

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

Валериу РУДИК^{*}, Аурелиан ГУЛЯ^{**}, Валентина БУЛЬМАГА, Надежда ЕФРЕМОВА^{*},
Лилия ПОПОВСКИ^{**}

Лаборатория фитобиотехнологии

^{*}Институт микробиологии и биотехнологии АН Молдовы

^{**}Лаборатория химии координационных соединений

A fost determinată influența unor compuși coordinativi ai Mn(II) asupra acumulării în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* a enzimei superoxidismutaza (SOD). A fost stabilită o activitate înaltă a enzimei SOD în prezența tuturor compușilor coordinativi ai Mn(II) cercetați; este de menționat în special compusul $[Mn(CCl_3COO)_3(CN_3H_5)] \cdot 2H_2O$ (o sporire a activității de 6,5 ori față de proba de referință). Biomasa cu conținut înalt de SOD poate fi utilizată pentru obținerea preparatelor antioxidante.

The influence of some coordinative compounds of Mn(II) on enzyme superoxidismutase (SOD) accumulation in cyanobacteria *Spirulina platensis* biomass was determined. High activity of SOD in spirulina biomass in the presence of all coordinative Mn(II) coordinative compounds has been established, in specially $[Mn(CCl_3COO)_3(CN_3H_5)] \cdot 2H_2O$ could be mentioned (the value of activity is 6,5 times more than control). This biomass with the high activity of SOD can be used for antioxidants preparations obtaining.

Введение

В настоящее время существует множество факторов, действующих разрушающе на живые организмы, главным образом – из-за образования свободных радикалов. Особая роль в нейтрализации свободных радикалов принадлежит антиоксидантам, в том числе ферменту супероксиддисмутазе (SOD), осуществляющему рекомбинацию радикалов O_2^- с образованием перекиси водорода и триплетного кислорода [3]. SOD – металлоэнзим с субъединичной структурной организацией [1], являющийся важным регулятором окислительного обмена клетки [4].

Для нейтрализации отрицательного воздействия свободных радикалов в организме человека применяются как биодобавки, так и антиоксидантные препараты, источниками которых являются продукты растительного происхождения. Среди таких природных источников важная роль принадлежит микроводорослям и цианобактериям, в частности – спирулине. Поэтому разработка технологий получения новых антиоксидантных препаратов на основе спирулины является весьма актуальной.

По наличию ионов металлов, входящих в активный центр фермента, выделяют: Fe-SOD (характерен для прокариот), Mn-SOD (характерен для прокариот и митохондрий эукариот) и Cu/Zn-SOD (характерен для высших эукариот) [2]. Известно, что в цианобактерии *Spirulina platensis* содержатся две формы SOD: Fe-SOD и Mn-SOD. Применение антиоксидантной терапии с использованием данного фермента эффективно при многих воспалительных процессах [5]. Для лечения различных заболеваний уже применяются медицинские препараты, содержащие очищенный фермент SOD, такие как Orgotein (США), Регоxinorm (Германия), Еригох (Румыния) [6].

Исследования, проведенные ранее сотрудниками лаборатории фотомикробиологии, подтвердили возможность использования некоторых металлокомплексов Fe(III) и других металлов в качестве стимуляторов синтеза биологически активных веществ в биомассе цианобактерий и микроводорослей, в том числе и SOD у спирулины [7-9]. Поскольку в активном центре SOD кроме железа присутствует и марганец, представляло интерес исследование перспективы использования координационных соединений Mn(II) для получения биомассы цианобактерии *Spirulina platensis*, обогащенной ферментом супероксиддисмутазой (SOD).

Материалы и методы

Объектом исследования является культура цианобактерии *Spirulina platensis* (NORDST.) Geitl.CALU-835, хранящейся в Национальной коллекции микроорганизмов Института микробиологии Академии

наук Молдовы. Для культивирования была использована питательная среда Zarrouk с определенным соотношением макро- и микроэлементов для нормального роста и развития культуры [10].

Культивирование проводилось в колбах Эрленмейера с объемом суспензии спирулины в питательной среде 100 мл в течение 144 часов при температуре 30⁰ С. На третий день культивирования к суспензии спирулины добавляли одно из координационных соединений Mn(II), имеющих в качестве лигандов трихлорацетат и имидазол, монохлорацетат и имидазол, а также трихлорацетат и гуанидин: LMn₁- [Mn(CCl₃COO)₃(C₃N₂H₄)]·2H₂O, LMn₂-[Mn(CH₂ClCOO)₂(C₃N₂H₅)₂]·4H₂O и LMn₃ - [Mn(CCl₃COO)₃(CN₃H₅)]·2H₂O.

Продуктивность определялась согласно методу, описанному в [10].

Активность супероксиддисмутазы устанавливалась согласно методу Winterbourn [11].

