

FIKOBILIPROTEINY – BARWNE BIAŁKA O NIETYPOWEJ STRUKTURZE, INTERESUJĄCYCH WŁAŚCIWOŚCIACH I ZASTOSOWANIU

PHYCOBILIPROTEINS – COLORFUL COMPOUNDS OF UNUSUAL STRUCTURE AND INTERESTING PROPERTIES AND APPLICATIONS

**Emilia Niemczyk, Jerzy Pogrzeba,
Jacek Lipok***

*¹Instytut Chemii, Uniwersytet Opolski
ul. Oleska 48,
45-052 Opole
e-mail: jacek.lipok@uni.opole.pl

Abstract
Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń
Wprowadzenie
1. Charakterystyka fikobiliprotein
1.1. Struktura fikobiliprotein
1.2. Różnorodność fikobiliprotein
2. Biosynteza fikobiliprotein
2.1. Struktura fikobilin
2.2. Wiązanie fikobilin do apoprotein
3. Pozyskiwanie fikobiliprotein
4. Użyteczne właściwości fikobiliprotein
Uwagi końcowe
Podziękowania
Piśmiennictwo cytowane

Dr Emilia Niemczyk, w roku 2014 ukończyła studia na kierunku biotechnologia (specjalność biotechnologia w rolnictwie i produkcji żywności) na Wydziale Przyrodniczo-Technicznym Uniwersytetu Opolskiego. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w 2023 roku, broniąc rozprawy doktorskiej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego. Jej zainteresowania naukowe obejmują naturalne metabolity mikroalg i cyjanobakterii, sposoby ich izolacji, oczyszczania oraz możliwości ukierunkowania ich produkcji, a także zielona chemia w zakresie baterii litowo-jonowych.



<https://orcid.org/0000-0003-0867-3587>

Mgr Jerzy Pogrzeba, w 2020 roku uzyskał tytuł zawodowy magistra w dyscyplinie chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego. W pracy podjął temat wpływu aminofosfonianów i boronianów na rozwój oraz metabolizm wybranych gatunków sinic. W tym samym roku rozpoczął kształcenie w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Opolskiego w dyscyplinie chemia, w pracy podejmując problematykę zdolności cyjanobakterii do biosorpcji i biotransformacji wybranych leków przeciwzapalnych oraz wpływu tych substancji na badane mikroorganizmy. Zainteresowania naukowe autora koncentrują się na chemicznych aspektach cyjanobakterii, w tym oddziaływaniu substancji na te organizmy, ich chemiczną rolę w środowisku oraz na pozyskiwaniu metabolitów sinic i ich możliwym użyciu w chemii.



<https://orcid.org/0000-0001-6313-9913>

Prof. dr hab. Jacek Lipok, chemik i biotechnolog, absolwent specjalności Agrobiochemia, prowadzonej na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Opolu. Zainteresowanie naturalnymi i syntetycznymi związkami chemicznymi, jako regulatorami aktywności owadów, zaowocowało obroną rozprawy doktorskiej. W późniejszym okresie podjął badania nad przemianami ksenobiotyków fosforoorganicznych w ekosystemach, koncentrując się na opracowaniu procedur umożliwiających śledzenie biotransformacji tych związków przez mikroorganizmy. Aktualne zainteresowania naukowe Autora związane są z: określeniem aktywności biologicznej naturalnych i syntetycznych związków chemicznych, w tym leków, ukierunkowaną biosyntezą modulatorów metabolizmu, szczególnie leków i natraceutyków oraz z analizą procesów biokatalitycznych i wykorzystaniem tych zjawisk w przemianach ksenobiotyków i tworzeniu nanostruktur. W badaniach lokowanych na pograniczu nauk chemicznych, farmaceutycznych i biologicznych, wykorzystuje metody spektroskopowe skojarzone z metodami chromatograficznymi oraz z metodami i technikami oceny aktywności organizmów, wywodzącymi się z nauk biologicznych.



<https://orcid.org/0000-0002-8567-5351>

ABSTRACT

Phycobiliproteins - colorful proteins produced by microalgae and cyanobacteria, owe their unique properties to prosthetic groups, which are open-chain tetrapyrroles. As they are produced in the biosynthesis process, phycobiliproteins possess special biotechnological potential also due to their useful physicochemical properties. A classic example is the use of these proteins - especially phycocyanin with an intense blue color - as natural dyes in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. In the products to which they are added, they are responsible not only for color, but also for various biological activities, providing these products with additional values. In this category, the most frequently mentioned are the antioxidant properties of phycobiliproteins, which may be used in the treatment of neurodegenerative diseases, and the fluorescent properties, especially of phycoerythrin, which also predispose these proteins to use in biomedical research. The results of contemporary work on the acquisition and use of phycobiliproteins indicate that the key to the wider use of these substances is to understand the process of biosynthesis of individual groups of these colored proteins, as well as developing ways to effectively control their production. Due to the different physicochemical properties and biological activity of individual, structurally diverse phycobiliproteins, the specificity of the actions taken is extremely important in this case. Since there are real reasons to increase the scale of production of these substances by modifying the conditions of microalgae cultivation, we believe that obtaining larger amounts of specific phycobiliproteins in pure form will intensify the current use and open up new possibilities for the use of these valuable proteins.

Keywords: phycobiliproteins, cyanobacteria, phycocyanin, phycoerythrin, isolation methods

Słowa kluczowe: fikobiliproteiny, cyjanobakterie, fikocyjanina, fikoerytryna, metody izolacji

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

PBP	– fikobiliproteiny
PBS	– fikobilisomy
PE	– fikoerytryna
PC	– fikocyjanina
APC	– allofikocyjanina
PCB	– fikocyjanobilina
PEB	– fikoerytrobilina
PVC	– fikowiolobilina
PUB	– fikourobilina
CVB	– fikowiolobilina
HO	– oksygenaza hemu
BV IX	– biliwerdyna IX
ApcE	– liaza autokatalityczna
Apo-APC	– apo-allofikocyjanina
Cys	– cysteina
PcyA	– oksydoreduktaza fikocyjanobilina : ferredoksyna (EC:1.3.7.5)
PebA	– oksydoreduktaza 15,16-dihydrobiliwerdyna : ferredoksyna (EC:1.3.7.2)
PebB	– oksydoreduktaza fikoerytryna : ferredoksyna (EC:1.3.7.3)
PebS	– syntaza fikoerytrobiliny (EC:1.3.7.6)
HY2	– oksydoreduktaza fitochromobiliny : ferredoksyna (EC:1.3.7.4)
PcyX	– syntaza fikoerytrobiliny
PUBS	– syntaza fikourobiliny
DHBV	– dihydrobiliwerdyna
FDBR	– reduktazy bilin zależnych od ferredoksyny (ang. <i>Ferredoxin-Dependent Bilin Reductases</i>)
CA	– aklimatyzacja chromatyczna (ang. <i>Chromatic Acclimation</i>)

WPROWADZENIE

Bakterie fotosyntezujące (cyjanobakterie) oraz niektóre algi, są coraz częściej wymieniane, jako źródło cennych produktów naturalnych, o znaczącym potencjale komercyjnym. Oprócz wysokiej jakości przyswajalnych białek, kwasów tłuszczowych i witamin, organizmy te stały się źródłem fikobiliprotein - naturalnych barwników o szczególnych właściwościach [1, 2]. Wyizolowane po raz pierwszy w 1836 roku, fikobiliproteiny wciąż fascynują wyrazistym, intensywnie niebieskim zabarwieniem i różową fluorescencją. Absorbując kwanty światła o innej, niż chlorofile energii, barwniki te intensyfikują proces fotosyntezy w komórkach zawierających je autotrofów. Uczestniczą w ochronie przed reaktywnymi formami tlenu oraz stanowią zasobne źródło azotu, umożliwiając syntezę innych białek [1]. Fikobiliproteiny uznawane są za wysokowartościowe produkty naturalne wykazujące różnorodną aktywność biologiczną [2, 3]. Zaledwie kilka dekad temu zaczęto doceniać również prozdrowotne właściwości tych białek, stosowanych od dawna jako barwniki żywności [4].

