

Fikobiliproteinski pigmenti zemljiših cijanobakterija

Ispitivan je kvantitativni i kvalitativni sadržaj fikobiliproteinskih pigmentata cijanobakterija (Cyanobacteriae), izolovanih iz različitih tipova zemljišta Vojvodine, tokom augusta 1997. Analizirano je pet uzoraka, koji se na osnovu prisustva ovih pigmentata (fikocijanina, fikoeritrina i alofikocijanina) mogu podeliti u tri grupe. Sojevi uzgajani na podlozi uz dodatak NaNO_3 imaju veće koncentracije pomenutih pigmentata u odnosu na sojeve sa podloge bez azota. Kao prateće analize, utvrđene su i koncentracije hlorofila a i ukupnih, intracelularnih proteina.

Uvod

Deo vidljivog dela spektra sunčeve svetlosti biljke mogu, pomoću fotosintetičkih pigmentata, fotoreceptora, da apsorbuju i koriste u fotosintezi (Ziegler 1988). Pigmenti su obojena, kompleksna jedinjenja, čija se apsorpciona svojstva zasnivaju na hemijskoj strukturi njihovih molekula. Uloga fotosintetskih pigmentata je da energiju elektromagnetnih talasa prevedu u hemijsku i tako je učine korisnom za biljku (Lawlor 1987).

Kod cijanobakterija, prokariotskih, fotoautotrofnih mikroorganizama (neki rodovi imaju mogućnost azotofiksacije), pored primarnih pigmentata odgovornih za fotosintezu: hlorofila a i karotenoida, prisutni su i fikobiliproteinski pigmenti.

Fikobiliproteini su hromoproteini, sastavljeni od bilinskog pigmenta (fikobilina) kovalentno vezanog za specifičan protein. Oni su intenzivno fluorescentni, rastvorljivi u vodi i dele se u tri grupe: fikoeritrine (crvene), fikocijanine i alofikocijanine (plave). Oni su organizovani u granule (fikobilizome), locirane na spoljašnjoj strani tilakoida (invaginacija u ćelijskoj membrani) (Chapman 1973).

Određena grupa ima svoj osnovni maksimum apsorpcije: fikoeritrin 562 nm, fikocijanin 615 nm i alofikocijanin 620 i 652 nm.

*Marta Melar (1979),
Petrovaradin,
Preradovićevo 141,
učenica 3. razreda
SMŠ: 7. april u
Novom Sadu*

MENTOR:

*Mr Ivana Dragičević,
Biološki institut,
Beograd*

Fikobiliproteinski pigmenti igraju ulogu u:

- apsorpciji svetlosti na talasnim dužinama gde hlorofil ima slabu apsorpciju
- magaciniranju azota
- regulaciji razvojnog ciklusa
- omogućavaju ispoljavanje fototaksija.

Fikocijanin i fikoeritrin se danas komercijalno dobijaju iz cijanobakterija. Fikocijanin se dobija iz alge *Spirulina*, kao plavi, slatkasti prah. Koristi se kao boja u prehrambenoj industriji i u prednosti je nad sintetskim bojama, koje mogu biti toksične i kancerogene. U Japanu se koristi i kao pigment u kozmetici, jer ne iritira kožu. Postoje podaci po kojima fikocijanin deluje na imuni sistem, stimuliše ga i pruža zaštitu od mnogih bolesti, pa i od kancera. Fikoeritrin se koristi kao fluorescentna boja u imunološkim reakcijama, jer pokazuje bolje osobine od fluorescenata (Fojkar 1996).

Cilj ovog rada bio je ispitivanje kvantitativnog i kvalitativnog sastava fikobiliproteinskih pigmenta izolovanih iz pet sojeva cijanobakterija, kako bi se utvrdili potencijalni producenti u biotehnološkoj proizvodnji.

Materijal i metode

Svaki od pet sojeva cijanobakterija, prethodno je umnožen u Novom Sadu (na Poljoprivrednom fakultetu) i 15. 07. 1997. presejan na tečnu, hranljivu podlogu BG-11, uz dodatak NaNO_3 (+N) ili njegovo odsustvo (-N). Uzorci su, zatim, transportovani u ISP. Sastav hranljive podloge BG-11 je sledeći: Na_2CO_3 – 20 mg/l, K_2HPO_4 – 40 mg/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 75 mg/l, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 36 mg/l, Fe citrat – 6.0 mg/l, limunska kiselina – 6.0 mg/l, EDTA – 1.0 mg/l, rastvor mikroelemenata – 5.0 mg/l; NaNO_3 + zemljišni ekstrakt (1:4 u odnosu na količinu podloge) + agar 1.5%.

