

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ КООРДИНАЦИОННЫХ
СОЕДИНЕНИЙ MN(II), ZN(II) ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ
ЦИАНОБАКТЕРИИ *Spirulina platensis*, ОБОГАЩЕННОЙ ФЕРМЕНТОМ
СУПЕРОКСИДИСМУТАЗОЙ (SOD)**

Надежда ЕФРЕМОВА

НИЛ фикобиотехнологии

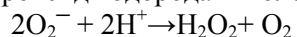
A fost determinată influența unor compuși coordinativi ai Mn(II) și Zn(II) asupra acumulării în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* a enzimei superoxidismutaza (SOD). A fost stabilită o activitate înaltă a enzimei SOD în prezența unor compuși coordinativi ai Mn(II) și Zn(II).

The influence of some coordinative compounds of Mn(II) and Zn(II) on the enzyme superoxidismutase accumulation in cyanobacteria *Spirulina platensis* biomass was determined. High activity of SOD in spirulina biomass in the presence of some coordinative compounds of Mn(II) and Zn(II) has been established.

Введение

Цианобактерия *Spirulina platensis* представляет интерес для исследователей не только как источник ценных биологически активных веществ, в том числе и веществ с антиоксидантными свойствами [1]. В биомассе спирулины содержатся такие антиоксиданты как, каротиноиды (β -каротин), фикобилипротеины (фикоцианин), полиненасыщенные жирные кислоты (γ -линоленовая кислота), токоферол, ферменты (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза) и др. [2].

SOD является одним из основных компонентов защитной системы клетки в случае воздействия окислительного стресса, так как катализирует реакцию дисмутации двух супероксиданионов (O_2^-) в пероксид водорода и молекулярный кислород [3].



Применение антиоксидантной терапии с использованием данного фермента эффективно для нейтрализации отрицательного воздействия свободных радикалов в организме человека, а также при различных патологических процессах [4]. Исследования, осуществленные сотрудниками лаборатории, выявили возможность использования некоторых металлокомплексов Fe(III) в качестве стимуляторов направленного синтеза SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis* [5,6].

Представляется перспективным и использование координационных соединений других металлов, таких как Mn(II) и Zn(II), в качестве регуляторов активности SOD у цианобактерии *Spirulina platensis*, так как известно, что данные элементы включаются в структуру многих ферментов и антиоксидантных комплексов. Так, марганец входит в состав активного центра супероксиддисмутазы (Mn-SOD) [7]. Цинк играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в клетке, входит в состав карбоангидразы, пероксидазы, оксидазы, полифенолоксидазы и других важных ферментов клетки [8].

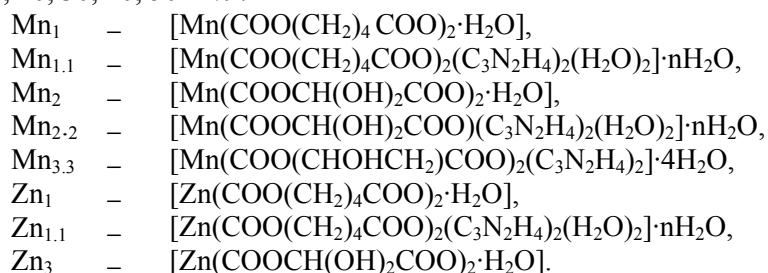
Целью работы явилось исследование влияния некоторых координационных соединений этих металлов для обогащения биомассы цианобактерии *Spirulina platensis* ферментом супероксиддисмутазой (SOD).

Материалы и методы

Объектом исследования является культура цианобактерии *Spirulina platensis* CNM-CB-02, хранящаяся в Национальной коллекции микроорганизмов Института микробиологии и биотехнологии АН Молдовы. Для культивирования была использована питательная среда Zarouk с определенным соотношением макро- и микроэлементов для нормального роста и развития культуры [1].