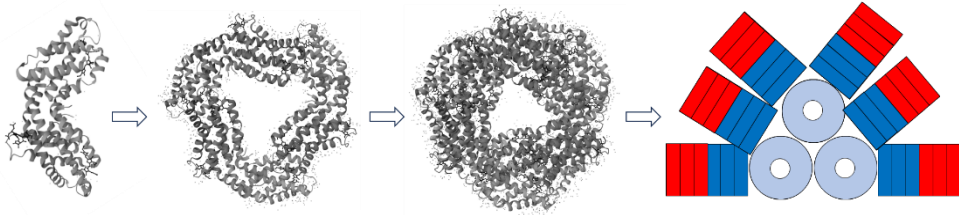
1. CHARAKTERYSTYKA FIKOBILIPROTEIN

Fikobiliproteiny to rodzina barwnych, hydrofilowych białek stanowiących ważny element aparatu fotosyntetycznego, głównie cyjanobakterii i czerwonych alg, chociaż substancje te zidentyfikowano również w komórkach mikroalg reprezentujących glaukofity i kryptomonady [4]. Obecność fikobiliprotein rozszerzających zakres długości fali światła absorbowanego przez typowe barwniki fotosyntetyczne (chlorofile, ksantofile oraz karotenoidy), umożliwia organizmom wykorzystującym te substancje zasiedlenie środowisk nieoptymalnych pod względem dostępu światła, a co za tym idzie rozwój w mniej sprzyjających warunkach. W ten sposób gatunki mikroalg wytwarzających te barwne białka zyskują przewagę ekologiczną. Szczególne znaczenie fikobiliprotein podkreśla fakt, że mogą stanowić nawet 60% wszystkich białek obecnych w komórkach cyjanobakterii [1, 5].

1.1. STRUKTURA FIKOBILIPROTEIN

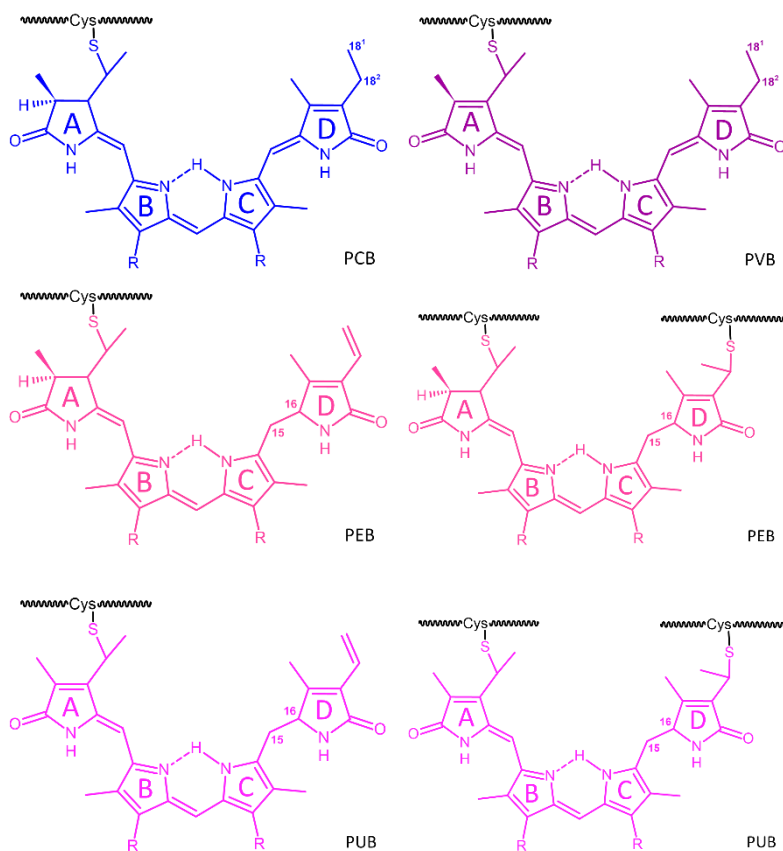
W budowie fikobiliprotein wyróżnia się apoproteinowy stelaż oraz związane kowalencyjnie grupy chromoforowe, nazywane fikobilinami [4, 6]. Białka fikobiliprotein zbudowane są z polipeptydowych podjednostek α oraz β , o masach cząsteczkowych odpowiednio 16-17 kDa i 18-19 kDa, tworzących heterodimery. Geny kodujące strukturę pierwszorzędową homologicznych podjednostek α i β , powstały na skutek duplikacji, a stopień homologii polipeptydów może wynosić nawet 25-30%. Najbardziej konserwatywna struktura aminokwasów występuje w obszarze reszt cysteiny, które wiążą fikobiliny. Podjednostki α i β nie są połączone mostkami disiarczkowymi, charakteryzują się strukturą zbliżoną do globiny z dodat-

kowymi helisami. $\alpha\beta$ -heterodimery fikobiliprotein tworzą trimery (heteroheksamery $(\alpha\beta)_3$) lub heksamery (heterododekamery $(\alpha\beta)_6$) w kształcie pierścienia - elementy składowe fikobilisomów (Rys. 1) [4, 7].



Rysunek 1. Oligomeryczne struktury fikobiliprotein (monomer \rightarrow trimer \rightarrow heksamer) oraz fikobilisom
 Figure 1. Oligomeric structures of phycobiliproteins (monomer \rightarrow trimer \rightarrow hexamer) and phycobilisome

Z kolei fikobiliny to grupa otwarcie łańcuchowych układów tetrapiolowych, w których pierścienie pirolowe (A, B, C i D) połączone są mostkami metinowymi. Chromofory fikobilinowe, w odróżnieniu do innych bilin jak np. hem, czy chlorofil, nie zawierają jonów metali. Zewnętrzne pierścienie pirolowe (A oraz D) związane są z atomem tlenu, natomiast pierścienie wewnętrzne (B i C) z resztami kwasu propionowego (Rys. 2). Masa cząsteczkowa tych związków wynosi blisko 600 Da. Pomiędzy polipeptydowym stelażem a układem pirolowym najczęściej występuje jedno wiązanie, jednakże w przypadku fikoerytrobiliny oraz fikourobiliny występują dwa wiązania (przy pierścieniach A i D) łączące je z peptydem. W komórkach cyjanobakterii zidentyfikowano cztery różne fikobiliny: niebieską fikocyjanobilinę (PCB), różową fikoerytrobilinę (PEB), fioletową fikowiobilinę (PVB) oraz żółtą fikourobilinę (PUB) [1, 8, 9].



Rysunek 2. Struktury chemiczne fikobilin cyanobakterii, kowalencyjnie związanych z białkowym steżem (litera „R” przedstawia propionianowe łańcuchy boczne)

Figure 2. Chemical structures of cyanobacterial phycobilins covalently bound to a protein framework (the letter "R" represents the propionate side chains)

1.2. RÓŻNORODNOŚĆ FIKOBILIPROTEIN

Fikobiliproteiny cyanobakterii dzieli się na cztery główne typy: fikocyjaninę (PC), fikoerytrynę (PE), fikoerytrocyjaninę (PEC) oraz allofikocyjaninę (APC). Charakterystykę każdego typu przeprowadza się na podstawie struktury oraz maksimum absorpcji światła: PC – maksimum absorpcji – 610-625 nm, PE – charakterystyczna absorpcja przy 490-570 nm, PEC – 575-620 nm, APC – z maksimum absorpcji – 650-660 nm [1, 4, 10]. Podział fikobiliprotein wynika z liczby oraz typu fikobilin przypadających na podjednostkę polipeptydową α lub β . Polipeptyd monomeru fikobiliprotein wiąże od jednego do trzech układów chromoforów. Cząsteczki bilinowe wiązane są przez reszty cystein łańcucha polipeptydowego wiązaniem tioeterowym (sulfidowym). Reszty aminokwasowe Cys α -84 oraz Cys β -84 są niezbędne do wiązania grup prostetycznych, natomiast

w zależności od typu fikobiliprotein, chromofory mogą być wiązane także przez inne reszty cysteiny (Tabela 1). Liczba chromoforów w podjednostce ($\alpha\beta$) fikocyjaniny i fikoerytrocyjaniny wynosi trzy, allofikocyjaniny dwie natomiast podjednostka ($\alpha\beta$) fikoerytryny zawiera aż pięć lub sześć fikobilin [1, 8, 10].

