

Д14-2002-7

Л. М. Мосулишвили\*, А. И. Белокобыльский\*,  
Е. И. Киркесали\*, А. И. Хизанишвили\*,  
М. В. Фронгасьева, С. С. Павлов, С. Ф. Гундорина

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ЭЛЕМЕНТНОГО  
СОСТАВА С-ФИКОЦИАНИНА, ВЫДЕЛЕННОГО  
ИЗ КЛЕТОК СИНЕ-ЗЕЛЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ  
*SPIRULINA PLATENSIS*

Направлено в журнал «Journal of Applied Phycology»

---

\*Институт физики им. Э. Л. Андроникашвили АН Грузии, Тбилиси

## ВВЕДЕНИЕ

С-фикоцианин (С-ФЦ) – особый пигмент фикобилиновой природы – входит в состав сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis* и принимает активное участие в процессах фотосинтеза. С эффективностью порядка 70% С-ФЦ максимально поглощает световое излучение с длиной волны 620 нм, а затем излучает волны с длиной 647 нм.

Большой интерес к практическим аспектам использования сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis* во многом связан с присутствием в ней таких биологически активных веществ, как гамма-линоленовая кислота, бета-каротин, С-ФЦ и другие [1, 2]. Из 55-70% белков, содержащихся в биомассе спироулины и имеющих жизненно важное значение, в среднем 14% приходится на долю С-ФЦ. Он представляет собой сложно организованный кислый глобулярный белок с молекулярным весом 264000 дальтон. Структурное изображение С-ФЦ, полученное для одного из видов цианобактерий методом дифракции рентгеновских лучей при разрешении 1,66 Å, показывает, насколько интересно и сложно его строение (<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi>).

Благодаря своим спектральным свойствам С-ФЦ применяется в иммунологических анализах в качестве флюоресцентных меток, в качестве маркера в гель-электрофорезе, гель-хроматографии и изоэлектрическом фокусировании. Стимулирующий иммунную систему С-ФЦ перспективен при лечении канцерогенных заболеваний и СПИДа.

Высокая радиопротекторная активность С-ФЦ и его тропность к таким элементам, как  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{90}\text{Sr}$  обуславливают 66% эффективности выведения этих изотопов при применении *Spirulina platensis* для реабилитации больных, подвергшихся воздействию радиации, как это было в случае Чернобыля на Украине.

С помощью С-ФЦ в Японии были проведены эксперименты по лечению рака печени у мышей. Авторами работы [3] установлено, что С-ФЦ обладает гепатопротекторными свойствами при лечении химической интоксикации у крыс. В последние годы фикобилипротеины, в частности С-ФЦ, были опробованы и на людях при фотодинамической терапии опухолей [4].

В связи с большим научным и практическим интересом к препаратам С-ФЦ в настоящее время интенсивно ведутся исследования различных уровней его структурной организации и физико-химических свойств, важных для использования С-ФЦ в лечебных и профилактических целях.

## ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Фотосинтетические процессы в клетках сине-зеленых водорослей осуществляются при участии специальных органелл, называемых фикобилисомами. В них локализованы фикобилиновые пигменты трех классов: фикоэритрины (ФЭ), фикоцианины (ФЦ) и аллофикоцианины (АФЦ).

Передача света в фикобилисомах имеет так называемый “каскадный” характер: ФЭ → ФЦ → АФЦ → хлорофилл *a*.

Соотношение фикобилиновых пигментов сильно варьируется у разных видов водорослей и зависит от условий их выращивания, состава питательной среды, pH, температуры, освещения и т.п. [5-8].

Фикобилипротеины — это кислые водорастворимые глобулярные белки, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -полипептидных цепей, к которым ковалентно присоединены одна или две хромофорные группы, представляющие собой четыре линейных пирольных кольца с двумя карбоксильными группами. Спектральные свойства (поглощение и флуоресценция) фикобилипротеинов обусловлены как наличием у них хромофорных групп, так и третичной и четвертичной структурой белковой глобулы.

С-ФЦ, выделенный из *Spirulina platensis* состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -полипептидных цепей, причем, к  $\alpha$ -цепи присоединена одна хромофорная группа, а к  $\beta$ -цепи - две хромофорные группы. Первичная структура  $\alpha$ - и  $\beta$ -полипептидных цепей С-ФЦ из разных биологических объектов изучалась в работах [9, 10]. В растворе С-ФЦ представляет собой смесь мономерных ( $\alpha\beta$ ), тримерных ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> и гексамерных ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> структур. В зависимости от температуры, pH и других условий количественные соотношения этих структур сильно меняются.

