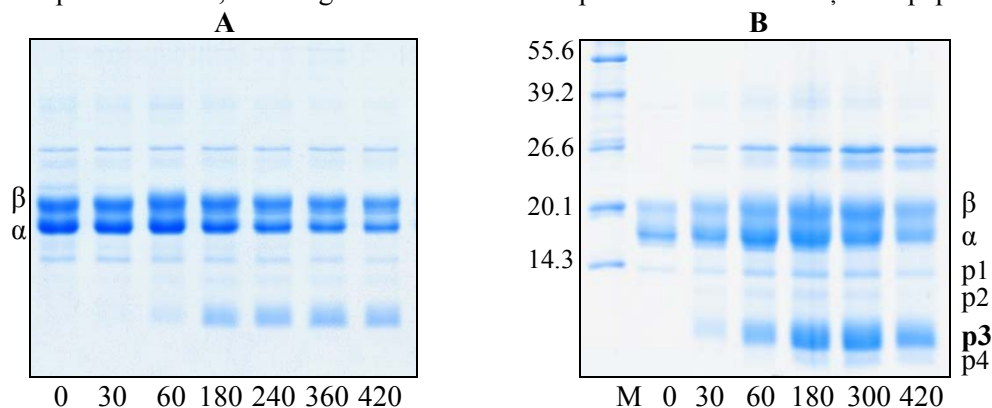


Fig.1. SDS-PAGE a preparatelor de ficocianină hidrolizată cu papaina în raport 1:200 (A) și 1:10(B).

Molecula C-ficocianinei constă din doi homo-hexameri ai subunităților $\alpha\beta$, a căror structură este realizată exclusiv din α -helixuri (Fig.2). Catenele omoloage α - și β , diferite după masa moleculară (respectiv, 17,6 kDa și 18,1 kDa), sunt structural echivalente. Astfel, la combinarea structurilor spațiale ale catenelor α - și β , abaterea medie-pătratică (RMSD) a poziției 133 a $C\alpha$ -atomilor resturilor aminoacide este de 1,35 Å. Cele trei resturi de cisteină (α -catena, Cys84; β -catena, Cys 82 și Cys153) sunt conectate cu cromoforii (Fig.2).

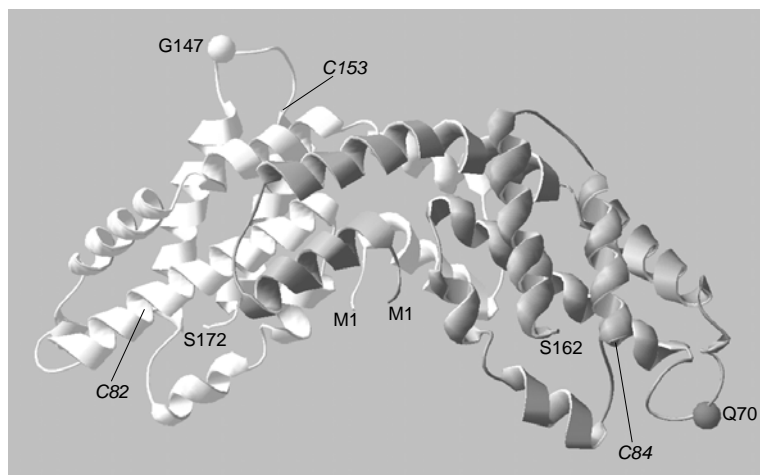


Fig.2. Diagrama pe bandă a structurii terțiare a $\alpha\beta$ subunității C-ficocianinei pdb|1gh0. Partea întunecată a diagramei corespunde α -catenei (M1-S162), ce conține cromoforul α 84, partea colorată în alb (M1-S172) – β -catena, ce conține cromoforii β 82 și β 153. Sferele indică poziția resturilor Gln70 (α -catena) și Gly147 (β -catena), caracterizate printr-o accesibilitate crescută la solvent.

Hidroliza C-ficocianinei cu papaina decurge în două etape (Fig.3). La etapa inițială are loc o reducere relativ rapidă a cantității proteinei reziduale însoțită de apariția în hidrolizat a unor fragmente de catene polipeptidice cu masele moleculare aparente de 5,4-6,9 kDa (Fig.1). Prin urmare, prima fază a modificărilor calitative ale substratului indică hidroliza C-ficocianinei după mecanismul de proteoliză limitată. Proteoliza ulterioară are loc ca o reacție de ordinul pseudo întâi (porțiunea liniară a dependenței). Acest lucru demonstrează că la a doua etapă are loc clivajul proteinei în profunzime, exclusiv după mecanismul one by one [28].

