

УДК: 573.6.086:582.232.2

**Н.В. ЕФРЕМОВА¹, В.П. БУЛЬМАГА², В.А. РЕВА², В.Ф. РУДИК¹, Т.В. КИРИЯК¹,
А.П. ГУЛЯ², Л.С. ЗОСИМ², Д.И. ЕЛЕНЧУК¹, С.В. ДЖУР², Ч.М. БИВОЛ²**

¹Ин-т микробиологии и биотехнологии АН Респ. Молдова,
ул. Академическая, 1, MD 2009 Кишинэу, Молдова

²Гос. университет Респ. Молдова
ул. Матеевича, 60, MD 2009 Кишинэу, Молдова

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ НА
СОДЕРЖАНИЕ ФИКОЦИАНИНА И АКТИВНОСТЬ
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В БИОМАССЕ
SPIRULINA PLATENSIS (NORDST.) GEITLER (*CYANOPHYTA*)**

Изучено влияние некоторых металлокомплексов Mn (II) и Zn (II) на содержание фикоцианина и активность супероксиддисмутазы в биомассе синезеленой водоросли *Spirulina platensis*. Предложены два способа получения биомассы спирулины с повышенным содержанием антиоксидантов белковой природы. В результате SDS-электрофореза в полиакриламидном геле был установлен биохимический состав белковых экстрактов “SP-SOD/Phycos-1” и “SP-SOD/Phycos-2”, включающий водорастворимый пигмент фикоцианин и фермент супероксиддисмутаза. Проведенные исследования подтверждают возможность использования *S. platensis* в качестве биотехнологического объекта для получения антиоксидантов белковой природы.

Ключевые слова: фикобиотехнология, *Spirulina platensis*, фикоцианин, супероксиддисмутаза, металлокомплексы.

Введение

Интенсивное развитие биотехнологии привлекло внимание исследователей к некоторым классам организмов, включающим синезеленые водоросли, которые служат источником ряда биологически активных веществ, в т.ч. антиоксидантов (Blinkova, 2001; Aboul-Enein, 2003). Роль антиоксидантов состоит в нейтрализации негативного воздействия свободных радикалов на живые организмы (McCord, 2000).

В случае нарушения баланса между процессом образования свободных радикалов и системой антиоксидантной защиты в клетках возникает окислительный стресс, который приводит к различным нарушениям в работе организма, включая воспалительные процессы в печени и почках, диабет, болезнь Альцгеймера и другие нейровегетативные расстройства, а также онкозаболевания и др. (Parthasarathy, 2001; Junqueira et al., 2004). Окислительный стресс может быть причиной развития тяжело поддающихся диагностике и лечению дерматологических заболеваний

© Н.В. Ефремова, В.П. Бульмага, В.А. Рева, В.Ф. Рудик, Т.В. Кирияк, А.П. Гуля, Л.С. Зосим, Д.И. Еленчук, С.В. Джур, Ч.М. Бивол, 2012

кожи, сопровождающихся проявлением аллергических реакций (атопический дерматит, экзема и др.) (Перехрестенко, 2000; Сергеев и др., 2001).

Spirulina platensis является источником ряда биоактивных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами. Для многих исследователей особый интерес представляют антиоксиданты белковой природы (как, например, водорастворимый пигмент фикоцианин; энзимы: супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза и др.) (Roday, 2003; Flora, 2007).

Супероксиддисмутаза (СОД) представляет собой металлоэнзим, играющий важную роль в регуляции окислительного обмена клетки и активирующийся при увеличении выработки супероксид радикалов (Bowler, 1992). Антиоксидантная терапия с использованием супероксиддисмутазы эффективна при местных воспалительных процессах, а также при хронических циститах и остеоартритах (Kinnula, Crapo, 2003; Comhair, 2005). Известно, что СОД является мощным радиопротектором клетки и может применяться в качестве средства, предупреждающего развитие онкозаболеваний (Scott, 1989; Lefaix, 1996).