Tabela 1. Rodzaje fikobiliprotein z uwzględnieniem chromoforów

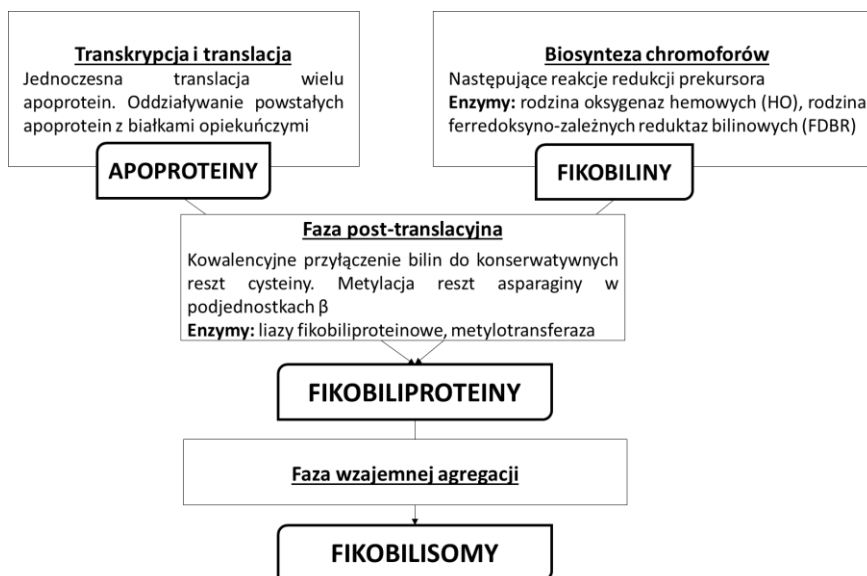
Table 1. Types of phycobiliproteins including chromophores

Fikobiliproteiny	Specyficzne reszty cysteinowe i związane z nimi fikobiliny					
	Cys α - 75	Cys α - 84	Cys α - 143	Cys β - 50,61	Cys β - 84	Cys β - 155
Allofikocyjanina		PCB			PCB	
Fikocyjanina (C)		PCB			PCB	PCB
Fikoerytrocyjanina		CVB			PCB	PCB
Fikocyjanina (R-I)		PCB			PCB	PEB
Fikocyjanina (R-II)		PEB			PCB	PEB
Fikocyjanina (R-III)		PUB			PCB	PCB
Fikoerytryna (kl. I)*		PEB lub PUB	PEB lub PUB	PEB lub PUB	PEB	PEB lub PUB
Fikoerytryna (kl. II)*	PUB	PEB lub PUB	PEB lub PUB	PEB lub PUB	PEB	PEB

*- Fikoerytryny klasy I posiadają pięć fikobilin, fikoerytryny klasy II sześć chromoforów

2. BIOSYNTENZA FIKOBILIPROTEIN

W naturalnych warunkach, w pełni funkcjonalne fikobiliproteiny powstają w dwóch niezależnych szlakach przemian biochemicznych (Rys. 3). Pierwszy obejmuje biosyntezę bilin oraz transkrypcję i translację genu kodującego apoproteiny (1), a drugi odpowiada procesom modyfikacji potranslacyjnych, które polegają na kowalencyjnym wiązaniu chromoforów z polipeptydowym stelażem (2). Agregacja monomerów, trimerów lub heksamerów fikobiliprotein skutkuje powstaniem imponujących wielkością kompleksów białkowych – fikobilisomów (3) [4, 5, 8, 9]. W agregacji heksamerycznych dysków fikobiliprotein biorą udział specyficzne białka łącznikowe, a efektem tego procesu są struktury o kształcie cylindrów. Struktury te stanowią element konstrukcji kompleksów antenowych, wspomnianych już fikobilisomów. Masa cząsteczkowa tych specyficznych kompleksów białkowych może wynosić od 3000 do 7000 kDa [6, 7, 9].



Rysunek 3. Ogólny proces powstawania fikobiliprotein i fikobilisomów

Figure 3. General process of formation of phycobiliproteins and phycobilisomes

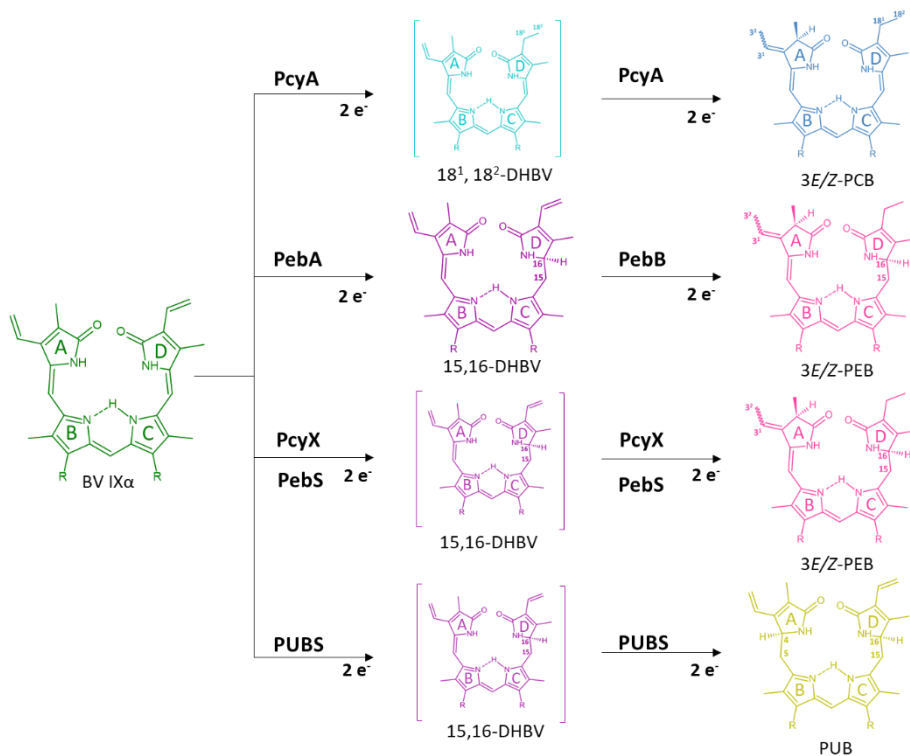
2.1. BIOSYNTENZA FIKOBILIN

Cyjanobakterie są zdolne do wytwarzania różnych pigmentów tetrapirolowych: chlorofili, hemów i fikobilin. Chromofory tetrapirolowe są pochodnymi porfiryn, których prekursorem jest kwas δ -aminolewulinowy (ALA) [1, 10]. W organizmach fotosyntezujących biosynteza fikobilin rozpoczyna się od kondensacji dwóch cząsteczek ALA. Sekwencja reakcji prowadzi do powstania protoporfiryny IX, ostatniego wspólnego elementu biosyntezy bilin, hemów oraz chlorofili. Enzym ferrochelataza (EC 4.99.1.1) katalizuje ostatni etap biosyntezy hemu, wprowadzając jony Fe^{+2} do protoporfiryny IX [1, 10, 11].