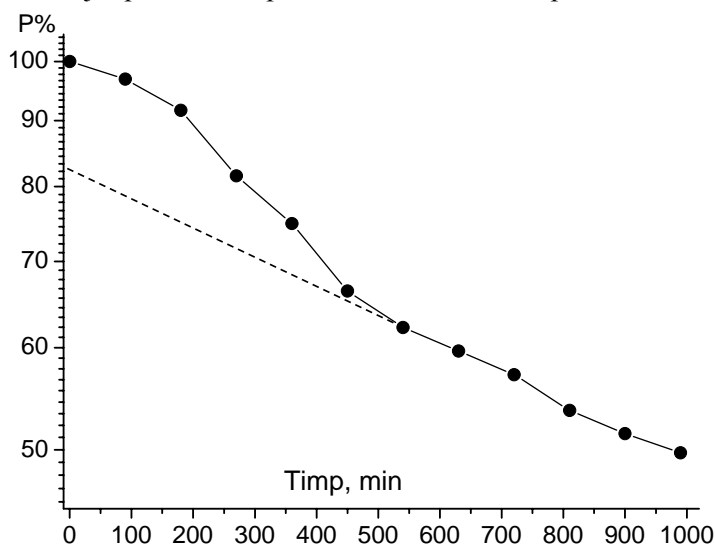


Fig.3. Modificarea conținutului proteinei restante cu masă moleculară înaltă pe parcursul hidrolizei C-ficocianinei cu papaina.

Astfel, înainte de începerea celei de a doua faze de hidroliză, proteoliza limitată a proteinei este însoțită de formarea produsului final – ficocianina-P. Prin extrapolarea porțiunii liniare a modificării cantitative la momentul respectiv, putem obține o valoare relativ medie a masei moleculare a C-ficocianinei-P, egală cu

82,3% din masa proteinei native. C-ficocianina-P este heterogenă în componența sa, incluzând atât α - și β -catenele intacte, cât și fragmente ale acestora (Fig.1). Analiza structurii C-ficocianinei intacte scoate în evidență prezența în moleculă a resturilor de aminoacizi cu accesibilitate crescândă la solvent în fiecare dintre α - și β -catene ale homo-dodecamerului: Gln70 în α -catena ($0,843 \pm 0,03\%$) și Gly147 în β -catena ($0,935 \pm 0,05\%$). Aceste resturi aparțin buclelor alungite între α -helixurile (helix-bucă-helix) expuse la suprafața moleculei (Fig.2). Disponibilitatea crescută a restului de aminoacid la solvent (ASA) în structura proteinei [20] sugerează sensibilitatea potențială la proteoliza limitată [33].

Prin urmare, este foarte probabil că acțiunea inițială a papainei prin proteoliza limitată a C-ficocianinei este însoțită de scindarea legăturilor peptidice în buclele respective. La acțiunea ulterioară a enzimei are loc, probabil, scindarea suplimentară în afara buclei, iar acest lucru duce la formarea de fragmente cu masa moleculară relativ scăzută și a proteinei cu masă moleculară joasă. Eventual, compoziția acestor peptide include Cys84 (α -catena) și Cys153 (β -catena) legate cu cromoforul (Fig.2).

Produsele peptidice ale C-ficocianinei după proteoliză cu papaina. Pentru precizarea masei moleculare aparente a peptidelor obținute în rezultatul hidrolizei cu papaina (1:10) fracția a fost dializată, uscată și dizolvată în tamponul Tris-tricină. Electroforeza a fost efectuată în sistemul de gel discontinuu (4-10-16,5% PAAG) [25].

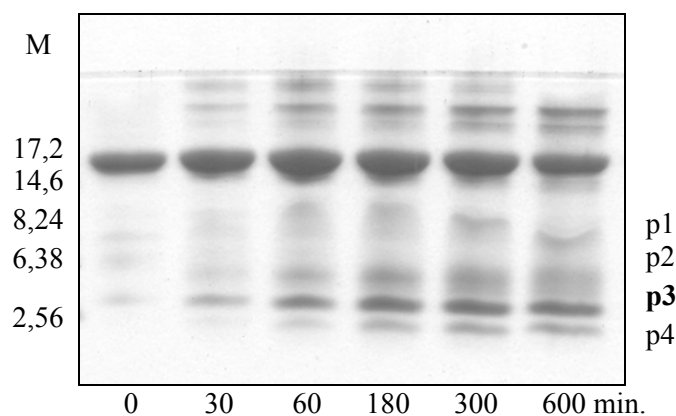


Fig.4. Separarea peptidelor ficocianinei obținute la proteoliză cu papaina prin SDS-PAGE în sistemul Tris-tricină (5, 10 și 16,5% gel). M – markeri; 0-600 min. – timpul de hidroliză; P1-P4 – fragmente de peptide.