Результаты исследования антиоксидантной активности фикоцианина показали, что данный водорастворимый пигмент спирулины способен разрушать пероксинитрит, гидроксил- и пероксилрадикалы, а также подавлять процессы перекисного окисления липидов (Bhat et al., 2001). Установлено, что фикоцианин обладает сильными противовоспалительными, иммуностимулирующими, антиканцерогенными и антиоксидантными свойствами (Bhat, Madyastha, 2000; Roday, 2003). Кроме того, он имеет низкую токсичность и может использоваться для лечения и профилактики многих заболеваний (Soundarapandian, 2008).

Белковый экстракт спирулины способен подавлять перекисное окисление липидов и образование гидроксил- и пероксилрадикалов (Herrero, 2004). Антиоксидантные препараты на основе биоактивных веществ спирулины могут применяться в косметологии в качестве средств, замедляющих процессы старения кожи за счет регуляции процессов синтеза коллагена и эластина, а также способствующих заживлению ран и ожогов, разглаживанию морщин и рубцовой ткани (Dal Farra et al., 2008).

Целью данной работы было изучение влияния некоторых металлокомплексов Mn (II) и Zn (II) на содержание фикоцианина и активность супероксиддисмутазы в биомассе *S. platensis*.

Материалы и методы

Объектом исследования была культура *S. platensis* CNM-СВ-02, хранящаяся в Национальной коллекции микроорганизмов Ин-та микробиологии и биотехнологии АН РМ. Для культивирования использовали питательную среду SP-1 с определенным соотношением макро- и микроэлементов для нормального роста и развития культуры (Rudic, Dencicov, 1991).

Культивирование проводили при температуре 30–35 °С, pH 8,5–10, освещении 2000–3000 люкс. На 7-й день культивирования биомассу спирулины отделяли от культуральной жидкости и деминерализовали от избытка солей с помощью 1,5 %-ного раствора ацетата аммония. Содержание фикоцианина и активность СОД определяли в экстрактах, полученных из биомассы спирулины, подвергшейся предварительно повторному замораживанию-оттаиванию.

Активность супероксиддисмутазы устанавливали спектрофотометрическим методом, основанном на реакции восстановления реактива нитросиний тетразолий в присутствии тетраметиленамина и рибофлавина (Bulimaga et al., 2008).

Содержание фикоцианина определяли спектрофотометрическим методом (Bryant et al., 1979), содержание белка – по методу Lowry (1951).

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS был проведен по методу, описанному в литературе (Laemmli, 1970; Reva et al., 2001). Рабочий гель (7 %) полимеризовали в *трис*-HCl буфере с добавлением SDS, pH 8,8, а формирующий гель – в *трис*-HCl буфере, pH 6,8. Анализируемые белки растворяли в буфере, состоящем из *трис*-HCl, 1 % β-меркаптоэтанола, 10 % глицерина, 0,001 % бромфенолового синего и наносили на гель в одинаковых концентрациях (20 мкг/л образца).

Результаты и обсуждение

Нам предстояло разработать способы получения антиоксидантных препаратов из биомассы спирулины, содержащих одновременно два белковых компонента (фикоцианин и супероксиддисмутазу), отличающихся по механизму антиоксидантного действия. В качестве регуляторов биосинтетической активности спирулины были использованы комплексные соединения некоторых переходных металлов: Fe (III), Mn (II), Zn (II), Co (II), содержащие в качестве лигандов остатки органических кислот и имидазол. Результаты проведенных ранее исследований позволили выделить два металлокомплекса: $[\text{Mn}(\text{COO}(\text{CHON})_2\text{COO})(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (лиганды: остаток винной кислоты и имидазол) и $[\text{Zn}(\text{COO}(\text{CH}_2)_4\text{COO})_2(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (остаток адипиновой кислоты и имидазол), способствующих наибольшему росту активности СОД и содержания фикоцианина в биомассе. Согласно литературным данным, содержание фикоцианина и активность супероксиддисмутазы возрастает в условиях окислительного стресса (Flora, 2007). Исследуемые координационные соединения Mn (II) и Zn (II) добавляли к культивируемой среде в пределах расширенного спектра концентраций 10–50 мг/л. Металлокомплексы вносились на третий день культивирования спирулины. Результаты влияния комплексов марганца и цинка с остатками дикарбоксильных кислот и имидазолом на содержание фикоцианина и активность супероксиддисмутазы представлены в таблице.

