

ДЕЙСТВИЕ ЦИНКА НА АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ И КАТАЛАЗЫ У *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST) GEITL.

Изучали влияние двухвалентного цинка на активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы у одноклеточной синезеленой водоросли *Spirulina platensis*. Двухвалентный цинк в концентрациях 0,09 - 9,0 мг/л угнетающе действовал на активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы у спироулины. Зависимость активности каталазы и супероксиддисмутазы от концентрации цинка выражалась формулой $y=a/(1+bx)$, где $a=0,52$ и $b=5,28$ для каталазы и $a=0,49$ и $b=4,79$ для супероксиддисмутазы, что подтверждает факт согласованности действия данных энзимов.

В настоящее время спироулина *Spirulina platensis* широко применяется в качестве пищевой добавки, содержащей биологически ценные вещества. Особенно важны работы по обогащению спироулины микроэлементами, необходимыми для нормального функционирования человека. Изучение действия и накопления цинка является актуальным, так как суточная потребность организма человека в цинке довольно значительна – 15 - 20 мкг/кг веса [4]. В связи с этим, с одной стороны, было интересно выявить возможность обогащения культуры спироулины цинком в наиболее легко усваиваемой органической форме, а с другой - исследовать действие цинка на антиоксидантную ферментную систему, которая активируется в организме при любых стрессах, особенно токсических [12]. Известно, что многоклеточные водоросли испытывают токсический стресс при концентрации цинка 2-5 мг/л [5, 11].

Целью настоящей работы было изучение влияния двухвалентного цинка на активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы у одноклеточной синезеленой водоросли *Spirulina platensis* и возможность ее обогащения цинком.

Материал и методы. Объектом исследования служил штамм синезеленой водоросли *Spirulina platensis* (Nordst) Geitl. из коллекции ИнБЮМ НАНУ. Водоросли культивировали в стеклянных литровых сосудах при температуре 32°C и освещении 12000 лкс на среде Заррука [13], в которые вносили различные концентрации Zn^{2+} в виде сульфата: 0 (контроль); 0,09; 0,18; 0,45; 0,9; 9,0 мг/л. Прирост биомассы контролировали по увеличению оптической плотности суспензии при 750 нм на фотоэлектроколориметре КФК-2 в кюветах с рабочей длиной 5 мм. Содержание сухой биомассы в литре суспензии (г/л) (в интервале от 0,13 до 1,24 ед. опт. плотности) рассчитывали по уравнению $y = 0,73D_{750} + 0,08$. [3]. Культуру в конце экспоненциальной фазы роста отмывали проточной водой и сгущали до состояния пасты, в которой и определяли концентрацию цинка, растворимого белка по методу [7] и активность исследуемых ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы – по способности ингибировать восстановление нитросинего тетразолия [8], каталазы – по количеству разложившейся перекиси водорода [2]. Концентрацию цинка в спироулине выражали в мкг/г сухого веса водоросли, концентрацию белка – в мг/мл, активность супероксиддисмутазы – в мМ НАДН/(мг белка*мин), каталазы – в мг H_2O_2 /(мг белка*мин). Отбор проб осуществляли трижды, количество параллельных проб – от 4 до 6. Всего проведено 216 измерений. Разброс данных представлен стандартным отклонением, коэффициент корреляции рассчитан стандартным методом.

Результаты и обсуждение. Для достижения цели работы необходимо было выявить завершение экспоненциальной стадии роста культуры спироулины. На рис. 1 представлено влияние различных концентраций цинка на рост накопительной культуры. Из него видно, что нарастание биомассы практически закончилось на 15-е сутки. Это означает, что существенного влияния на рост спироулины цинк не оказывал. Следует отметить, что во всех экспериментальных сосудах водоросли были живыми и жизнеспособными. Однако, как отмечают некоторые авторы [6], действие концентраций цинка 10 -

15 мг/л, которые продолжают ряд использованных нами концентраций, уже вызывает торможение роста одноклеточных водорослей.