Au fost detectate 4 benzi polipeptidice cu greutatea moleculară mai mici de 8,2kD (Fig.4, p1-p4). Masele moleculare ale peptidelor au fost determinate prin densitometrie (Tab.1). S-a constatat că zona abundentă p3 reprezintă peptida cu masa moleculară aparentă de 3,017 kDa. După analiza densitometrică a produselor de hidroliză proiectate pe datele structurii terțiare a C-ficocianinei, punctele de scindare cu papaina se află între helixurile din α -catena.

Astfel, formarea fragmentului de peptidă din α -catena ce conține cromoforul α 84, ca urmare a proteolizei limitate a C-ficocianinei, este foarte probabilă. Peptidele obținute vor fi utilizate pentru analiza ulterioară a activității lor biologice posibile.

Tabel

Masele moleculare aparente ale polipeptidelor ficocianinei obținute la proteoliză cu papaina (determinate prin analiza densitometrică)

Nr. liniei/ timpul reacției, min.	Catena, fragmentul	1 /0	2 /30	3 /60	4 /180	5 /300	6 /600
Masa moleculară aparentă a peptidelor, kDa	β -catena/ α -catena	16,65	16,67	16,88	16,65	16,65	16,54
	p1	-	-	<i>11,180</i>	<i>11,580</i>	<i>10,320</i>	<i>8,591</i>
	p2	-	-	<i>5,527</i>	<i>5,297</i>	<i>5,146</i>	<i>5,070</i>
	p3	-	<i>3,626</i>	<i>3,420</i>	<i>3,284</i>	<i>3,083</i>	<i>3,017</i>
	p4	-	-	<i>1,994</i>	<i>1,872</i>	<i>1,691</i>	<i>1,691</i>

Notă. Masele moleculare ale peptidelor formate la proteoliză sunt marcate în *italic*, peptida principală – *italic*, bold.

Concluzii

Mecanismul de hidroliză a ficocianinei cu papaina se realizează pe două căi: proteoliza limitată și cooperativă. Proteoliza limitată a proteinei este însoțită de formarea produsului final ficocianina-P și fragmente polipeptidice. Proteoliza ulterioară are loc ca o reacție de ordinul pseudo-întâi după mecanismul one by one.

Bibliografie:

1. AGYEI, D., DANQUAH, M.K. Industrial scale manufacturing of pharmaceutical grade bioactive peptides. In: *Biotechnol Adv.*, 2011, vol. 29, no.3, p.272-277.
2. AGYEI, D., DANQUAH, M.K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. In: *Trends Food Sci. Technol.*, 2012, vol.23, no.2, p.62-69.
3. BULIMAGA, V., DJUR, S., PISOV, M. et al. Capacitatea antioxidantă a preparatelor de ficocianină obținute în baza biomasei de spirulină îmbogățite cu germaniu. În: *Studia Universitatis USM. Seria „Științe ale naturii”*, 2012, no.1 (51), p.9-14.
4. BULIMAGA, V., PISOVA, M., ZOSIM, L. et al. Peptide bioactive algale și perespectiva de utilizare a lor în calitate de agenți terapeutici. În: *Studia Universitatis. Seria „Științe ale naturii”*, 2015, no.1 (81), p.109-116.
5. CANAN, S.-G., KIRAZ-ERDOGAN, D., ONBASILAR, I. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Investigations of the Wound Healing Effect of Crude Spirulina Extract and C-Phycocyanin. In: *J. of Medicinal Plants Research.*, 2013, vol.7, no.8, p.425-433.
6. CHENG, C., XUE, F., WANG, X.-P., PAN, S.-Y. Research Progress in Extraction, Purification and Physiological Activity of Phycobiliprotein. In: *J. Food Science*, 2012, vol 33, no.9, p.251-259.
7. DANQUAH, M.K., AGYEI, D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. In: *OA Biotechnology*, 2012, 29;1(2):5.
8. DENG, W., WANG, X.-Q. Progress of anti-tumor activity of Phycocyanin and it's enzymolied products. In: *Marine Science Bulletin*, 2010, no.3, p.357-360.
9. ЕФРЕМОВА, Н., БУЛЬМАГА, В., РЕВА, В. и др. Получение антиоксидантных препаратов белковой природы из биомассы спирулины. В: *Альгология (Киев)*, 2012, том 22, №3, с.251-258.
10. ERIKSEN, N.T. Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 80, no.1, p.1-14.
11. GREER, F.R., SICHERER, S.H., BURKS, A.W. et al. Effects of Early Nutritional Interventions on the Development of Atopic Disease in Infants and Children: The Role of Maternal Dietary Restriction, Breastfeeding, Timing of Introduction of Complementary Foods, and Hydrolyzed Formulas. In: *Pediatrics*, 2008, vol.121, no.1, p.183-191.
12. HOST, A., HALKEN, S. Hypoallergenic formulas – when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication! In: *Allergy*, 2004 (Suppl. 78), p.45-52.
13. KORHONEN, H., PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. In: *International Dairy Journal*, 2006, vol.16, no.9, p.945-960.
14. KUDDUS, M., SINGH, P., THOMAS, G., AL-HAZIMI, A. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. In: *Bio Med. Research International*, 2013. vol. 2013. Article ID 742859, p.9.
15. LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, 1970, vol.227, p.680-685.
16. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. In: *J. Biol. Chem.*, 1951, vol.193, p.265-275.
17. MIMOUNI, V., ULMANN, L., PASQUET, V. et al. The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. In: *Curr. Pharm. Biotechn.*, 2012, vol.13, no.15, p.2733-2750.
18. PARDHASARADHI, B.V.V., MUBARAK, A.A., KUMARI, A.L. et al. Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. In: *Mol. Cancer Therapy*, 2003, vol.2, no.11, p.1165-1170.
19. PETERSEN, B., PETERSEN, T.N., ANDERSEN, P. et al. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. In: *BMC Structural Biology*, 2009, vol.9, p.51-60.
20. RENUKUNTLA, J., VADLAPUDI, A.D., PATEL, A. et al. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. In: *Int. J. Pharm.*, 2013, vol.447, no.1-2.
21. RODRIGUEZ-GARCIA, I., GUIL-GUERRERO, J.L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. In: *Food Chemistry*, 2008, vol.108, no.3, p.1023-1026.
22. ROMAY, C.H., GONZALEZ, R., LEDON, N. et al. Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. In: *Current Protein and Peptide Science*, 2003, no.4, p.207-216.
23. RUDIC, V. și al. *Ficobiotehnologie, cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău, 2007 (Tipogr. „Elena V.I.” SRL). 365 p. ISBN 978-9975-9892-5-1