На основе полученных данных были предложены два способа получения биомассы спирулины с повышенным содержанием антиоксидантов белковой природы (СОД и фикоцианина) в биомассе (рис. 1). Эти способы основаны на том, что к основной среде культивирования

Spirulina platensis на третий день дополнительно добавляется комплексное соединение марганца – $[\text{Mn}(\text{COO}(\text{CHOH})_2\text{COO})(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ либо цинка – $[\text{Zn}(\text{COO}(\text{CH}_2)_4\text{COO})_2(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 20 мг/л.

Таблица

Содержание фиколипидов и активность СОД в биомассе спирулины, культивируемой в присутствии некоторых металлокомплексов Mn (II) и Zn (II)

Металлокомплекс	C, мг/л	Содержание фикоцианина, % АСБ	%К	Активность СОД, усл. ед.	%К
$[\text{Mn}(\text{COO}(\text{CHOH})_2\text{COO})(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	10	7,97±0,11*	148,41	53±1,10*	220,83
	20	9,08±0,04**	169,08	63±1,16*	262,50
	30	7,69±0,16*	143,20	56±1,10*	233,33
	40	7,21±0,23*	134,26	43±1,80*	179,16
	50	6,21±0,16*	115,64	37±1,85*	154,16
$[\text{Zn}(\text{COO}(\text{CH}_2)_4\text{COO})_2(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$	10	10,72±0,06**	199,54	38±1,25*	158,33
	20	13,01±0,18*	242,23	53±1,33*	220,08
	30	11,43±0,18*	212,77	42±1,16*	175,00
	40	9,03±0,13*	168,23	34±1,60*	141,66
	50	8,34±0,03**	155,32	19±0,85*	79,16
Контроль	0	5,37±0,07*	100,00	24±1,00*	100,00

* – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$.

В результате применения предложенных способов увеличивается содержание фикоцианина в 1,7 раза и 2,42 раза (9,08 и 13,01 % АСБ), а также активность СОД в биомассе спирулины в 2,52 раза и 2,2 раза (63 и 53 усл. ед. активности) соответственно, по сравнению с биомассой, культивируемой без внесения координационных соединений марганца или цинка.

В дальнейшем был разработан способ выделения супероксиддисмутазы и фикоцианина из биомассы *S. platensis*, включающий следующие этапы:

- отделение биомассы спирулины от культуральной жидкости;
- разрушение клеток путем повторного замораживания - оттаивания;
- экстракция белковой фракции, содержащей СОД и фикоцианин;
- изоэлектрическое осаждение;
- отделение надосадочной жидкости, содержащей антиоксиданты белковой природы (СОД и фикоцианин);
 - концентрирование и замораживание белковых экстрактов:
 - “SP - SOD/Phycocyanin - 1” (полученного с применением комплекса $[\text{Mn}(\text{COO}(\text{CHOH})_2\text{COO})(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$);
 - “SP - SOD/Phycocyanin - 2” (полученного с применением комплекса $[\text{Zn}(\text{COO}(\text{CH}_2)_4\text{COO})_2(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot n\text{H}_2\text{O}$).