Культивирование проводилось в колбах Эрленмейера с объемом суспензии спирулины в питательной среде 100 мл в течение 144 часов при температуре 30°C. На третий день культивирования к

суспензии спирулины добавляли одно из координационных соединений Mn(II), Zn(II) в концентрациях 10, 20, 30, 40, 50 мг/л:



Координационные соединения Mn(II) и Zn(II) содержали в качестве лиганда адипиновую кислоту (Mn₁ и Zn₁), адипиновую кислоту и имидазол (Mn_{1.1} и Zn_{1.1}), винную кислоту (Mn₂ и Zn₃), винную кислоту и имидазол (Mn_{2.2}) и яблочную кислоту и имидазол (Mn_{3.3}).

Определение активности супероксиддисмутазы осуществлялось согласно методу Winterbourn [9]. Активность SOD выражалась в условных единицах активности. Условные единицы активности SOD – это количество энзима, необходимое для ингибирования на 50% реакции восстановления TNB.

Результаты и обсуждение

В данной работе в качестве регуляторов активности супероксиддисмутазы в биомассе спирулины были использованы комплексные соединения марганца. Для реализации этой цели был проведен скрининг пяти комплексных соединений Mn(II) для выявления комплекса, максимально увеличивающего активность супероксиддисмутазы.

На рисунке 1 представлен сравнительный анализ изменения активности SOD в биомассе спирулины, культивируемой в присутствии пяти комплексных соединений Mn(II), содержащих в качестве лигандов двукислотные кислоты и имидазол в различных концентрациях.

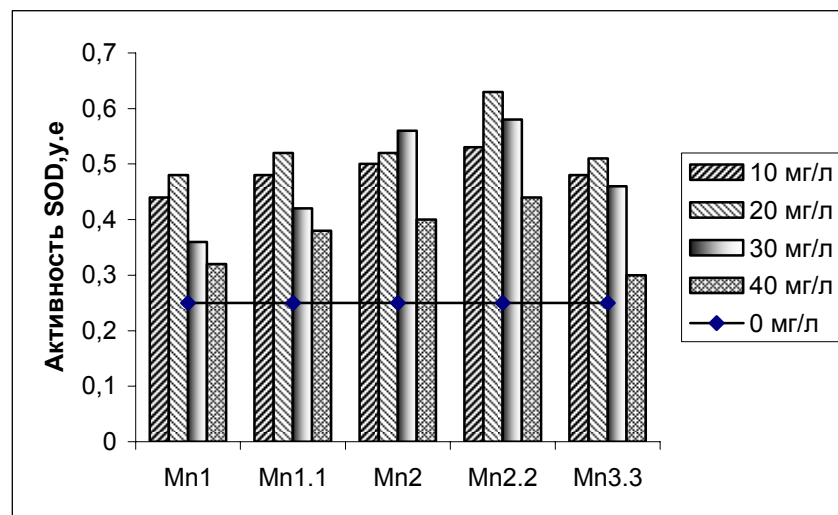


Рис.1. Сравнительный анализ влияния некоторых комплексных соединений Mn(II) на активность фермента SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis*.

Проведенные нами исследования показали, что добавление комплексных соединений марганца, а также других металлов, на первый и второй день культивирования спирулины не оказывало значительного стимулирующего эффекта на активность супероксиддисмутазы. Оптимальным явилось внесение в культуральную среду спирулины данных комплексных соединений на третий день культивирования. Заметно, что с увеличением концентрации комплексных соединений в пределах 10-30 мг/л происходит повышение активности фермента супероксиддисмутазы. Максимальные значения активности фермента для всех использованных соединений Mn(II) были достигнуты при добавлении в культивируемую среду веществ в концентрации 20 мг/л, исключение составило соединение Mn₂ — [Mn(COOCH(OH)₂COO)₂·H₂O].