Рисунок 1. Кривые роста *Spirulina platensis* при действии различных концентраций цинка
Figure 1. Zincum effect on *Spirulina platensis* growth

Концентрации цинка: ○ - 0,0 мг/л; ● - 0,09 мг/л; △ - 0,18 мг/л; ▲ - 0,4 мг/л; ◇ - 0,9 мг/л; ◆ - 9,0 мг/л

В табл.1 представлены величины показателей, определяемых в спирулине в конце экспоненциальной фазы роста для каждой концентрации цинка. В эксперименте по действию различных концентраций цинка на спирулину было важно выявить коррелятивные связи между исследуемыми показателями. Коэффициент корреляции между концентрациями цинка в среде и в спирулине был высоким ($r=0,97$), что свидетельствует о максимальном накоплении цинка спирулиной при максимальной концентрации его в среде. Содержание цинка в клетках спирулины было наибольшим при действии концентрации 9 мг/л и составляло 253, 52 мкг/г сухого вещества.

Таблица. Значения биомассы, концентрация растворимого белка, содержание цинка и активность супероксиддисмутазы и каталазы при действии цинка на спирулину
Table. Effect of zincum on *Spirulina platensis* biomass, zincum concentration, soluble protein content and superoxiddismutase and katalase activity

Цинк в среде, мг/л	Цинк в спирулине, мкг/г	Биомасса, г/л	Активность супероксиддисмутазы	Активность каталазы	белок мг/мл
0	74,02	0,93±0,15	0,504±0,057	0,502±0,051	3,19±0,053
0.09	67,69	1,02±0,09	0,338±0,0224	0,357±0,056	2,88±0,204
0,18	84,46	1,27±0,23	0,196±0,009	0,330±0,07	2,98±0,041
0,45	42,99	1,46±0,19	0,214±0,035	0,104±0,025	2,67± 0,063
0,9	57,22	1,12±0,17	0,124±0,025	0,030±0,01	2,40±0,015
9,0	253,52	0,95±0,10	0,015±0,005	0±0	2,68±0,015

Высокие коэффициенты корреляции были найдены также между концентрацией растворимых белков и активностью каталазы ($r=0,81$) и супероксиддисмутазы ($r=0,65$).

Из таблицы видно, что двухвалентный цинк оказывал ингибирующее действие на изучаемые ферменты. Активность супероксиддисмутазы снижалась на 97% при концентрации 9 мг/л по сравнению с контролем. Активность каталазы при максимальной концентрации уменьшалась до минимальных значений. По данным Хосетти [6] активность ферментов каталазы, фосфатазы, протеазы у одноклеточной зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* при концентрации цинка 10 - 15 мг/л снижалась до минимальных значений. Мы получили минимальное значение для активности каталазы при дейст-

вии концентрации 9 мг/л. Известно, что цинк в одноклеточных водорослях связывается с белками посредством взаимодействия с тиоловыми группами [9,10]. Причиной обнаруженного снижения активности ферментов, вероятно, могут быть конформационные изменения в молекулах ферментов, вызванные образованием комплексов с цинком. Таким образом, действие исследуемых концентраций цинка дало возможность получить культуру спирулины, содержащую цинк в комплексе с белками, то есть в наиболее легко усваиваемой органической форме, что чрезвычайно важно для пищевой добавки, однако биологическая ценность её несколько уменьшается из-за снижения значений антиоксидантных ферментов, присутствие которых повышает ценность биологически активных веществ.

На рис.2 представлены зависимости активности исследуемых ферментов от концентрации цинка в среде, которые выражались формулой $y=a/(1+bx)$, где $a=0,52$ и $b=5,28$ для каталазы и $a=0,49$ и $b=4,79$ для супероксиддисмутазы, что указывает на согласованность действия исследуемых ферментов. Факт согласованности действия данных энзимов, известный в литературе [1], подтверждается также найденным высоким коэффициентом корреляции между активностью супероксиддисмутазы и каталазы в спирулине ($r=0,9$).

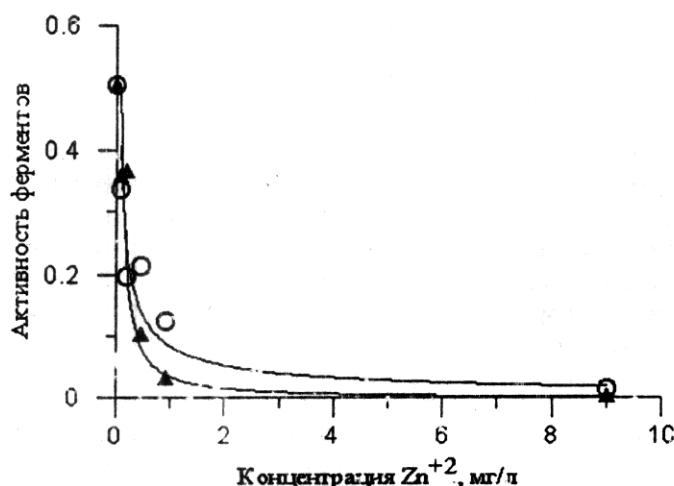


Рисунок 2. Зависимость активности супероксиддисмутазы и каталазы *Spirulina platensis* от концентрации цинка в среде