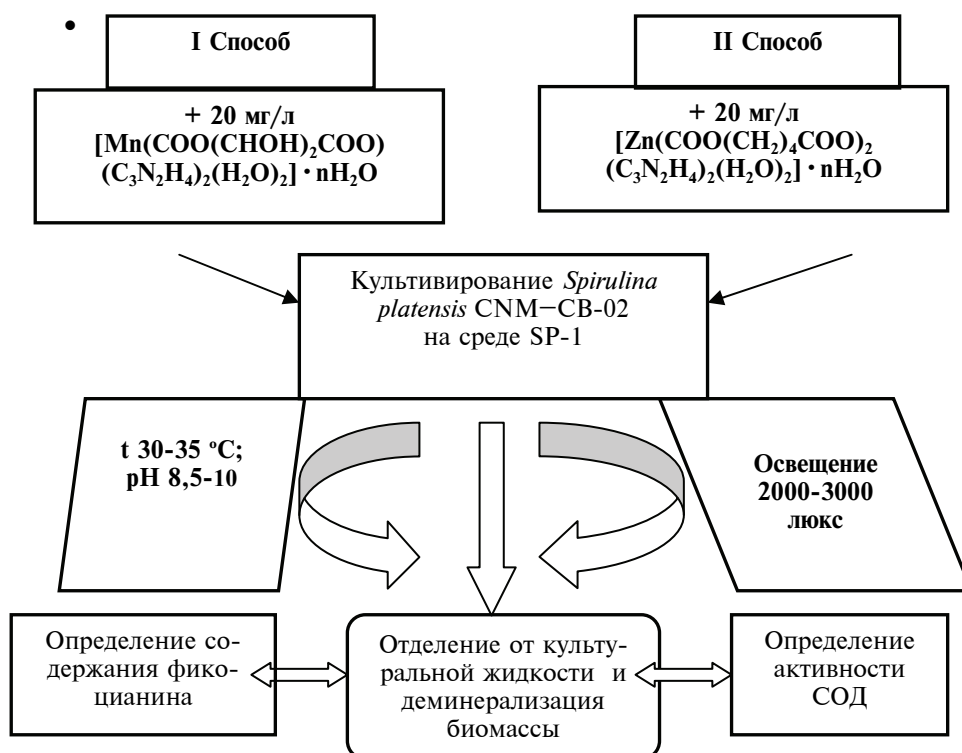


Рис. 1. Способы получения биомассы спирулины с повышенным содержанием фикоцианина и СОД

Для изучения состава белковых экстрактов был проведен электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS (рис. 2). Молекулярная масса α - и β -субъединиц фикоцианина составляла 18 и 19,95 кДа, соответственно. Полученные нами данные согласуются с литературными, согласно которым молекулярная масса субъединиц фикоцианина, выделенного из биомассы спирулины, составляет 19,5 и 21,5 кДа (Minkova et al., 2003). По данным других исследователей, в результате SDS-электрофореза были выявлены две белковые зоны, соответствующие субъединицам исследуемого пигмента, из биомассы спирулины, молекулярная масса которых составляла 18 и 21 кДа (Niu, 2007).

Имеются данные о том, что СОД, выделенный из биомассы *Cyano-prokaryota*, является гомодимером (Regelsberger et al., 2004; Desai, Sivakami, 2007). По результатам проведенного в присутствии SDS электрофореза (см. рис. 2), молекулярная масса субъединицы супероксид-дисмутазы составляет 28 кДа.

Полученный из биомассы спирулины образец был дополнительно исследован на действие ингибиторов для определения типа энзима. Для определения типа СОД используют разные ингибиторы. Cu/ZnСОД ингибируется при помощи KCN, в то время как FeСОД и MnСОД не чувствительны к цианиду. Перекись водорода применяется для определения различия FeСОД от MnСОД (Hammouda, 1999).

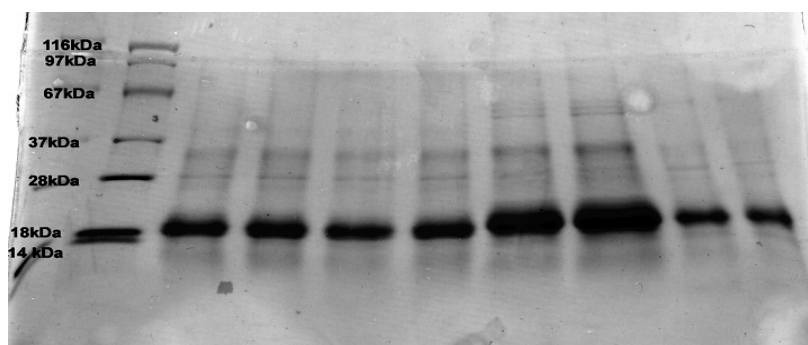


Рис. 2. Электрофореграмма белковых экстрактов, выделенных из спирулины. 1 – белковые маркеры; 2–5 – образец экстракта “SP-SOD/Phycocyanin-1”(4 повторности); 6, 7 – образец экстракта “SP-SOD/Phycocyanin-2”(2 повторности); 8, 9 – образец контрольной пробы (2 повторности).