Synteza fikobilin następuje w wyniku otwarcia tetrapirolowego makropierścienia hemu katalizowanego przez oksygenazę hemu (HO; EC 1.14.99.3). W reakcji zależnej od tlenu powstaje biliwerdyna IX (BV IX). W komórkach cyjanobakterii BV IX jest prekursorem fikobilin. W wyniku redukcji biliwerdyny IX powstają fikobiliny o różnych właściwościach absorpcyjnych (Rys. 4). Reakcje te przeprowadzane są przez enzymy należące do rodziny reduktaz bilin zależnych od ferredoksyny (ang. Ferredoxin-Dependent Bilin Reductases; FDBR) występujących w roślinach, cyjanobakteriach oraz w cyjanofagach [12, 13]. FDBR to odmienne, ale blisko spokrewnione białka katalityczne: (1) oksydoreduktaza fikocyjanobilina : ferredoksyna (PcyA, EC:1.3.7.5), (2) oksydoreduktaza 15,16-dihydrobiliwerdyna : ferredoksyna (PebA, EC:1.3.7.2), (3) oksydoreduktaza fikoerytryna : ferredoksyna (PebB, EC:1.3.7.3), (4) syntaza fikoerytrobiliny (PebS, EC:1.3.7.6), (5) oksydoredu-

ktaza fitochromobiliny : ferredoksyna (HY2, EC:1.3.7.4), (6) syntaza fikoerytrobiliny (PcyX), (7) syntaza fikourobiliny (PUBS) [14]. Najwcześniej poznano strukturę PcyA, którą wyodrębniono z komórek *Nostoc* sp. PCC 7120 oraz *Synechocystis* sp. PCC 6803 [13-15]. BV IX jest substratem dla prawie wszystkich enzymów z rodziny FDBR, z wyjątkiem reduktazy PebB. Enzymy FDBR charakteryzuje podobna struktura kanapkowa (sandwiczowa): „ $\alpha/\beta/\alpha$ ”, różni je redukcja otwartej cząsteczki tetrapiolowej w specyficznej pozycji, co prowadzi do biosyntezy różnych fikobilin.

Biosynteza fikocyjanobiliny (PCB) katalizowana jest przez PcyA w toku czteroelektronowej redukcji. PcyA redukuje grupę winylową pierścienia D biliwerdyny IX α , w wyniku czego powstaje związek pośredni - dihydrobiliwerdyna (18¹, 18²-DHBV). Następnie związek ten ulega kolejnej redukcji przy pierścieniu A, dając PCB. [13, 15]. Szlaki syntezy fikoerytrobiliny (PEB) scharakteryzowane zostały dla cyjanobakterii, kryptomonad i bakteriofagów - także cyjanofagów. W komórkach sinic oraz kryptomonad synteza PEB katalizowana jest w reakcjach, prowadzonych przez dwa enzymy FDBR (PebA i PebB). W cyjanofagach w redukcji bierze udział tylko jeden enzym (PebS lub PcyX) [13, 15]. Biosynteza PEB rozpoczyna się od redukcji BVIX przez PebA, na wiązaniu podwójnym, między pierścieniami C i D. Powstający związek 15,16-DHBV jest substratem oksydoreduktazy PebB. Obie reakcje redukcji wymagają dwóch elektronów, dostarczanych przez ferredoksynę [12, 16]. Niedawno przedstawiono dwa alternatywne szlaki biosyntezy PEB, zidentyfikowane w genomach fagowych. Syntazy PebS oraz PcyX katalizują czteroelektronową redukcję BV w jednym etapie, z utworzeniem związku pośredniego 15,16-DHBV. Syntaza PebS, mimo iż jest homologiem oksydoreduktazy PebA, zdolna jest do redukcji produktu pośredniego do PEB. Syntaza PcyX katalizuje tę samą reakcję co syntaza PebS, natomiast mechanizm katalityczny tej reakcji jest inny. Obie reduktazy charakteryzują się tylko 9% homologią sekwencji aminokwasów. Dopasowanie sekwencji aminokwasów wskazuje na pokrewieństwo PcyX z enzymami PcyA, co sugeruje, że PcyX pochodzą najprawdopodobniej od fagów infekujących alfa-proteobakterie. Enzym PUBS, odkryty stosunkowo niedawno, katalizuje reakcję biosyntezy fikourobiliny (PUB) [12, 14].



Rysunek 4. Biosynteza fikobilin z uwzględnieniem rodzaju enzymów z rodziny FDBR (litera „R” przedstawia propionianowe łańcuchy boczne)

Figure 4. Biosynthesis of phycobilins with regard to the type of enzymes from the FDBR family (the letter "R" represents the propionate side chains)

2.2. WIĄZANIE FIKOBILIN DO AOPROTEIN

Powstałe fikobiliny są następnie kowalencyjnie wiązane z apoproteinowym rdzeniem, utworzonym w procesie translacji, najczęściej z udziałem enzymów z rodziny liaz fikobiliproteinowych lub rzadziej w wyniku autokatalitycznych przemian. W pełni funkcjonalne fikobiliproteiny powstają na skutek potranslacyjnych modyfikacji: przyłączenia chromoforu oraz metylacji reszty asparaginy w podjednostkach β.

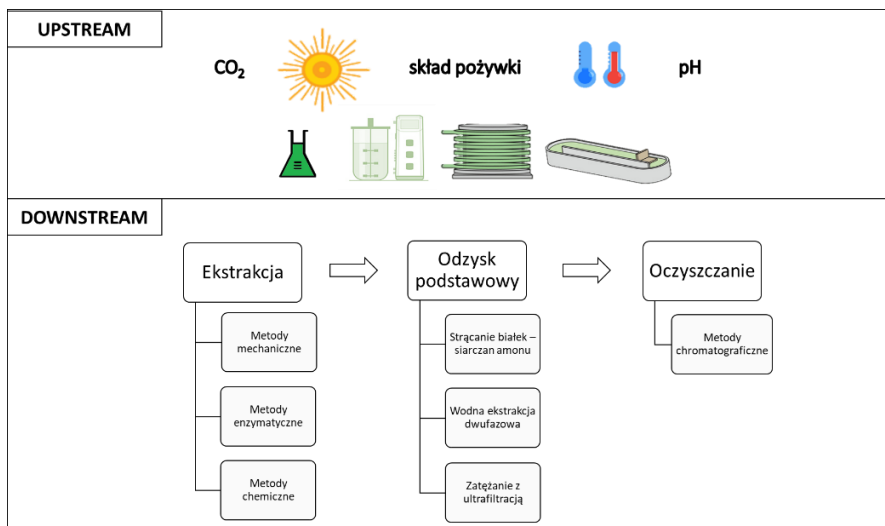
W komórkach cyanobakterii występują trzy rodziny liaz fikobiliproteinowych: liazy typu E/F, typu T oraz typu S/U. Liazy typu T specyficznie przyłączają fikobiliny do ściśle określonej reszty cysteinowej, natomiast liazy typu S nie są tak specyficzne, a tym samym są bardziej uniwersalne [6, 17]. Liazy typu E/F przeprowadzają specyficzne przyłączenie fikocyjanobiliny lub fikoerytrobiliny do reszty Cys-84 podjednostek α fikocyjaniny, fikoerytrocjaniny i fikoerytryny [17-19]. Liazy typu S/U wiążą fikocyjanobiliny do obu podjednostek PC, PEC i PE. Istotną rolą liaz jest zapewnienie odpowiedniej stereochemii wiązania właściwej fikobiliny z odpowie-

dnia resztą cysteiny, zwłaszcza w przypadku, gdy dany gatunek zdolny jest do biosyntezy więcej niż jednego typu fikobiliny [8, 17]. Ponadto, liazy fikobiliprotein pełnią funkcję białek opiekuńczych lub ochronnych nośników, przejściowo wiążących nietrwałe produkty pośrednie. Niektóre liazy fikobiliprotein przeprowadzają izomeryzację fikobiliny podczas wiązania z resztą cysteiny. Opisano również enzymy należące do rodziny liaz fikobiliproteinowych, które odłączają bilinowy chromofor [20-22].

