

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie și poate fi utilizată în medicină pentru imunodiagnostic, precum și în industria alimentară, cosmetică, etc.

Sunt cunoscute procedee de obținere a ficocianinei și aloficocianinei din cianobacterii, care constau în fracționarea biliproteinelor cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ și purificarea prin cromatografie [1-3].

Dezavantajul acestor procedee constă în faptul că la prima etapă de purificare este utilizată fracționarea biliproteinelor cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, în rezultatul căreia se obține preparatul de ficocianină cu un grad scăzut de puritate, care necesită dializa și purificarea suplimentară.

Este cunoscut procedeul de obținere a ficocianinei elaborat de Boussiba S. și Richmond A. Acest procedeu include următoarele etape: suspensionarea biomasei de *Spirulina platensis* în tampon de fosfat cu pH-ul de 7,0, congelarea-decongelarea biomasei în două repetări pentru eliberarea proteinelor solubile, fracționarea cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 20%, 45%, 65% și 75%, dizolvarea în apă a precipitatului obținut de biliproteine și dializă, cromatografia pe coloana de DEAE-celuloză, dializa fracțiilor de ficocianină și liofilizarea ei [4].

Dezavantajul acestui procedeu constă în gradul de puritate scăzut al ficocianinei și în utilizarea unor cantități mari de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, care necesită atât un volum sporit de apă pentru dializă, cât și o perioadă mai îndelungată de timp (două zile) pentru obținerea ficocianinei.

Problema pe care o rezolvă invenția dată constă în sporirea eficacității procedurii și în simplificarea lui.

Esența invenției constă în faptul că se propune un procedeu de obținere a ficocianinei, care include prepararea suspensiei biomasei de cianobacterii, congelarea-decongelarea ei în două repetări, separarea ulterioară a biomasei, fracționarea consecutivă, cromatografierea și liofilizarea, unde se prepară suspensia apoasă a biomasei de cianobacterii, se fracționează consecutiv prin eliminarea fracției I din supernatant la pH-ul mai mic sau egal cu 4,0 și a fracției II din precipitat la pH-ul mai mic de punctul izoelectric al proteinelor precipitate, în continuare pH-ul fracțiilor obținute fiind adus până la 7,5, apoi se efectuează cromatografierea hidrofobă pe fenil-sefaroză.

Folosirea în procedeul propus a suspensiei apoase de cianobacterii permite efectuarea reglării pH-ului mai ușor decât în soluția-tampon de fosfat și permite reducerea consumului de reactivi utilizați.

Fracționarea consecutivă prin eliminarea fracției I din supernatant la pH-ul mai mic sau egal cu 4,0 și a fracției II din precipitat la pH-ul mai mic de punctul izoelectric permite separarea ficocianinei de proteine și majorarea gradului de puritate a ei (A_{620}/A_{280}) de la 0,96 până la 2,3-3,2. Se exclude și necesitatea dializei ficocianinei, ceea ce simplifică procedeul și micșorează timpul de obținere a ficocianinei.

Aducerea pH-ului fracțiilor I și II la 7,5 asigură legarea ficocianinei de sorbent la cromatografierea ulterioară.

Efectuarea cromatografierii pe fenil-sefaroză permite majorarea gradului de puritate a ficocianinei obținute în urma fracționării consecutive ($A_{620}/A_{280} = 4,0$).

Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea gradului de puritate a ficocianinei.

Exemplu de realizare a invenției

100 cm³ de biomasă de cianobacterii, suspensionată în apă distilată (10 mg/cm³), este congelată-decongelată în două repetări. După centrifugare timp de 15-25 min la 12000 rot./min supernatantul obținut (80,8 cm³) se acidulează cu HCOOH 0,1 M până la pH-ul de 4,0, pentru precipitarea izoelectrică a proteinelor. După centrifugare la 6000 rot./min timp de 5 min supernatantul de culoare albastră se separă, precipitatul se spală de două ori cu câte 10 ml de apă acidulată până la pH-ul de 3,5.

Atât fracția I obținută din supernatant la pH-ul de 4,0, cât și fracția II, obținută la extracție în urma spălării repetate a precipitatului cu apă acidulată până la pH-ul de 3,5 sunt de o puritate mai superioară ($A_{620}/A_{280}=2,3+3,2$) în comparație cu analogul cel mai apropiat ($A_{620}/A_{280}=0,96$).

pH-ul soluțiilor de ficocianină, obținute în rezultatul precipitării izoelectrice, se majorează cu NH_4OH sau altă soluție slab bazică până la pH-ul de 7,5 și se introduce în coloana de fenil-sefaroză, echilibrată cu tampon de fosfat 0,1 M cu pH-ul de 7,5.

Coloana se spală cu două volume de tampon de fosfat 0,1 M, apoi cu două volume de același tampon 0,05 M și cu un volum de tampon 0,01 M cu pH-ul de 7,5, după care se efectuează eluarea ficocianinei cu apă. Soluția de ficocianină obținută se liofilizează și se obțin 20 mg de ficocianină pură.