Целью настоящей работы являлось исследование особенностей структурной организации и элементного состава С-ФЦ, выделенного из сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*. При этом особый интерес представляло поведение металлов в процессе очистки С-ФЦ для понимания их возможной роли в образовании биокомплексов типа белок-металл-хромофор, а также оценки безопасности препаратов С-ФЦ при их использовании в медицинских целях [11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах был использован штамм микроводоросли *Spirulina platensis* IPPAS В-265 Института физиологии растений АН РФ им. К.А.Тимирязева.

Культивация *Spirulina pl.* проводилась в стандартной питательной минеральной среде Зароука в течение 5 суток методом, описанным в работе [12]. Собранная и промытая дистиллированной водой биомасса *Spirulina pl.* осаждалась центрифугированием, а затем лиофильно высушивалась в специальном, разработанном нами адсорбционно-конденсационном лиофилизаторе [13].

Получение С-ФЦ из биомассы *Spirulina pl.* проводилось методом Тила и Дейла [14] в несколько модифицированном варианте. Методика включала в себя определенный цикл операций по очистке белка с последующим спектрофотометрическим контролем чистоты полученного препарата по отношению пиков поглощения при длинах волн  $\lambda = 620$  и  $280$  нм ( $D_{620}/D_{280}$ ). При  $D_{620}/D_{280} > 4$  препарат С-ФЦ считался высокочистым.

Клетки *Spirulina pl.* разрушались лизоцимом в 0.1 М Na-K-фосфатном буфере pH 6,0. Полученный экстракт, содержащий фикобилипротеины и другие белки путем центрифугирования отделялся от остатков разрушенных клеток. Для предварительной очистки препарата к супернатанту добавлялись различные объемы водонасыщенного сульфата аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Окончательная очистка С-ФЦ осуществлялась многократным пропусканием С-ФЦ через хроматографическую колонку, заполненную ДЭАЭ-целлюлозой и уравновешенную 0,05 М ацетатным буфером с NaCl pH 5,2, с последующим диализом против деионизованной воды.

Полученный препарат С-ФЦ лиофильно высушивался, и из него с помощью титановой пресс-формы готовились таблетки массой 50 мг, предназначенные для проведения нейтронного активационного анализа.

Метод эпитеплового нейтронного активационного анализа (ЭНАА) был ранее использован нами для определения фоновых концентраций макро- и микроэлементов в биомассе *Spirulina platensis* [15]. Нейтронному активационному анализу *Spirulina platensis* посвящены также работы итальянских ученых [16, 17].

Облучение образцов С-ФЦ проводилось на импульсном быстром реакторе ИБР-2 ЛНФ ОИЯИ (Дубна) при потоке нейтронов  $10^{12}$  нейтр./ $(\text{см}^2 \cdot \text{с})$  и очень высоком отношении числа эпитепловых нейтронов к тепловым. Характеристики каналов облучения пневмотранспортной системы и спектрометрической установки лаборатории активационного анализа описаны в работе [18]. Методика ЭНАА биологических образцов применительно к *Spirulina platensis* подробно описана в работе [19].

Исследование структурных особенностей С-ФЦ проводилось с помощью капиллярного электрофореза – эффективного аналитического метода разделения белков и нуклеиновых кислот, находящего в настоящее время все более широкое применение в практике экологии, мониторинга, биотехнологий и т. д.

Эксперименты с С-ФЦ проводились на установке капиллярного электрофореза (КЭ) собственной конструкции, описанной ранее в работе [20]. В установке использовался гибкий силиконовый капилляр с расширением в области детектирования до 200 мкм типа HP — Extended Light Path Capillaries.

Для снижения эффекта адсорбции белков стенками капилляра электрофорез проводился в транспортном (running) буфере при pH 4,8 вблизи изоэлектрической точки С-ФЦ ( $I = 4,65$ ). В таком режиме в условиях катодного детектирования подвижность субъединиц белков и их агрегатов в основном определялась потоком электроосмоса, направленным от анода к катоду.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, полученные в экспериментах по капиллярному электрофорезу С-ФЦ, показаны на рис. 1 и 2, где представлены примеры разделения субъединиц и их агрегатов для препаратов С-ФЦ разной степени очистки. В процессе КЭ отдельные компоненты исследуемого препарата С-ФЦ проходят через капилляр с различной скоростью, определяемой как массой этих компонентов, так и их физико-химическими свойствами. Электрофореграммы

демонстрируют разделение фрагментов во времени и позволяют судить об их численном соотношении по интенсивности полос поглощения света с длиной волны  $\lambda=610$  нм.