Результаты исследования действия различных ингибиторов (10 мМ H_2O_2 , 30 мМ NaN_3 и 50 мМ KCN) на полученный частично очищенный препарат СОД представлены ниже:

Ингибиторы	Активность СОД
50 мМ KCN	+
10 мМ H_2O_2	–
30 мМ NaN_3	–

При добавлении к образцу 50 мМ KCN активность СОД полностью сохранялась, тогда как при использовании 10 мМ H_2O_2 и 30 мМ NaN_3 наблюдалось полное ингибирование активности супероксиддисмутазы. Таким образом, можно сделать вывод, что в биомассе *S. platensis* содержится железосодержащая форма исследуемого энзима (FeСОД), поскольку MnСОД не ингибируется в присутствии H_2O_2 .

Заключение

Разработан способ выделения супероксиддисмутазы и фикоцианина из биомассы синезеленой водоросли *Spirulina platensis*. Установлено, что основными компонентами белковых экстрактов, выделенных из спирулины, являются супероксиддисмутаза и фикоцианин. Состав белковых экстрактов “SP-SOD/Phycocyanin-1” и “SP-SOD/Phycocyanin-2” подтверждается методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS, в ходе которого были установлены молекулярные массы субъединиц супероксиддисмутазы (28 кДа) и фикоцианина (18 и 19,95 кДа). Выделенные нами белковые экстракты на основе СОД и фикоцианина могут быть использованы для разработки новых антиоксидантных медицинских препаратов, лечения и профилактики развития кожных заболеваний аллергической природы, сопровождающихся нарушениями деятельности иммунной системы (атопический дерматит, экзема, псориаз), а также в косметологии.

- Перехрестенко А. Иммунопатогенез псориазической болезни // Лікар. справи. – Киев, 2000. – № 5. – С. 10–14.
- Сергеев Ю. и др. Атопический дерматит: современная диагностика и лечение // Иммунопатология. – 2001. – № 4. – С. 28–48.
- Aboul-Enein A. et al. Antioxidant activity of algal extracts on lipid peroxidation // J. Med. Sci. – 2003. – 3, N 1. – P. 87–98.
- Bhat V., Madyastha K.M. C - Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro // Biochem. Res. Comm. – 2000. – N 1. – P. 20–25.
- Bhat V., Madyastha K. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* // Biochem. Biophys. Comm. – 2001. – N 2. – P. 262–266.
- Blinkova L. et al. Biological activity of *Spirulina* // J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. – 2001. – N 2. – P.114–118.
- Bowler C. et al. Superoxide dismutase and stress tolerance // Amer. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1992. – N 43. – P. 83–116.
- Bryant D. A. et al. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model // Arch. Microbiol. – 1979. – P. 113–127.
- Bulimaga V., Efremova N., Dencicov L. Metodă de determinare a activității superoxid-dismutazei // Brevet de invenție 3752 G2, MD, C12N9/02, BOPI N. 11/2008.
- Comhair S. et al. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity // Amer. J. Pathol. – 2005. – N 166. – P. 663–674.
- Dal Farra C., Antipois S., Imbert I. Protection of the skin from glycation stress with a new antioxidant dimmer peptide // J. Acad. Derm. – 2008. – N 2. – P. 20.
- Desai K., Sivakami S. Purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from the soluble fraction of the cyanobacterium *Spirulina platensis* // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 23, N 11. – P. 1661–1666.
- Flora S. Role of free radicals and antioxidants in health and disease // Cell Mol. Biol. – 2007. – 53, N 1. – P.1–2.
- Hammouda O. Purification and Identification of the type of superoxide dismutase from *Gloeocapsa* sp. // Folia Microbiol. – 1999. – 44, N 1. – P. 32–36.
- Herrero M. et al. Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography // J. Chromatogr. – 2004. – N 2. – P. 195–203.
- Junqueira V., Barros S., Sandra S. Aging and oxidative stress // Mol. Aspects Med. – 2004. – 25, N 1-2. – P. 5–16.
- Kinnula V., Crapo J. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases // Res. Crit. Care Med. – 2003. – N 167. – P. 1600–1619.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227, N 5259. – P. 680–685.
- Lefaix J-L. et al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD // Intern. J. Radiat. Oncol. – 1996. – N 2. – P. 305–312.
- Lowry O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Biol Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265–275.
- McCord J. The evolution of free radicals and oxidative stress // Amer. J. Med. – 2000. – 108, N 8. – P. 652–659.
- Minkova K. et al. Purification of C – phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) Fusiformis* // J. Biotechnol. – 2003. – 102, N 1. – P. 55–59.