Значительное повышение активности SOD было отмечено при добавлении в культивируемую среду комплексного соединения $Mn_{2,2}$ — $[Mn(COOCH(OH)_2COO)(C_3N_2H_4)_2(H_2O)_2] \cdot nH_2O$ в концентрации 20 мг/л, что привело к увеличению активности SOD в 2,52 раза по сравнению с контролем. Различный эффект, оказываемый данными соединениями на активность SOD, можно объяснить различной природой лигандов [8]. Так, комплексное соединение $Mn_{2,2}$ в качестве лигандов содержало винную кислоту и имидазол. Известно, что винная кислота способна окислять мембранные липиды, вызывая т.о. усиление окислительного стресса [10]. Вследствие окислительного стресса и повышенного образования свободных радикалов возрастает активность супероксиддисмутазы [11].

Увеличению активности SOD способствует и другой лиганд – имидазол, непосредственно участвующий в биосинтезе незаменимой аминокислоты гистидина. Известно, что гистидин входит в состав активного центра Fe/Mn-SOD [7]. Результаты исследования влияния соединений цинка на активность SOD в биомассе спирулины, культивируемой в присутствии различных концентраций комплексных соединений Zn(II), представлены на рис.2.

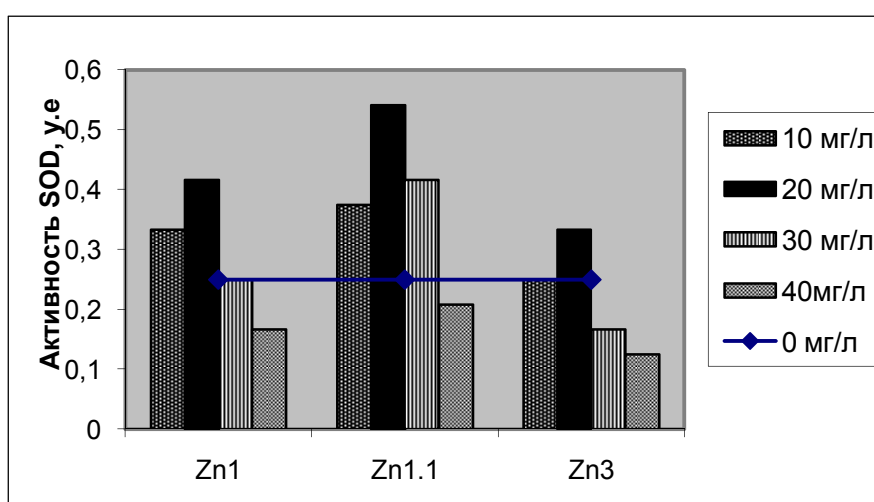


Рис.2. Сравнительный анализ влияния некоторых комплексных соединений Zn(II) на активность фермента SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis*.

Наибольший стимулирующий эффект на активность SOD (в 2,2 раза по сравнению с контролем) оказало комплексное соединение цинка $Zn_{1,1}$, содержащее в качестве лиганда адипиновую кислоту и имидазол. Имидазол участвует в биосинтезе незаменимой аминокислоты гистидина, которая входит в состав активного центра SOD, что и может способствовать увеличению активности данного фермента.

При сравнении эффектов, оказываемых координационными соединениями Mn(II) и Zn(II) с одинаковыми лигандами на активность супероксиддисмутазы, было отмечено следующее:

1. При сравнении комплексных соединений Mn_1 — $[Mn(COO(CH_2)_4COO)_2 \cdot H_2O]$ и Zn_1 — $[Zn(COO(CH_2)_4COO)_2 \cdot H_2O]$, содержащих в качестве лигандов адипиновую кислоту, было выявлено, что наибольший эффект на активность SOD оказывает соединение Mn_1 (20 мг/л), что способствует повышению активности в 2 раза по сравнению с контролем. При увеличении концентрации данного соединения активность фермента снижается постепенно, тогда как в случае такого же увеличения концентрации соединения Zn_1 активность фермента резко снижается и в концентрации 40 мг/л становится ниже активности SOD в контрольной пробе.