На рис. 1 показана электрофореграмма слабо очищенного препарата С-ФЦ, из которой видно, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы не разрешены. Они образуют интенсивную полосу поглощения с временем миграции около 10 мин. Эта полоса представлена на фоне интенсивных и далеко не разрешенных полос примесных компонентов. Такие фрагменты наблюдаются как в низкомолекулярной, так и в высокомолекулярной частях спектра.

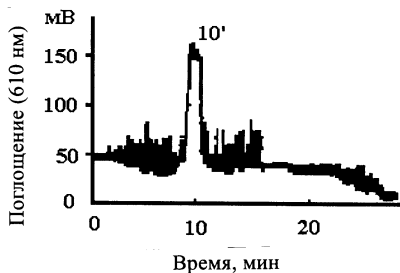


Рис. 1. КЭ фикоцианина. Степень чистоты ( $D_{615}/D_{280}$ ) нм в интервале 2–3. Условия разделения: 20 мМ фосфата при рН 4,8; силиконовый капилляр: 50/56 см; 75 мкм ID; напряжение 10 кВ; ток 30 мкА;  $t_{\text{ниж}} = 30$  с (гидростатически).  $\lambda=610$  нм.

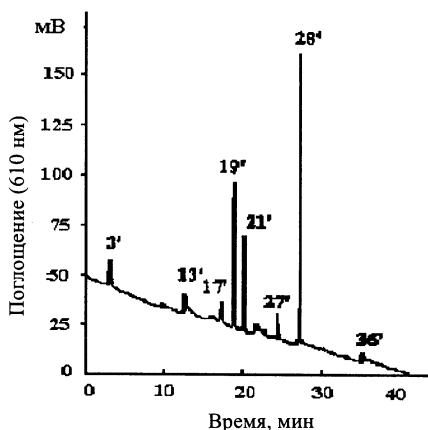


Рис. 2. КЭ фикоцианина. Степень чистоты ( $D_{615}/D_{280}$ ) нм в интервале 4,0–4,4. Условия разделения: 20 мМ фосфата при рН 4,65; силиконовый капилляр: 37/40 см; 75 мкм ID; напряжение 12 кВ; ток 30 мкА;  $t_{\text{ниж}} = 30$  с (гидростатически).  $\lambda=610$  нм.

На рис. 2 представлена электрофореграмма чистого препарата С-ФЦ, полученного после многократной процедуры очистки на хроматографической колонке.

Здесь очевидно наличие достаточно хорошего разрешения  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц с периодом миграции 19 и 21 мин соответственно, а также линии гексамеров с периодом миграции порядка 28 мин.

Кроме этих фрагментов наблюдаются менее интенсивные, но вполне разрешенные фрагменты, которые в сущности могут быть разрозненными цепочками высокомолекулярных структур С-ФЦ.

Методом ЭНАА были исследованы таблетированные образцы трех типов: образцы нативной биомассы *Spirulina pl.*; образцы слабо очищенного С-ФЦ ( $D_{620}/D_{280} = 2,04$ ) и образцы высокоочищенного С-ФЦ ( $D_{620}/D_{280} \geq 4$ ).

Полученные результаты для долгоживущих изотопов приведены в таблице. Время облучения образцов составляло 5 суток. После облучения образцы перепакывались и измерялись дважды – после выдержки в течение 4 и 20 суток. Время измерения для различных элементов менялось в интервале 1,5–10 часов.

Повышенные концентрации К и Na в образцах очищенного С-ФЦ связаны с тем, что лиофилизировался раствор С-ФЦ в Na-K-фосфатном буфере рН 6,0.

Оценка концентраций элементов в составе С-фикоцианина после его очистки позволяет предположить, какие из изученных металлов могут принимать участие в образовании макромолекулярных комплексов с С-фикоцианином типа белок-металл-хромофор. Здесь следует подчеркнуть, что сравнительная оценка концентраций металлов в исследуемых препаратах проводилась с учетом того, что, как уже отмечалось выше, С-ФЦ входит в состав белков, составляющих 55–70% биомассы спирулины, а на его долю приходится 14% от общего количества этих белков.

На основании этой оценки с учетом процентного содержания С-ФЦ в *Spirulina platensis* металлы могут располагаться в следующей последовательности: Zn>Cr>Ni>Co>As>Sr>Mo>Ag>Hg.

Содержание таких токсических металлов, как Hg, As, Sr и др., не превосходит принятого в настоящее время допустимого уровня для человеческого организма (см. <http://www.spirulina.com>).

Таким образом, полученные препараты С-ФЦ могут быть использованы в фармакологических целях как в чистом виде, так и после целенаправленной нагрузки определенными элементами. Метод ЭНАА с успехом может служить для контроля содержания токсичных элементов в С-ФЦ, что очень важно на ранних этапах подобных исследований [11].