W przypadku fikobiliprotein produkowanych przez sinice, autokatalityczne wiązanie fikobiliny występuje rzadko. Dotychczas zaproponowano ten mechanizm w dwóch przypadkach: białka łącznikowego ApcE, łączącego rdzeń fikobilisomu z błoną tylakoidu oraz apo-allofikocyjaniny (apo-APC). W strukturze ApcE wyróżnić można domenę, która umożliwi wiązanie fikobiliny przy Cys-186. Efektywność przyłączania fikobilin w sposób autokatalityczny jest porównywalna do działania liaz fikobiliproteinowych, co sugeruje, że ApcE może być liazą autokatalityczną [6, 23].

3. POZYSKIWANIE FIKOBILIPROTEIN

Proces pozyskiwania metabolitów, w tym fikobiliprotein, z komórek fotoautotrofów można podzielić na dwie fazy. Najpierw zachodzi akumulacja pożądanych metabolitów w komórkach hodowanych cyjanobakterii [UPSTREAM], a następnie pozyskuje się konkretne substancje poprzez ekstrakcję wyodrębnionych frakcji z biomasy [DOWNSTREAM] (Rys. 5) [2, 3, 24].



Rysunek 5. Otrzymywanie fikobiliprotein z biomasy mikroorganizmów
Figure 5. Obtaining of phycobiliproteins from microbial biomass

3.1. AKUMULACJA FIKOBILIEPROTEIN

Efektywnej akumulacji fikobiliprotein sprzyja optymalizacja warunków wzrostu mikroorganizmów. Ponieważ produkcja metabolitów i rozwój sinic zależą nie tylko od czynników biotycznych, ale także od czynników abiotycznych (światło, temperatura, stężenie składników odżywczych, pH, zasolenie i skład chemiczny pożywki), zmieniając warunki hodowli można w pewnym stopniu kontrolować metabolizm tych mikroorganizmów [2, 24,25]. Osiągnięcie równowagi między wzrostem biomasy a wydajnością produkcji fikobiliprotein jest aktualnym wyzwaniem, a zrozumienie wpływu określonych czynników może być kluczem do uzyskania wysokich stężeń tych barwników w komórkach cyjanobakterii i alg. Optymalizacja parametrów działania fotobioreaktorów i optymalizacja składu pożywki to główne zmienne, wykorzystywane przez badaczy do szybkiej akumulacji fikobiliprotein [2, 3]. Drugim, poza sinicami, głównym źródłem pozyskiwania fikobiliprotein są czerwone mikro- lub makroalgi. Dobór warunków hodowli sprzyjających zwiększeniu produkcji biomasy bogatej w fikobiliproteiny jest jednym z narzędzi wykorzystywanych eksperymentalnie i przemysłowo.

Ustalono na przykład, że natężenie światła ma istotne znaczenie dla rozwoju cyjanobakterii oraz produkcji fikobiliprotein. Biosynteza białkowego rdzenia fikobiliprotein jest mocniej stymulowana w warunkach niskiego natężenia oświetlenia, ze względu na minimalne zużycie energii fotosystemów. Należy jednak pamiętać o tym, że intensywność światła umożliwiająca efektywny rozwój cyjanobakterii jest cechą specyficzną dla gatunku lub rodzaju tych mikroorganizmów [1, 9].

Udowodniono, że nie tylko natężenie światła, ale także jego barwa wpływa na produkcję fikobiliprotein sinic. Czerwona barwa światła może korzystnie wpływać na wzrost sinic i stymulować produkcję fikocyjaniny, z kolei światło niebieskie stymulowało produkcję fikoerytryny u krasnorostów [26]. Różna wrażliwość gatunków sinic na światło o określonej barwie, a zatem specyficznego długości fali i energii jest istotna w kontekście zasiedlania nisz środowiskowych. Fotony niebieskie, o relatywnie wysokiej energii mogą przenikać w głąb toni wodnej, dlatego w głębszych warstwach wody dostępne jest przede wszystkim światło niebiesko-zielone. Cyjanobakterie wykazują pewną formę fotomorfogenezy nazywaną aklimatyzacją chromatyczną (ang. Chromatic Acclimation; CA). Aklimatyzacja ta umożliwia zmianę składu fikobiliprotein prowadzącą do optymalnej absorpcji światła, a tym samym do efektywnego wykorzystania warunków oświetlenia na różnych głębokościach akwenu, w którym się rozwijają [1,2, 9].

Odczyn medium hodowlanego jest kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na procesy fizjologiczne i biochemiczne organizmów produkujących fikobiliproteiny [27]. Wytwarzanie tych barwnych białek przez cyjanobakterie roz-

wijające się w podłożach o różnych wartościach pH prawdopodobnie jest wartością specyficzną dla gatunku. Na przykład, w przypadku słodkowodnego gatunku *Anabaena fertilissima* najwyższe stężenie fikobiliprotein uzyskano, gdy wartość pH pożywki wynosiła 7,5 [28]. Halofilny gatunek sinicy *Arthrospira platensis*, ze względu na wysoką zawartość fikocyjaniny, jest głównym mikroorganizmem używanym w przemysłowej produkcji tego niebieskiego barwnika. *Arthrospira platensis* może rozwijać się w warunkach zasadowych (pH 10,5), unikając konkurencji ze strony innych mikroorganizmów fotosyntezujących [27].

Innym sposobem kontroli produkcji fikobiliprotein może być wzbogacanie pożywki hodowlanej poprzez dodanie fitohormonów lub stymulatorów wzrostu roślin. Podobieństwo metaboliczne organizmów fotosyntetycznych, uzasadnia stosowanie regulatorów wzrostu. Zaobserwowano, że kwas giberelinowy 3 indukował wzmożoną produkcję fikobiliprotein i wzrost komórek *Microcystis aeruginosa*. Hormon ten prawdopodobnie wpływa na pobieranie składników pokarmowych. Wykazano też, że obecność auksyny - kwasu indolo-3-masłowego w hodowli *Nostoc linckia* zwiększa produkcja fikobiliprotein [29].

Niektóre związki stosowane jako pestycydy, charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, mogą więc być wymywane do wód powierzchniowych i oddziaływać na żyjące tam organizmy. Jedną z takich substancji jest herbicyd glifozat, który wywarł negatywny wpływ na wytwarzanie pigmentów białkowych przez *Oscillatoria limnetica* [30]. Natomiast obecność tego fosfonianu w hodowli *Microcystis aeruginosa* skutkowałą zwiększeniem zawartości niebieskiej fikocyjaniny [31]. Wyniki badań dotyczące obecności glifozatu w środowisku życia *Arthrospira maxima* wskazują, że wytwarzanie niebieskiego barwnika było stymulowane obecnością tego fosfonianu [32]. W odniesieniu do cyjanobakterii zauważono także, że insektycyd malation powoduje gwałtowny spadek stężenia fikobiliprotein, natomiast inny fosforoorganiczny insektycyd - chloropiryfos, spowalnia rozwój sinic [33].

3.2. POZYSKIWANIE FIKOBILIEPROTEIN

Izolacja fikobiliprotein z biomasy komórkowej to postępowanie wieloetapowe, którego szczegóły proceduralne mają ogromne znaczenie dla uzyskania produktu o odpowiedniej czystości. Zawartości fikobiliprotein oraz współczynnik czystości - wyrażony jako stosunek absorpcji mierzonej przy długości fali charakterystycznej dla danej fikobiliproteiny, do wartości absorpcji przy długości fali 280 nm (białka) (A_{\max}/A_{280}), w uzyskanym ekstrakcie komórkowym lub oczyszczonej frakcji, określa się spektrofotometrycznie używając równań chromatycznych [34]. Opisano wiele procedur, których głównym celem jest uzyskanie matrycy o odpowiednio wysokim współczynniku czystości oraz wysokiej zawartości fikobiliprotein. Najczęściej wy-

korzystywana procedura pozyskiwania fikobiliprotein zakłada zastosowanie trzech głównych metod: (i) ekstrakcji z celowo uszkodzonych komórek, (ii) odzysku podstawowego z ekstraktu komórkowego oraz (iii) zastosowanie zaawansowanych technik oczyszczania do uzyskania rozdzielonych frakcji [27, 35, 36].