- NIU Jian-Feng *et al.* Large-scale recovery of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography // J. Chromatogr. – 2007. – **850**, N 1. – P. 267–276.
- Parthasarathy S. Oxidative stress in cardiovascular disease // J. Nuclear Cardiol. – 2001. – **8**, N 3. – P. 379–389.
- Regelsberger G. *et al.* The iron superoxide dismutase from the filamentous cyanobacterium Nostoc PCC 7120 // J. Biol. Chem. – 2004. – N 43. – P. 44384–44393.
- Reva V., Ciobanu V., Mueller-Uri F. Strategia și tactica izolării și purificării proteinelor // Chișinău. – 2001. – **186**. – P. 30.
- Romay C., Gonzalez R., Ledon N. *et al.* C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects // Protein and Peptide Sci. – 2003. – N 3. – P. 207–216.
- Rudic V., Dencicov L. Optimizarea mediului nutritiv pentru cultivarea spirulinei // Anale Șt. USM. – 1991. – **37**. – P. 91–94.
- Scott M. Superoxide dismutase amplifies organism sensitivity to ionizing radiation // J. Biol. Chem. – 1989. – **264**, N 5. – P. 2498–2501.
- Soundarapandian S. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization // J. Appl. Phycol. – 2008. – N 3. – P. 113–136.

Получена 09.08.10

Рекомендовал к печати А.И. Божков

N.V. Efreмова, V.P. Bulimaga, V.A. Reva, V.F. Rudic,
T.V. Chiriac, A.P. Gulea, L.S. Zosim, D.I. Elenciuc, S.V. Djur, C.M. Bivol

Institute of Microbiology and Biotechnology, AS Resp. Moldova
1, Academy St., 2009 Chishinau, Moldova
State University of Moldova,
60, Mateevici St., 2009 Chishinau, Moldova

THE INFLUENCE OF SOME METALLOCOMPLEXES ON PHYCOCYANIN
CONTENT AND SUPEROXIDDISMUTASE ACTIVITY IN THE BIOMASS
OF *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST.) GEITL. (*CYANOPHYTA*)

The influence of some metallocomplexes of Mn (II) и Zn (II) on phycocyanin content and superoxididismutase activity in the biomass of blue-green algae *Spirulina platensis* has been investigated and new procedures of obtaining of spirulina biomass with high content of anti-oxidants of protein nature have been elaborated. As a result of the SDS-PAGE electrophoresis the biochemical composition of obtained protein extracts “SP-SOD/Phyco-1” and “SP-SOD/Phyco-2”, including the water-soluble pigment – phycocyanin and the enzyme – superoxididismutase (SOD), has been established. This investigation demonstrates the possibility of utilization of *S. platensis* as biotechnological object for the obtaining of antioxidants of protein nature.

Key words: phycobiotechnology, *Spirulina platensis*, phycocyanin, superoxididismutase, metallocomplexes.