Полученные результаты могут быть использованы для лучшего понимания структурных особенностей С-ФЦ, а также в дальнейших исследованиях специфики взаимодействия тяжелых и токсичных металлов с С-фикоцианином.

Результаты ЭНАА образцов *Spirulina platensis*  
из выделенного из нее С-ФЦ

Элемент	Содержание в биомассе <i>Spirulina pl.</i> , мг/кг	Погрешность ± %	Содержание в слабо очищенном С-ФЦ, мг/кг	Погрешность ± %	Содержание в очищенном С-ФЦ, мг/кг	Погрешность ± %
K	20 000	8	183	20	287 800	10
Na	13 050	15	1017	10	42 770	15
Fe	3 800	20	1400	8	2 200	10
Sr	1<	-	3,950	33	77	30
Cr	5,6	10	41,00	16	48	15
Mo	0,39	20	5,510	5	11	4
AS	0,57	30	0,19	11	10	11
Ni	1,3	11	14,300	14	9	20
Au	0,068	15	0,00814	5	7	20
Ag	0,63	15	0,72	10	6,7	20
Ba	9,80	10	42	10	5,9	15
Rb	0,12	12	0,146	20	4,0	12
Co	0,10	13	0,018	10	3,1	10
Br	0,53	12	0,530	20	0,7	5
Hg	0,0035	30	-	-	0,61	30
Sb	0,065	10	0.219	10	0,55	16
Se	0,1<	-	-	-	0,08	27
Zn	10	12	68,3	10	385	14
W	2,5	10	0,408	8	0,5	50
Sm	0,0054	10	0,0023	25	0,1	40

## ВЫВОДЫ

1. Методом капиллярного электрофореза изучено поведение  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в процессе очистки С-ФЦ.
2. Для очищенного С-ФЦ получено хорошее разрешение  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц и линий гексамеров ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub>.
3. Показано, что метод капиллярного электрофореза с успехом может быть использован для изучения структурных особенностей С-ФЦ и роли тяжелых и токсичных металлов в образовании макромолекулярных комплексов. Методом ЭНАА проведена оценка уровня концентраций 17 элементов для С-ФЦ различной степени чистоты.
4. Установлено, что некоторые из изученных металлов (Zn, Ni, Sr, Cr, Co, Mo и др.) присутствуют в С-ФЦ и после его очистки, из чего следует, что они могут входить в состав макромолекулярных комплексов с С-ФЦ типа белок-металл-хромофор.

5. Показано, что содержание токсичных металлов в С-ФЦ не превосходит принятого в настоящее время допустимого уровня, и поэтому он может быть использован для изготовления фармацевтических препаратов как в чистом виде, так и в комплексе с соответствующими элементами.

Настоящая работа выполнена при поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ, грант G-408) и Международного агентства по атомной энергии (МАГАТЭ, контракт No.11528/RBF).

## ЛИТЕРАТУРА

1. A.Vonshak (Ed.). *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis, London. 1997.
2. D.Fox. Heath Benefits of *Spirulina*. In: «*Spirulina - Algae of Life*», 1993, April, Bulletin No. 12, Publ. by the Institute of Oceanography, Monaco.
3. B. Vadiraja, N. W. Gaikwad, K. M. Madyastha. Hepatoprotective effect of C-Phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, Vol. 249, No. 2, p. 428-431.
4. S. Zhang, J. Xie, J. Zhang, et al. Electron spin resonance studies of photosensitized formation of hydroxyl radical by C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1999, Vol. 1426, p. 205-211.
5. L. Campanella, G. Crescentini, P. Avino, L. Angiello. Simple and rapid procedure for analyzing two phycocyanins (C-PC-APC) from *Spirulina platensis* algae using LPLC and HPLC methods. *Annali di Chimica by Societa Chimica Italiana*, 2000, No. 90, p.153-161.
6. A.N.Glazer, S. Fang. Chromophore content of blue-green algae Phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.*, 1973, Vol. 248, No.2, p. 659-662.
7. Л.Г. Ерохина, А.А. Красновский. Влияние денатурирующих воздействий на спектральные свойства фикоцианина. *Молекулярная биология*, 1971, т. 5, вып. 3, с. 399-408.
8. E. Scott, D.S. Berns. Protein-protein interaction. *The Phycocyanin System Biochemistry*, 1965, Vol. 4, No. 12, p. 2597-2605.
9. A. N. Glazer, V.P. Williams. Structural studies on phycobiliproteins I. Bilin-containing peptides of C-phycocyanin. *J. Biol. Chem.*, 1978, Vol. 253, No. 1, p. 202-211.
10. G. Frank, W. Sidler, H. Widmer, H. Zuber. The complete amino acid sequence of both subunits of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Physiology. Chemistry*, 1978, Vol. 359, No. 11, p. 1491-1507.
11. D. Quig. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.*, 1998, Vol. 3, No. 4, p. 262-270.
12. М.Г. Владимирова, В.Е. Семененко. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Москва, "Мир", 1968.
13. L.M. Mosulishvili, V.S. Nadareishvili, N.E. Kharabadze, A.I. Belokobilsky. Feasibility for Lyophilization of Biological Preparation – Patent USSR N 779765, Bull. 42, 1980.