24. SAMI, S., NAZAMID, S., FAROOQ, A. et al. Recent Advances in Food Biopeptides: Production, Biological Functionalities and Therapeutic Applications. In: *Biotechnology Advances*, 2014, vol.33, no.1, p.1-37.
25. SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. In: *Nature Protocols*, 2006, vol.1, no.1, p.16-23.
26. SEKAR, S., CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. In: *J. Appl. Phycology*, 2008, vol.20, no.2, p.113-136.
27. SHEIH, I.C., FANG, T.J., WU, T.K. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae waste. In: *Food Chem.*, 2009, vol.115, p.279-284.
28. SHUTOV, A.D., PINEDA, J., SENYUK, V.I., REVA, V.A., VAINTRAUB, I.A. Action of trypsin on glycinin. Mixed-type proteolysis and its kinetics; molecular mass of glycinin-T. In: *Eur. J. Biochem.*, 1991, vol.199, p.539-543.
29. SUBHASHINI, J., MAHIPAL, S.V., REDDY, M.C. et al. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukaemia cell line-K562. In: *Biochemical Pharmacology*, 2004, vol. 68, no.3, p.453-462.
30. SUETSUNA, K., CHEN, J.-R. Identification of Antihypertensive Peptides from Peptic Digest of Two Microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. In: *Mar. Biotechnol.*, 2001, vol.3, p.305-309,
31. TANG, Z.H., JIAO, X.D., ZHOU, Y.L. et al. Optimization for antioxidant phycocyanin peptide production by enzyme hydrolysis using response surface methodology. In: *Marine Science*, 2012, vol.36, no.11, p.50-54.
32. VAINTRAUB, I.A., YATTARA, H.B. Proteolysis of Kunitz soybean inhibitor. Influence on its activity. In: *J. Agric. Food Chem.*, 1995, vol.43, p.862-868.
33. ZAKHAROV, A., CARCHILAN, M., STEPURINA, T. et al. Comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. In: *J. Exp. Bot.*, 2004, vol.55, p.2241-2249.
34. ZHANG, B., ZHANG, X. Separation and nanoencapsulation of antitumor polypeptide from *Spirulina platensis*. In: *Biotechnol Prog.*, 2013, vol.29, no.5, p.1230-1238.

Notă: Rezultatele expuse în prezenta lucrare au fost obținute în cadrul Proiectului instituțional de cercetare 15.817.05.02F cu suportul financiar al AȘM și USM.

Prezentat la 15.10.2015