Результаты и обсуждение

Активность SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis*, культивированной в присутствии координационных соединений марганца [Mn(CCl₃COO)₃(C₃N₂H₄)]·2H₂O, [Mn(CH₂ClCOO)₂(C₃N₂H₅)₂]·4H₂O и [Mn(CCl₃COO)₃(CN₃H₅)]·2H₂O, отражена на диаграммах 1-4.

Использование соединения LMn₁ в концентрациях 5-35 мг/л, добавленного на 3-й день культивирования спирулины, приводило к увеличению активности SOD в 3,3-4 раза по сравнению с контролем (диаграмма 1). Дальнейшее увеличение концентрации LMn₁ резко сокращало активность SOD, но значения все же превышали её активность в контрольной пробе.

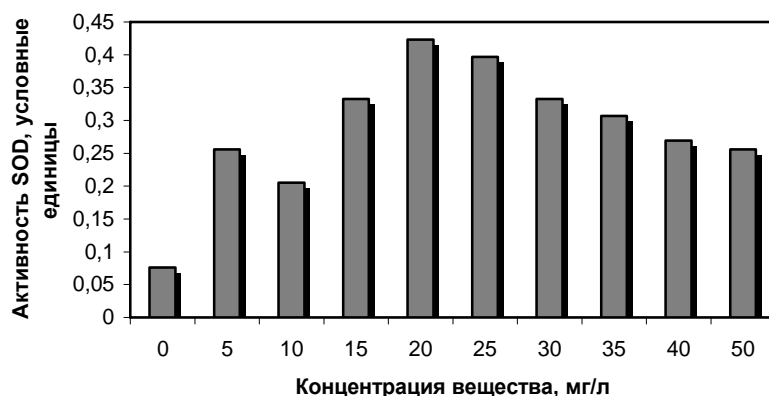


Диаграмма 1. Активность SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis*, культивированной в присутствии LMn₁.

Использование соединения LMn₂ в тех же пределах концентраций, что и LMn₁, существенно увеличивало активность SOD (в 5,4-5,8 раза по сравнению с контролем, диаграмма 2). Дальнейшее увеличение концентрации соединения LMn₂ также вело к уменьшению активности SOD.

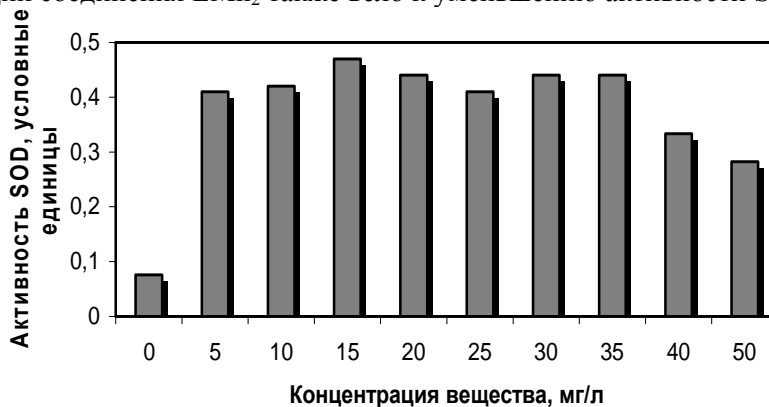


Диаграмма 2. Активность SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis*, культивированной в присутствии LMn₂.

Максимальное увеличение активности SOD в 6,3 раза по сравнению с контролем (диаграмма 3) отмечено при использовании соединения LMn_3 в концентрациях 20-30 мг/л.

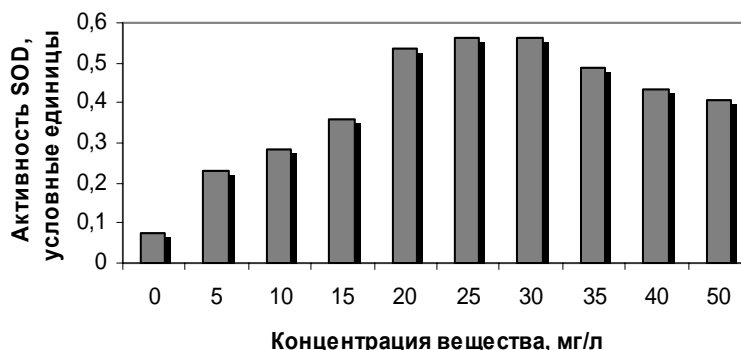


Диаграмма 3. Активность SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis*, культивированной в присутствии LMn_3 .

Сравнительный анализ изменения активности SOD в зависимости от концентрации трех комплексных соединений Mn(II): LMn_1 - $[Mn(CCl_3COO)_3(C_3N_2H_4)] \cdot 2H_2O$, LMn_2 - $Mn(CH_2ClCOO)_2(C_3N_2H_5)_2 \cdot 4H_2O$ и LMn_3 - $[Mn(CCl_3COO)_3(CN_3H_5)] \cdot 2H_2O$, представлен на диаграмме 4. Можно отметить, что все три соединения оказывали положительное влияние на возрастание активности супероксиддисмутазы в биомассе спирулины, однако соединение LMn_3 (30 мг/л) оказалось наиболее эффективным, так как активность SOD увеличивалась в 6,3 раза по сравнению с контролем.