Pierwszym etapem procedury otrzymywania fikobiliprotein jest ich ekstrakcja z komórek cyjanobakterii i alg. Ekstrahentami są roztwory wodne i bufory (szczególnie bufor fosforanowy). Do uzyskania uwolnionych pigmentów z biomasy wykorzystuje się również ekstrakcję rozpuszczalnikiem pod ciśnieniem, ekstrakcję cieczą jonową oraz ekstrakcję ditlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym [27]. W celu uwolnienia pigmentów wewnątrzkomórkowych stosuje się kilka technik destrukcji ścian komórkowych cyjanobakterii i mikroalg: obróbka mechaniczna (homogenizacja wysokociśnieniowa, mielenie perełkowe, ultradźwięki, pulsacyjne pole elektryczne, proces zamrażania-rozmrażania, szok osmotyczny i mikrofały), obróbka enzymatyczna i obróbka chemiczna [35-37]. Metody mechaniczne nie są selektywne i zużywają znaczne ilości energii, są jednak nietoksyczne, szybkie i odpowiednie do produkcji na dużą skalę. Z kolei zabiegi chemiczne i enzymatyczne są opisywane jako mniej odpowiednie do zwiększania skali ze względu na ich wysoki koszt, niską stabilność, czasochłonność i toksyczność [36, 37].

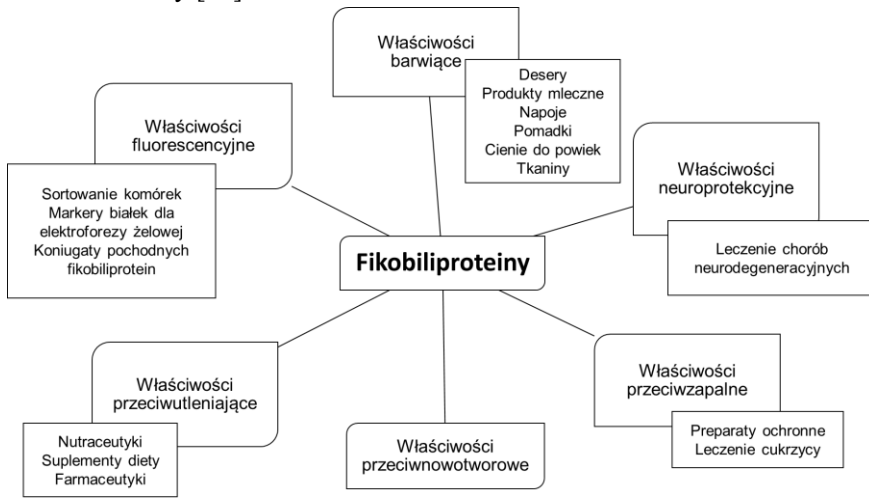
Kolejny etap procesu otrzymywania fikobiliprotein, odzysk podstawowy, przeprowadza się zwykle przez selektywne strącanie białek za pomocą siarczanu amonu. Najczęściej stosuje się frakcjonowanie dwustopniowe. W pierwszym stopniu wysycenie soli wynosi ok. 25%, w kolejnym od 50% do 70% [35]. Etap ten przeprowadza się również stosując wodną ekstrakcję dwufazową glikolem polietylenowym lub zateżanie z ultrafiltracją (30–50 kDa) [25].

Etap podstawowego oczyszczania, opiera się głównie na metodach chromatograficznych takich jak: chromatografia jonowymienna, chromatografia oddziaływań hydrofobowych, sączenie molekularne lub chromatografia hydroksypatytowa. Zastosowanie technik chromatograficznych pozwala osiągnąć bardzo wysokie wartości czystości otrzymanego produktu. Przy zastosowaniu chromatografii żelowej wartość współczynnika czystości dla fikocyjaniny wynosi powyżej 4,0, a przy zastosowaniu kilkukrotnej separacji z użyciem różnych złóż wzrasta do ok. 7 [35, 36].

4. UŻYTECZNE WŁAŚCIWOŚCI FIKOBILIPROTEIN

Fikobiliproteiny wykazują ważne dla ludzi i zwierząt właściwości, które wykorzystywane są w tworzeniu nowych produktów i w procesach biotechnologicznych (Rys. 6) [25, 37-39]. Intensywna barwa, brak toksyczności oraz rozpuszczalność fikobiliprotein w wodzie, umożliwia ich zastosowanie w przemyśle: spożywczym, farmaceutycznym oraz kosmetycznym, które stawiają wysokie wyma-

gania substancjom barwiącym. Niebieską fikocyjaninę otrzymywaną z komórek *Spiruliny*, wykorzystuje się do barwienia produktów mlecznych, słodczy, galaretek, napojów bezalkoholowych i gum do żucia [1, 25, 27]. W przemyśle kosmetycznym związki te pełnią nie tylko rolę pigmentów, ale również czynników przeciwutleniających, dzięki czemu uzyskane produkty charakteryzują się właściwościami przeciwstarzeniowymi [40]. Jako substancje naturalne, fikobiliproteiny stanowią cenną alternatywę dla barwników syntetycznych. Na przykład z uwagi na powinowactwo chemiczne, fikocyjaninę stosuje się do barwienia jedwabiu i bawełny [41].



Rysunek 6. Właściwości i zastosowanie fikobiliprotein

Figure 6. Properties and applications of phycobiliproteins

Bioaktywność fikobiliprotein można zaprezentować odwołując się do ich działania jako przeciwutleniaczy oraz związków ograniczających stany zapalne, proliferację komórek niektórych nowotworów oraz degenerację komórek nerwowych (Tabela 2). Właściwości przeciwutleniające oraz neuroprotektoryjne fikocyjaniny, wskazują na możliwość zastosowania jej w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych [39, 40, 42, 43]. Badania nad zastosowaniem fikocyjaniny jako przeciwutleniacza wykazały, że posiada aktywność neutralizowania różnych form reaktywnego tlenu: tlenu singletowego, rodnika alkoksylogowego, nadtlenu wodoru, rodnika hydroksylogowego, kwasu podchlorawego, anionu ponadtlenu, rodnika peroksylogowego oraz tlenu azotu [40]. Fikocyjanina może hamować działanie rodników nadtlenuazotynowych, zmniejszając w ten sposób uszkodzenia DNA [44]. Ponadto, ogranicza peroksydację lipidów oraz pośredniczy w zwiększeniu obecności enzymów antyoksydacyjnych [42, 43].

Tabela 2. Wybrane właściwości bioaktywne fikobiliprotein

Table 2. Selected bioactive properties of phycobiliproteins

Bioaktywność	Obiekt badań	Stężenie PBP	Lit.
Przeciwutleniająca (proteekcyjna)	Eryocyty	0,01-1,00 μM	39
	Płytki krwi	0.5–10 nM	40
	Kardiomiocyty	10 μM	
	DNA	5-25 μM	44
	Komórki wątroby	200 mg/kg	45
	Komórki nerek	0,75-3,0 mg.kg	46
Przeciwzapalna	COX-2	1-100 μM	48
	Mieloperoksydaza	1-100 μM	
Inhibicja enzymów	α -amylaza	50-250 $\mu\text{g/ml}$	43
	α -glukozydaza	50-250 $\mu\text{g/ml}$	
	Lipaza trzustkowa	100, 200 mg/kg	40
Przeciwnowotworowa	Komórki raka piersi MDA-MB 231	100-500 $\mu\text{g/mL}$	49
	Komórki gruczolaka piersi MCF-7	0–40 μM	50
	Komórki ludzkiej białaczki K562	40-160 mg/l	
	Komórki raka prostaty	250-500 μg	
	Komórki ludzkiego czerniaka A375	0–40 μM	51

Korzystną aktywność fikocyjaniny odnotowano studiując jej zastosowanie w ograniczeniu ostrego uszkodzenia oksydacyjnego wątroby spowodowanego promieniowaniem rentgenowskim (badanie *in vivo*) [45] oraz w zapobieganiu stresowi oksydacyjnemu w ostrym uszkodzeniu nerek spowodowanym przez HgCl_2 [46]. Dotychczas zaproponowano kilka mechanizmów wyjaśniających sposób, w jaki fikobiliproteiny wyciszają i stabilizują reaktywne formy tlenu. Mechanizm działania fikocyjaniny jest podobny do powszechnie stosowanych przeciwutleniaczy; tokoferolu czy kwasu askorbinowego. Należy podkreślić, że zarówno fikobiliny jak i apoproteiny fikobiliprotein zaangażowane są w procesy antyoksydacyjne [47].