Figure 2. Dependence of superoxiddismutase and catalase activity of *Spirulina platensis* on Zn^{2+} concentration

○ - активность супероксиддисмутазы, мМ НАДН / (мг белка * мин)
 ▲ - активность каталазы, мг H_2O_2 / (мг белка * мин)

Заключение. При изучении действия различных концентраций двухвалентного цинка на одноклеточную синезеленую водоросль *Spirulina platensis* было установлено, что активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы ингибировалась, начиная с концентрации 0,09 мг/л. Обогащение спирулины цинком было максимальным при концентрации 9 мг/л и составляло 253,5 мкг/г сухого веса. Цинк в концентрациях до 9 мг/л не оказывал влияния на ростовые характеристики спирулины.

Автор выражает глубокую благодарность ст. н. с. АзЧерНиро Овчинниковой С. С. за проведение анализов по определению содержания цинка в пробах спирулины.

1. Барабой В. А. Перекисное окисление и радиацион. - Киев: Наук. думка. - 1992. - 251 с.
2. Береза Т. Т. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. - М.: Медицина, 1976. - С. 81 - 83.
3. Минюк Г. С., Тренкенш П. П., Алисиевич А. В. и др. Влияние селена на рост микроводоросли *Spirulina platensis* (Nords.) в накопительной и квазинепрерывной культурах // Экология моря. - 2000. - №54. - С. 42 - 50.
4. Полинг Л., Полинг П. Химия. - М.: Мир, 1982. - 585 с.
5. Filho G.M.A., Raren C.S., Andrade L.R. et al. Effects of growth and accumulation of zinc in six seaweeds species // Ecotoxicol. Environ. Saf. - 1997. - 37, N3. - P. 223 - 228.

6. Hosetti B. B., Shivaraj R. V., Patil H. S. Effect of zink on the treatment of domestic sewage by *Scenedesmus quadricauda* // Environ. Ecol. - 1999. - 8, №4. - P. 1220 - 1223.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Faar A. L., Randall R. J. Protein measurement with folin fenol reagent // J. of Biol. Chem. - 1951. - 193. - P. 265 - 275.
8. Nishikimi M., Rao N. A., Yagik K. The occurrence of superoxid anion in the reaction of reduced phenazine // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1972. - №46. - P. 849 - 854.
9. Poonguzhali T.V., Rao V.N.R. Response of alga to metal pollution // Phycos. - 1998. - 37, N 1. - 2. - P.19 - 28.
10. Tropin I.V. Taxonomic and ecological patterns of metal distribution in the thalli of marine algae (*Chlorophyta*) // Oceanologia. - 1996. - 36, N3. - P.424-430.
11. Vavilin D.V., Ducruet J.V., Matorin D.N., et al. Membrane lipid peroxidation, cell viability, and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions // J. Photochem. Photobiol. - 1998. - 42, N3. - P. 233 - 239.
12. Winstone G. W., Di-Giulio R. T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms // Aquat. Toxicol. - 1991. - 19, №2. - P. 137 - 161.
13. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la crossance et la photosynthese de *Spirulina maxima* // Ph. D. thesis. - Paris, 1966. - P. 138.

Институт биологии южных морей НАНУ,
г. Севастополь

Получено 20.03.2002

O. A. SHAKHMATOVA

EFFECT OF ZINCUM ON SUPEROXIDDISMUTASE AND KATALASE ACTIVITY OF *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST) GEITL.

Summary

Effect of zincum on the activity of *Spirulina platensis* superoxiddismutase and katalase has been investigated. The decrease of superoxiddismutase and katalase activity and soluble protein content has been shown. Superoxiddismutase activity was decreased from $0,504 \pm 0,057$ mM HADH/(mg protein*min) by the low concentrations of Zn to $0,015$ mM HADH/(mg protein*min) by the high concentrations of Zn, the catalase activity from $0,502 \pm 0,051$ mg H₂O₂/(mg protein*min) to 0,0 accordingly.