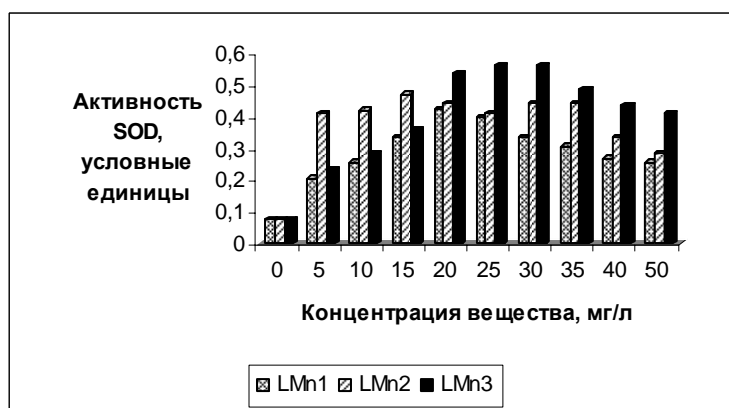


Диаграмма 4. Сравнительный анализ изменения активности SOD в зависимости от концентрации трех комплексных соединений Mn(II).

Различный эффект, оказываемый данными соединениями на активность SOD, можно объяснить различной природой лигандов LMn_1 -трихлорацетат и имидазол, LMn_2 -монохлорацетат и имидазол, LMn_3 -трихлорацетат и гуанидин. Имидазол участвует в биосинтезе незаменимой аминокислоты гистидина, гуанидин – физиологически активное вещество, входит в состав аминокислоты аргинина. Известно, что аргинин входит в состав активного центра большинства Fe/Mn-SOD [12]. Согласно проведенным нами исследованиям по определению функции Arg 180 в структуре активного центра, установлена его структурная и каталитическая роль в активном центре фермента [13]. Установлено также, что аргинин способствует поддержанию третичной структуры белка. Положительное влияние координационных соединений Mn(II) на активность SOD объясняется, возможно, и тем, что марганец входит в состав активного центра фермента Mn-SOD.

Сочетание марганца с такими лигандами, как монохлорацетат и имидазол, а также трихлорацетат и гуанидин, способствует наибольшему увеличению активности SOD в биомассе спирулины, в то время как соединение марганца, содержащее в качестве лигандов трихлорацетат и имидазол, оказывает хотя и положительный, но меньший эффект на активность SOD.

Выводы

◆ Сравнительный анализ влияния некоторых комплексных соединений марганца завершился выявлением стимулирующего эффекта на активность SOD в биомассе цианобактерии *Spirulina platensis* с уменьшением этого эффекта в ряду $LMn_3 < LMn_2 < LMn_1$.

◆ Активность SOD зависит от природы лигандов координационных соединений Mn(II). Сочетание марганца с такими лигандами, как монохлорацетат и имидазол, а также трихлорацетат и гуанидин, способствует наибольшему увеличению активности SOD в биомассе спирулины (5,8 и 6,3 раза соответственно), в то время как соединение марганца, содержащее в качестве лигандов трихлорацетат и имидазол, оказывает хотя и положительный, но меньший эффект на активность SOD.

Литература:

1. Fridovich I. In Superoxid radical and superoxide dismutase // Approach. New-York, e.a., 1981, p.250-272.
2. Lumsden J. and Hall D.O. In Soluble Membrane-bound Superoxide Dismutases in a Blue-green alga (*Spirulina*) and Spinach / Biochem. And biophys. Research comm., vol.58, 1974.
3. Ruth Grene Asher, N. Ertrurk, L.S.Heath. Role of superoxidismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plants // Journal of Experimental Botany. - 2002. - Vol.53. - No.372. -P.1331-1341.
4. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. Глава 15. - Москва: Издательство МГУ, 1992.
5. Поберезкина Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Украинский биохимический журнал. - 1989. - Т.61. - №2. - С.14-22.
6. Wynterbourne C.C., / Archiv. Biochem. Biophys., 209, 106, 1987.
7. Краеван Н.И., Воробьева Л.И. Внутриклеточная локализация, выделение и характеристика СОД из *Propioniacterium globosum* // Прикладная биология и микробиол. - 1981. - Т.17. - Вып.6. - С.873.
8. 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. Nr.8. P.34. 2006.
9. 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. Nr.8. P.35. 2006.
10. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. - Chișinău: Știința, 1973, p.25-26.
11. Cojocaru D.C. Enzimologie practică. - Chișinău, 1998.
12. Douglass M. Chemical Modification of Arginine at the Active Site of the Bovine // American Chemical Society. - Vol.18. - No.26. - 1999. - P.5909-5912.
13. Borders C.L., John A., Broadwater J.R. // A structural role for arginine in proteins, Protein Science. - Cambridge University Press, 1994, p.541-548.

Prezentat la 18.01.2007