Zdolność barwnych białek do inaktywacji wolnych rodników, kluczowych w patogenezie różnych chorób związanych ze stresem oksydacyjnym, stała się przesłanką do badań nad wykorzystaniem tych makromolekuł w terapii niektórych chorób, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [40]. Działanie przeciwzapalne fikobiliprotein związane jest z hamowaniem aktywności COX-2, aktywności mieloperoksydazy, hamowaniem apoptozy i redukcją odpowiedzi autoimmunologicznej [48].

Już na początku lat 80-tych XX w. ustalono, że fikocyjanina może służyć jako cytotoksyczny fotouczulacz, i dzięki temu może znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej. Relatywnie niedawno stwierdzono, że białko to jest inhibitorem proteinaz i lipoksygenaz. Ustalono również, że obecność tego barwnika hamuje denaturację albumin oraz hemolizę wywołaną hipotonicznością w testach *in vitro* [43]. Fikocyjaninę otrzymaną z komórek cyjanobakterii zastosowano również w badaniach proliferacji komórek raka piersi MDA-MB 231, w których wykazywała fototoksyczność po naświetlaniu laserem emitującym światło o długości fali 625 nm. [49]. Wykazano także, że fikocyjanina hamuje proliferację komórek nowotworowych np. gruczolaka piersi MCF-7, ludzkiej białaczki K562 oraz ludzkiego czerniaka A375 [50, 51]. Z kolei połączenie fikocyjaniny, otrzymanej z komórek cyjanobakterii *Limnothrix*, z lekiem przeciwnowotworowym topotekaniem, indukowało apoptozę komórek patologicznych raka prostaty. Zatem PBP mogą okazać się czynnikiem wzmacniającym działanie dostępnych leków przeciwnowotworowych [50]. Interesujące i godne uwagi jest to, że fikobiliproteiny wykazują większe powinowactwo do komórek nowotworowych niż do komórek zdrowych, jednak mechanizm tego fenomenu wciąż pozostaje niejasny.

Fikocyjanina jest również, potencjalnym kandydatem do stosowania w leczeniu cukrzycy typu 2, ze względu na hamowanie *in vitro* aktywności peptydazy dipeptydylowej IV oraz enzymów metabolizmu węglowodanów (α -amylazy i α -glukozydazy) [43]. Podobne właściwości tego barwnego białka - hamowanie aktywności lipazy trzustkowej, sugerują możliwe wykorzystanie tej substancji w przeciwdziałaniu otyłości [40].

Inna fikobiliproteina - fikoerytryna wykazuje intensywną fluorescencję, a przy tym wysoką fotostabilność i zdolność do koniugacji z różnymi produktami metabolizmu. Dzięki tym właściwościom, możliwe jest użycie tego białka jako bardzo efektywnego znacznika fluorescencyjnego w technikach diagnostycznych, badaniach biomedycznych oraz w biologii molekularnej [41, 51].

Fikobiliproteiny znajdują zastosowanie w cytometrii przepływowej, immunofenotypowaniu, mikroskopii fluorescencyjnej, sortowaniu komórek fluorescencyjnie aktywowanych oraz w immunologicznych testach fluorescencyjnych [51]. Interesującą cechą fikobiliprotein jest skłonność tych molekuł do tworzenia stabilnych koniugatów z cząsteczkami innych związków o istotnym znaczeniu biologicznym np. immunoglobulinami, biotyną lub białkiem A. Połączenie te są dobrym narzędziem diagnostycznym wykorzystującym dwukolorową fluorescencję. Badania nad właściwościami fikobiliprotein dotyczą również możliwości ich wykorzystania jako neutralnych substancji kontrastowych oraz do swoistego „impregnowania” struktur biologicznych i w konsekwencji do wzmocnienia efektu w ich obrazowaniu [51, 52].

Fikobiliproteiny można również zastosować w biologicznej metodzie otrzymywania nanocząstek srebra (Ag-NP), co potwierdzono stosując do tego celu fikocyjaninę wyizolowaną z trzech różnych gatunków cyjanobakterii [53]. Potwierdzono, że wyizolowane z komórek fikobiliproteiny mogą, w obecności światła, redukować kationy srebra, gdyż fikobiliny zdolne są do indukowania przejść elektronowych ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego, co następuje w efekcie absorpcji kwantów światła. Mechanizm w jaki fikocyjanina uczestniczy w tworzeniu Ag-NP, jest jednak wciąż przedmiotem badań.