Materijal je izdeterminisan do nivoa roda:

- soj 1 – *Nostoc* sp.
- soj 2 – *Nostoc* sp.
- soj 3 – *Nostoc* sp.
- soj 4 – *Anabaena* sp.
- soj 5 – *Cylindrospermum stagnale*.

Određene su sledeće karakteristike cijanobakterija: količina hlorofila a, kvantitativna i kvalitativna zastupljenost fikobilina, kao i količina intracelularnih proteina.

Za određivanje hlorofila a uzorci su bili tretirani metanolom 48 h, a zatim su spektrofotometrijskom metodom očitavane absorbance na talasnoj

dužini 663 nm. Iz dobijenih vrednosti preračunavane su koncentracije hlorofila a uz pomoć sledeće jednačine:

$$C = A_{663} \times 12.663 V_m / V$$

V_m – zapremina metanola

V – zapremina uzorka

A_{663} – absorbanca

C – koncentracija hlorofila a u mg/ml (kasnije izraženo u $\mu\text{g/g}$ kulturalne tečnosti).

Za određivanje sadržaja fikobiliproteinskih pigmenata, bilo je neophodno razoriti ćelijski zid i osloboditi ove pigmente iz tilakoida. Ćelijski zid uzoraka razoren je uzastopnim zamrzavanjem i odmrzavanjem (u destilovanoj vodi), tokom 72 h. Nakon tog perioda, mikroskopiranjem, utvrdili smo da je razoreno oko 80% ukupnih ćelija, što se može tolerisati.

Uzorci su nakon razaranja centrifugirani (3500 obr./min.; 15 min.), da bi bili oslobođeni ćelijskog zida. Fikobiliproteinski pigmenti nalazili su se u supernatantu. Spektrofotometrijski je, zatim, određivan sadržaj fikobiliproteina.

Za *kvalitativni* sadržaj je bilo potrebno snimiti spektar apsorpcije supernatanta od 400–700 nm.

Za *kvantitativni* sadržaj pigmenata je izmerena apsorpcija na utvrđenim maksimumima: 562 nm fikoeritrin, na 615 nm fikocijanin i 652 nm alofikocijanin; zatim se preračunavaju koncentracije pigmenata pomoću jednačina:

$$\text{F.C.} = \frac{A_{615} - 0.474 A_{652}}{5.34}$$

$$\text{A.F.C.} = \frac{A_{652} - 0.208 A_{615}}{5.09}$$

$$\text{F.E.} = \frac{A_{652} - 2.41 \times \text{F.C.} - 0.849 \times \text{A.F.C.}}{9.62}$$

F.C. – koncentracija fikocijanina

A.F.C. – koncentracija alofikocijanina

F.E.– koncentracija fikoeritrina

A – apsorbanca na određenoj talasnoj dužini

Rezultati se dobijaju u mg/ml, a zatim preračunavaju u $\mu\text{g/g}$ sveže biljne mase.

Za određivanje sadržaja intracelularnih proteina korišćen je metod po Lowery-ju (1951), takođe je korišćena spektrofotometrijska metoda. Maksimumi apsorpcije na talasnoj dužini od 500 nm preračunavani su u koncentracije proteina uz pomoć kalibracione prave za model protein-lizozim (u mg/ml).

Rezultati i diskusija

Kvalitativna zastupljenost fikobiliproteinskih pigmenata kod ispitivanih sojeva cijanobakterija je prikazana na grafikonima (slika 1). Svih pet sojeva mogu se podeliti u tri grupe, na osnovu saržaja, gde dominira:

1. fikocijanin i fikoeritrin, tj. imaju maksimum apsorpcije na 615 i na 562 nm – sojevi 1 i 2
2. fikoeritrin i fikocijanin (u tragovima), tj. sa maksimumom apsorpcije na 562 nm – sojevi 3 i 4
3. fikocijanin, tj. maksimum apsorpcije na 615 nm (alofikocijanin, u sve tri grupe, prisutan je samo u tragovima; v. grafikone).

Koncentracije ukupnih proteina, hlorofila a i fikobiliproteinskih pigmenata

Soj	Ukup.proteini mg/ml		Hlorofil a µg/g		F.C. µg/g		F.E. µg/g		F.C./Hl.a	
	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N
1	46	118	318.2	106.1	601.1	93.6	–	62.3	1.889	0.882
2	59	41	389.0	550.7	99.4	2172.0	87.3	849.2	0.255	3.944
3	35	86	490.3	732.5	3762.9	2902.6	5374.5	3627.8	7.674	3.963
4	103	42	530.5	343.5	795.8	–	1601.8	164.2	1.500	–
5	18.5	74.5	272.8	364.0	655.4	3483.1	–	–	2.402	9.569

Kvantitativna analiza pokazuje da su koncentracije fikobiliproteinskih pigmenata primetno veće kod sojeva koji su u podlozi imali dodatak NaNO₃ (sem soja 5, sa obrnutom situacijom), što se lako može objasniti činjenicom da deficit magnezijuma i, u ovom slučaju azota, usporavaju sintezu fotosintetskih pigmenata (Mamory *et al.* 1976).