14. F.W.J. Teale and R.E. Dale. Isolation and spectral characterization of Phycobiliproteins. *Biochem.*, 1970, Vol. 116, p. 161-170.
15. L.M. Mosulishvili, Ye.I. Kirkesali, A.I. Belokobilsky, A.I. Khizanishvili, M.V. Frontasyeva, S.F. Gundorina, C.D. Oprea. Epithermal neutron activation analysis of blue-green algae *Spirulina platensis* as a matrix for selenium-containing pharmaceuticals. *Preprint of JINR*, E14-2000-281, Dubna, 2000. (Accepted for publication by the *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2002).
16. L. Campanella, G. Crescentini, P. Avino and A. Moauro. Determination of Macrominerals and Trace Elements in Alga *Spirulina Platensis*. *Analysis*, 1998, Vol. 26, p. 210-214.
17. L. Campanella, G. Crescentini and P. Avino. Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina* analysis. *Analysis*, 1999, Vol. 27, p. 533-540.
18. M.V. Frontasyeva, S.S. Pavlov. Analytical investigation at the IBR-2 reactor in Dubna, *Preprint of JINR*, E14-2000-177, Dubna, 2000.
19. L.M. Mosulishvili, Ye.I. Kirkesali, A.I. Belokobilsky, A.I. Khizanishvili, M.V. Frontasyeva, S.S. Pavlov, S.F. Gundorina. Experimental substitution of possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. *Preprint of JINR*, D14-2001-39, Dubna, 2001.
20. Н.Я. Цибашвили, Л.М. Мосулишвили, В.А. Барнов. Модифицированная методика капиллярного электрофореза белков. *Журнал физической химии*, 1999, том. 73, №. 6, с. 1151-1155.

Получено 21 января 2002 г.

Мосулишвили Л. М. и др.

D14-2002-7

Исследование структуры и элементного состава С-фикоцианина, выделенного из клеток сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*

Исследованы структурные особенности и элементный состав С-фикоцианина, выделенного из клеток сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis*. Методом капиллярного электрофореза изучено поведение структурных субъединиц, образующих фикобилисомы, в процессе очистки С-фикоцианина. Определено их соотношение для очищенного С-фикоцианина. Методом эпителивого нейтронного активационного анализа изучен элементный состав С-фикоцианина различной степени чистоты и определена совокупность металлов (Zn, Cr, Ni, Co, As, Sr, Mo, Ag, Hg), способных принимать участие в образовании микромолекулярных биокомплексов с С-фикоцианином. Показано, что содержание таких токсичных металлов, как Hg, As, Sr и др., не превышает уровня, допустимого для человеческого организма.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка ОИЯИ и в Институте физики им. Э. Л. Андроникашвили АН Грузии.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2002

Перевод авторов

Mosulishvili L. M. et al.

D14-2002-7

Investigation of the Structure and Element Composition of C-Phycocyanin Extracted from the Microalgae *Spirulina platensis*

The structure and element composition of C-phycocyanin (C-PC) extracted from the blue-green alga *Spirulina platensis* were studied. The behavior of structural subunits forming phycobilisomes in the purification process was studied by capillary electrophoresis. Their proportion in high-purity C-PC was determined. The element composition of C-PC of different purity was studied by means of epithermal neutron activation analysis, and metals which may form macromolecular complexes with C-PC were determined (Zn, Cr, Ni, Co, As, Sr, Mo, Ag, Hg). It was shown that contents of toxic metals did not exceed accepted permissible levels for the human organism.

The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR, and in the E. Andronikashvili Institute of Physics of the Georgian Academy of Sciences.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2002

Редактор *М. И. Зарубина*  
Макет *Н. А. Киселевой*

ЛР № 020579 от 23.06.97.

Подписано в печать 26.02.2002.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,5. Уч.-изд. л. 0,68. Тираж 210 экз. Заказ № 53147.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.