2. Комплексы $Mn_{1,1}$ — $[Mn(COO(CH_2)_4COO)_2(C_3N_2H_4)_2(H_2O)_2] \cdot nH_2O$ и $Zn_{1,1}$ — $[Zn(COO(CH_2)_4COO)_2(C_3N_2H_4)_2(H_2O)_2] \cdot nH_2O$, содержащие в качестве лигандов адипиновую кислоту и имидазол, оказали равнозначный эффект на повышение активности SOD. Так, оба соединения, и $Mn_{1,1}$ и $Zn_{1,1}$ (20-30 мг/л), способствуют увеличению активности SOD в 1,7-2 раза по сравнению с контролем.

3. Среди комплексных соединений Mn_2 — $[Mn(COOCH(OH)_2COO)_2 \cdot H_2O]$ и Zn_3 — $[Zn(COOCH(OH)_2COO)_2 \cdot H_2O]$, содержащих в качестве лиганда винную кислоту, наибольший стимулирующий эффект на активность SOD (в 2,2 раза по сравнению с контролем) оказывает комплексное соединение Mn_2 (30 мг/л).

Выводы

1. Исследование влияния некоторых комплексных соединений марганца и цинка на активность SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis* показало, что стимулирующий эффект данных соединений зависит как от концентрации, так и от природы металла и лигандов. Комплекс $Mn_{2,2}$, содержащий в качестве лигандов винную кислоту и имидазол, а также комплекс $Zn_{1,1}$ с лигандами адипиновая кислота и имидазол в оптимальных концентрациях 20 мг/л способствуют наибольшему возрастанию активности энзима, в 2,52 и 2,2 раза соответственно, по сравнению с контролем.
2. Комплексные соединения, содержащие в качестве одного из лигандов имидазол (предшественник гистидина), оказывают бóльший эффект на содержание SOD, чем комплексы, содержащие только двукарбоксильные органические кислоты, что связано с присутствием гистидина в активном центре фермента.

Литература:

1. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. - Chișinău: Știința, 1993, p.140.
2. Jetley U.K., Choudhary M., Fatma T., 2004. Evaluation of biochemical productivity cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5 under heavy metal. stress, Asian J. Chem. 16(3-4), p.1524-1528
3. Fridovich I., 1981. In superoxid radical and superoxide dismutase, Approach. New-York, e.a., p.250-272
4. Поберезкина Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Украинский биохимический журнал. - 1989. - Т.61. - №2. - С.14-22.
5. Bulimaga V., Rudic V., Zosim L., Chiriac T., Turtă C., Șova S., Prodius D., Melnic S., Mereacre V. Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis*. / Brevet de invenție 3129 MD // BOPI. - 2006. - Nr.8. - P.35.
6. Bulimaga Valentina, Rudic Valeriu, Zosim Liliana, Chiriac Tatiana, Turtă Constantin, Prodius Denis, Șova Sergiu, Mereacre Valeriu. Procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* / Brevet de invenție 3128 MD // BOPI. - 2006. - Nr.8. - P.34.
7. Felisa Lauren Wolf, 2006. The role and evolution SOD in algae, Dissertation for degree of doctor of Philosophy, New Brunswick, New Jersey, p.132.
8. Damien L. Callahan, Alan J.M.Baker, Anthony G.Wedd, 2005. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 11(1), p.2-12.
9. Wynterbourne C.C., 1987, Archiv. Biochem. Biophys., p.209.
10. Sultan S., Fatma T., 1999. Phytotoxicity of heavy metals on *Spirulina platensis*, Phycos 38(1-2), p.87-92.
11. Ruth Grene Asher, N.Ertrurk, L.S. Heath. Role of superoxididismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plants // Journal of Experimental Botany. - 2002. - Vol 53. - No372. - P.1331-1341.

Notă: Aduc sincere mulțumiri dlui Aurelian Gulea, prof. univ., dr. hab. și dnei Liliana Popovschi, dr. în chimie, pentru asigurarea cu compuși coordinativi, dnei Valentina Bulimaga, dr. în biologie, pentru sugestii, suport și discuții asupra acestui articol, WFS – pentru suport financiar.

Prezentat la 11.02.2008