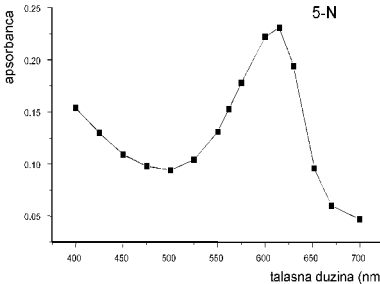
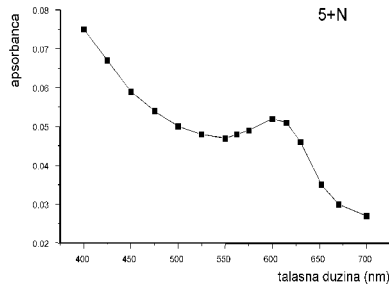
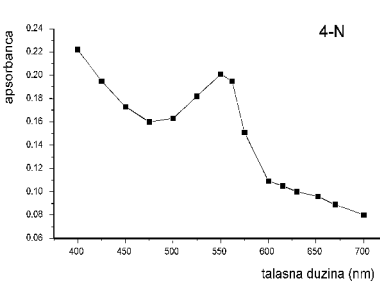
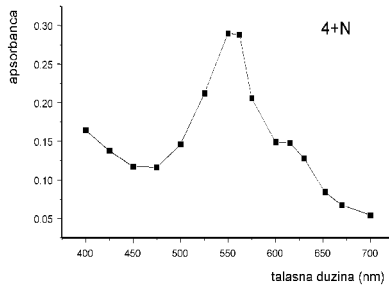
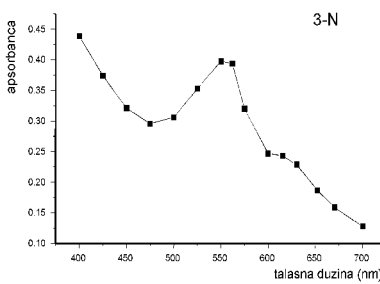
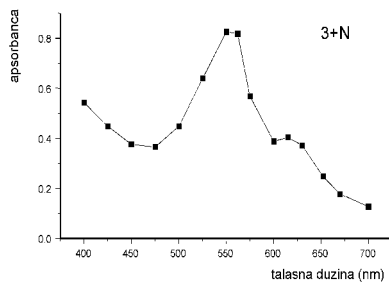
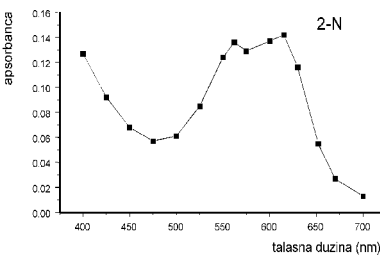
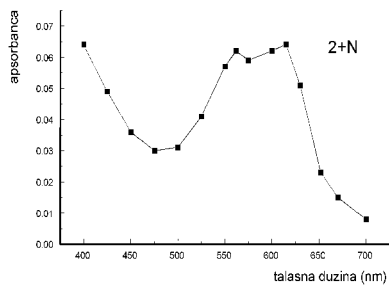
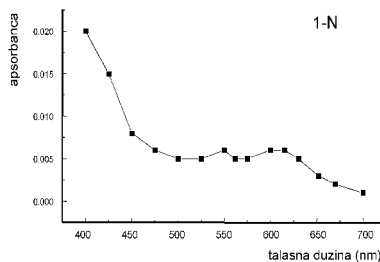
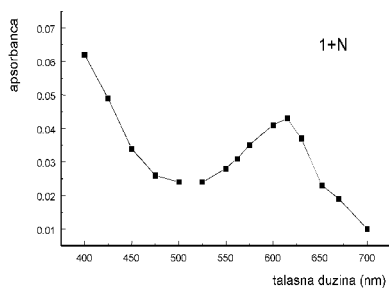
Podaci o koncentracijama svih parametara dati su u tabeli.

Iz tabele se može zaključiti da je kod soja 3 najveća koncentracija fikoeritrina i fikocijanina (do 5374.5 µg/g), ali isto tako i hlorofila a. Za njim sledi soj broj 5, sa takođe visokim koncentracijama fikobiliproteinskih pigmenata (do 3483.1 µg/g), hlorofila a i proteina. Najveću količinu ukupnih proteina ima soj 1 (118 mg/ml), ali je on veoma loš producent fotosintetskih pigmenata.