UWAGI KOŃCOWE

Fikobiliproteiny - barwne białka wytwarzane przez mikroalgi eukariotyczne oraz sinice, zawdzięczają swoje unikatowe właściwości grupom prostetycznym, którymi są otwarte łańcuchowe tetrapiole. Jako powstające w procesie biosyntezy, fikobiliproteiny charakteryzują się szczególnym potencjałem biotechnologicznym także ze względu na swoiste właściwości fizykochemiczne. Klasycznym przykładem jest wykorzystanie tych białek - szczególnie fikocyjaniny o intensywnej niebieskiej barwie, jako naturalnych barwników w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. W produktach, do których są dodawane odpowiadają nie tylko za barwę, ale również za różnorodną aktywność biologiczną, zapewniając tym wytworom dodatkowe walory. W tej kategorii najczęściej wymienia się właściwości przeciwutleniające fikobiliprotein, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych oraz właściwości fluorescencyjne, na przykład fikoerytryny, które także predestynują te białka do zastosowania w badaniach biomedycznych. Wyniki aktualnych prac dotyczących pozyskiwania i wykorzystania fikobiliprotein wskazują, że kluczowe dla szerszego zastosowania tych substancji jest zrozumienie niuansów procesu biosyntezy poszczególnych grup tych barwnych białek, a w konsekwencji opracowanie sposobów skutecznej kontroli ich wytwarzania. Największe nadzieje w tej materii wiąże się z zastosowaniem modulatorów fizykochemicznych do regulowania metabolizmu mikroalg prokariotycznych, pod kątem uzyskiwania wysokich stężeń konkretnych fikobiliprotein w komórkach. Z uwagi na odmiennie właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczną poszczególnych, zróżnicowanych strukturalnie fikobiliprotein, specyficzność podejmowanych działań jest w tym przypadku niezwykle istotna. Ponieważ istnieją realne przesłanki zwiększenia skali wytwarzania tych substancji poprzez modyfikację warunków hodowli mikroalg, uważamy, że pozyskanie określonych fikobiliprotein w maksymalnie czystej postaci zintensyfikuje aktualne wykorzystanie oraz otworzy nowe możliwości zastosowań tych cennych białek.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] I. N. Stadnichuk, P. M. Krasilnikov, D.V. Zlenko, *Microbiology*, 2015, **84**, 101.
- [2] M. Hsieh -Lo, G. Castillo, M.A. Ochoa-Becerra, L. Mojica, *Algal. Res.*, 2019, **42**, 101600.
- [3] V.K. Kannaujiya, D. Kumar, J. Pathak, R.P. Sinha, *Cyanobacteria, From Basic Science to Application*, Elsevier, Londyn, 2019.
- [4] E. Gantt, C.A. Lipschultz, J. Grabowski, B.K. Zimmerman, *Plant. Physiol.*, 1979, **63**, 615.
- [5] D.A. Bryant, G. Guglielmi, N.T. de Marsac, A.M. Castets, G. Cohen-Bazire, *Arch. Microbiol.*, 1979, **123**, 113.
- [6] W.M. Schluchter, G. Shen, R.M. Alvey, A. Biswas, N.A. Saunée, S.R. Williams, C.A. Mille, D.A. Bryant, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, **675**, 211.
- [7] F. Zhao, S. Qin, *J. Mol. Evol.*, 2006, **63**, 330.
- [8] H. Scheer, K. Zhao, *Mol. Microbiol.*, 2008, **68**, 263.
- [9] A.R. Grossman, L.G. Waasbergen, D. Kehoe, *Light Harvesting Antennas In Photosynthesis*, Springer, Dordrecht, 2003.
- [10] S.I. Beale, *Chem. Rev.*, 1993, **93**, 785.
- [11] H. Chakdar, S. Pabbi, *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology*, Springer, Nowe Delhi, 2016.
- [12] T. Dammeyer, N. Frankenberg-Dinkel, *Photochem. Photobio. Sci.*, 2008, **7**, 1121.
- [13] S.L. Tu, A. Gunn, M.D. Toney, R.D. Britt, J.C. Lagarias, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 8682.
- [14] B. Ledermann, M. Schwan, J.A. Sommerkamp, E. Hofmann, N. Frankenberg-Dinkel, *FEBS J.*, 2018, **285**, 339.
- [15] N. Frankenberg, J.C. Lagarias, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 9219.
- [16] T. Dammeyer, N. Frankenberg-Dinkel, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 27081.
- [17] C.D. Fairchild, J. Zhao, J. Zhou, S.E. Colson, D.A. Bryant, A.N. Glazer, A. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**, 7017
- [18] A. Shukla, A. Biswas, N. Blot, F. Partensky, J.A. Karty, L.A. Hammad, L. Garczarek, A. Gutu, W.M. Schluchter, D.M. Kehoe, *PNAS*, 2021, **109**, 20136.
- [19] K.H. Zhao, M.G. Denga, M. Zheng, M. Zhou, A. Parbel, M. Storf, M. Meyer, B. Strohmann, H. Scheer, *FEBS Letters*, 2000, **469**, 9.
- [20] R. Gasper, J. Schwach, J. Hartmann, A. Holtkamp, J. Wiethaus, N. Riedel, E. Hofmann, N. Frankenberg-Dinkel, *J. Biol. Chem.*, 2017, 292.
- [21] M. Kupka, J. Zhang, W.L. Fu, J.M. Tu, S. Böhm, P. Su, Y. Chen, M. Zhou, H. Scheer, K.H. Zhao, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 36405.
- [22] K.H. Zhao, P. Su, J.M. Tu., X. Wang, H. Liu, M. Plöscher, L. Eichacker, B. YanG, M. Zhou, H. Scheer, *Biochemistry*, 2007, **104**, 14300.
- [23] I.C. Hu, T.R. Lee, H.F. Lin, C.C. Chiueh, P.C. Lyu, *Biochemistry*, 2006, **45**, 7092.
- [24] E. Manirafasha, T. Ndikubwimana, X. Zeng, Y. Lu, K. Jing, *Biochem. Eng. J.*, 2016, **109**, 282.
- [25] F. Pagels, A.C. Guedes, H.K. Amaro, A. Kijjoo, V. Vasconcelos, *Biotechnol. Adv.*, 2019, **37**, 422.
- [26] J.L. Godínez-Ortega, P. Snoeijs, D. Robledo, Y. Freile-Pelegrín, M. Pedersén, *J. Appl. Phycol.*, 2008, **20**, 253.
- [27] R.R. Sonani, R.P. Rastogi, R. Patel, D. Madamvar, *World. J. Biol. Chem.*, 2016, **7**, 100.
- [28] J.I.S. Khattar, S. Kaur, S. Kaushal, Y. Singh, D.P. Singh, S. Rana, A. Gulati, *Algal. Res.*, 2015, **12**, 463.
- [29] X. Pan, F. Chang, L. Kang, Y. Liu, G. Li, D. Li, *J. Plant. Phyciol.*, 2008, **165**, 1691.
- [30] J.M. Salman, E. Abdul-Adel, *Int. J. Pharmatech. Res.*, 2016, **9**, 446.
- [31] W. Wang, M. Jiang, Y. Sheng, *Environ. Chem.*, 2020, **40**, 342.

- [32] A. Piro, D.M. Nisticò, D. Oliva, F.A. Fagà, S. Mazzuca, *Microorganisms*, 2022, **10**, 1063.
- [33] Hemlata, T. Fatma, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2009, **83**, 509.
- [34] C.S. Lobban, D.J. Chapman, B.P. Kremer, *Experimental phycology - A laboratory manual*, Cambridge University Press, Cambridge, 1988.
- [35] G. Chamorro-Cevallos, V.C. Jesús, G.A. Gutiérrez-Rebolledo, M. Hernández-Ortega. L. Valadez-Carmona, A. Mojica-Villegas, G. Gutiérrez-Salmeán, *Int. J. Food. Nutriti. Sci.*, 2016, **3**, 275.
- [36] G. Nemer, N. Louka, E. Vorobiev, D. Salameh, J.M. Nicaud, R.G. Maroun, M. Koubaa, *Fermentation*, 2021, **7**, 36.
- [37] P. Ping, Y. Wu, G. Wang, T. Jia, Y. Zhang, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 2017, **57**, 3840
- [38] M.U. Nethravathy, J.G. Mehar, S.N. Mudliar, A.Y. Shekh, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2019, **18**, 1882.
- [39] Q. Wu, L. Liu, A. Miron, B. Klímová, D. Wan, K. Kuča, *Arch. Toxicol.*, 2016, **90**, 1817.
- [40] B. Fernández-Rojas, J. Hernández-Juárez, J. Pedraza-Chaverria, *J. Funct. Food.*, 2014, **11**, 375.
- [41] S. Sekar, M. Chandramohan, *J. Appl. Phycol.*, 2008, **20**, 113.
- [42] C. Romay, J. Armesto, D. Ramirez, R. González, N. Ledon, I. García, *Inflamm. Res.* 1998, **47**, 36.
- [43] G. Prabakaran, P. Sampathkumar, M. Kavisri, M. Moovendhan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, **153**, 256.
- [44] V.B. Bhat, K.M. Madyastha, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **285**, 262.
- [45] Q. Liu, W. Li, S. Qin, *Biomed. Pharmacother.*, 2020, **130**, 110553.
- [46] E. Garcia-Pliego, M. Franco-Colin, P. Rojas-Franco, V. Blas-Valdivia, J. I. Serrano-Contreras, G. Pentón-Rol, E. Cano-Europa, *Food. Funct.*, 2021, **12**, 2985.
- [47] P. Pleonsil, S. Soogarun, Y. Suwanwong, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2013, **60**, 393.
- [48] S.M. Bannu, D. Lomada, S. Gulla, T. Chandrasekhar, P. Reddanna, M.C. Reddy, *Curr. Drug. Metab.*, 2020, **20**, 967.
- [49] S. Bharathiraja, H. Seo, P. Manivasagan, M.S. Moorthy, S. Park, Oh J., *Molecules*, 2016, **21**, 1470.
- [50] S. Hao, S. Li, J. Wang, L. Zhao, C. Zhang, W. Haunng, C. Wang, *J. Agric. Food. Chem.*, 2018, **66**, 10921.
- [51] X. Qiang, L. Wang, J. Niu, X. Gong, G. Wang, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, **193**, 1910.
- [52] A. Andreoni, U. Bernini, M. Mastrocinque, E. Quarto, P. Russo, *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 1990, **20**, 195.
- [53] N.E.A. El-Naggar, M.H. Hussein, A.A. El-Sawah A. A., *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1.

Praca wpłynęła do Redakcji 10 marca 2024 r.