Odnos između fikocijanina i hlorofila a najveći je kod soja 3 (7.7), a najmanji kod soja 2. U globalu, koncentracije fikocijanina su veće nego hlorofila a. Ovaj odnos je značajan, jer je česta pojava da fikobiliproteinski pigmenti prekriju hlorofil, pa da sojevi poprime boju dominantnog pigmenta – u najčešćem slučaju fikocijanina (Siegelman *et al.* 1973).

Zavisnost apsorbance od talasne dužine kod ispitivanih fikobiliproteinskih pigmentata

Absorbance versus wave length at examined phicobiliprotein pigments



Zaključak

U augustu 1997. u ISP su vršene biohemijske analize na pet sojeva cijanobakterija (*Nostoc*, *Cylindrospermum*, *Anabaena*). Spektrofotometrijski su ispitane koncentracije hlorofila a, intracelularnih proteina i kvantitativna i kvalitativna zastupljenost fikobiliproteinskih pigmenata.

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Pet ispitivanih sojeva cijanobakterija mogu se podeliti prema kvalitativnom sadržaju fikobiliproteinskih pigmenata na tri grupe, koje sadrže:

- a) fikocijanin i fikoeritrin – 1. i 2. soj,
- b) fikoeritrin i fikocijanin (u tragovima) – 3. i 4. soj i
- c) fikocijanin – 5. soj (alofikocijanin je u svim uzorcima prisutan samo u tragovima).

2. Sojevi zasejani na podlogu sa NaNO_3 imaju veće koncentracije fikobiliproteinskih pigmenata u odnosu na sojeve bez azota u podlozi (rezultati o ovakvim istraživanjima nisu još pronađeni u literaturi).

3. Najveću količinu fikocijanina ($3762.9 \mu\text{g/g}$) i fikoeritrina ima soj 3, dok je soj 1 sa najmanjim koncentracijama. Količina fikocijanina je, u odnosu na količinu hlorofila a, primetno veća.

4. Najveću količinu ukupnih, intracelularnih proteina sadrži soj 1, u proseku 118 mg/ml .

5. Uzevši sve parametre u obzir (količina hlorofila a, koncentracije fikobiliproteinskih pigmenata i količina ukupnih proteina), može se zaključiti da su najproduktivniji sojevi 3 (*Nostoc* sp.) i 5 (*Cylindrospermum stagnale*) i trebalo bi ih preporučiti u biotehnološkoj proizvodnji. Najslabiji producenti su sojevi 1 i 2.

Literatura

Chapman, J.D. 1973. *The biology of blue-green algae*. Berkley: University of California Press.

Fojkar, O. 1996. *Kvantitativna i kvalitativna zastupljenost zemljišnih cijanobakterija u zemljištima Vojvodine*. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet.

Lawlor, D.W. 1987. *Photosynthesis: metabolism, control and physiology*. Singapore: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.

Mamory, M. & Yoshikiko, F. 1976. *A native phycobiliprotein aggregate separated from blue-green algae Anabaena cylindrica and Plectonema borianum*. Tokio: Ocean Research Institute.

Siegelman, W.H., Kycia, H.K. 1973. *Algal biliproteins*. New York: Upton, Biology Department.

Ziegler, D. 1988. *Morfologija i fiziologija*. Zagreb: Školska knjiga.

Phycobiliprotein Pigments in Terrestrial Cyanobacteria

Quantitative and qualitative structure of cyanobacteria phycobiliprotein pigments (phycocyanin, phycoerythrin, allophycocyanin), chlorophyll a and total, intracellular proteins was examined by using spectrophotometric method. Cyanobacteria genera (*Nostoc*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*) were isolated from different soil types in Vojvodina and developed on two types of nutrition mediums – with and without NaNO_3 , because of their ability to fix nitrogen (nitrogen-fixing microorganisms). From the existing results we can conclude the following:

1. Five genera of examined cyanobacteria can be separated in three groups, according to qualitative structure of photosynthetic pigments: (a) genera with high concentration of phycocyanin and lower concentration of phycoeritrin, (b) genera with high concentration of phycoeritrin and lower concentration of phycocyanin and (c) genus with phycocyanin only. Allophycocyanin was found in all five genera in extremely low concentration.

2. Genera inoculated in medium with NaNO_3 had higher concentration of phycobiliprotein pigments than genera developed on medium without nitrogen.

3. The highest concentration of phycocyanin and phycoeritrin had the genus *Nostoc* sp. and *Cylindrospermum stagnale*. The amount of phycocyanin was remarkably high comparing to the amount of chloropyll a.

4. The highest amount of total, intracellular proteins had the *Nostoc* sp.

5. Considering all aspects, it can be concluded that genus *Nostoc* sp. and *Cylindrospermum stagnale* were the best producers of phycobiliprotein pigments, chlorophyll a and total, intracellular proteins, and they should be recommended for future biotechnological production.

