

**КОМПЛЕКСЫ КОБАЛЬТА (II, III) С ПРОИЗВОДНЫМИ
ДИТИОКАРБАМОВОЙ КИСЛОТЫ – ЭФФЕКТОРЫ
ПЕПТИДАЗЫ *Bacillus thuringiensis*
И α -L-РАМНОЗИДАЗЫ *Eupenicillium erubescens*
И *Cryptococcus albidus***

Л. Д. ВАРБАНЕЦ¹, Е. В. МАЦЕЛЮХ¹, И. И. СЕЙФУЛЛИНА²,
Н. В. ХИТРИЧ², Н. А. НИДЯЛКОВА¹, Е. В. ГУДЗЕНКО¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев;

²Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, Украина;
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Исследовали влияние комплексов кобальта (II, III) и дитиокарбамовой кислоты на активность пептидазы *Bacillus thuringiensis*, α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* и *Cryptococcus albidus*. Исследуемые комплексы на основании их состава и строения разделили на 6 групп: 1) тетрахлокобальтаты(II) 3,6-ди(R,R')-иминио-1,2,4,5-тетратиана – $(RR')_2Ditt[CoCl_4]$; 2) тетрабромкобальтаты(II) 3,6-ди(R,R')-иминио-1,2,4,5-тетратиана – $(RR')_2Ditt[CoBr_4]$; 3) изотиоцианаты тетра((R,R')-дитиокарбаматизотиоцианат)кобальта (II) – $[Co(RR'Ditc)_4](NCS)_2$; 4) дитиокарбаматы кобальта(II) – $[Co(S_2CNRR')_2]$; 5) дитиокарбаматы кобальта (III) – $[Co(S_2CNRR')_3]$; 6) молекулярные комплексы дитиокарбаматов кобальта (III) с йодом – $[Co(S_2CNRR')_3] \cdot 2I_2$. Все эти группы (1–6) объединяет наличие в их молекулах одного и того же комплексообразователя (кобальта) и фрагмента S_2CNRR' , а по заряду они различаются следующим образом: анионные (1–2), катионные (3) и нейтральные (4–6). Внутри каждой группы комплексов варьировали природу заместителей у атомов азота. Установлено, что соединения кобальта могут активировать или ингибировать энзиматическую активность в зависимости от состава, строения, заряда комплекса, координационного числа комплексообразователя, а также от энзима и штамма, его продуцирующего. Максимальный эффект достигался при активировании пептидаз *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 с эластазной и фибринолитической активностью. Так, для улучшения каталитических свойств пептидазы 1, в зависимости от вида проявляемой ею активности, можно рекомендовать следующие соединения кобальта: для эластазной – комплексы (1–4), содержащие у атомов азота короткие алифатические или алициклические заместители, повышающие активность в среднем на 17–100%; для фибринолитической – нейтральные комплексы (4–5), повышающие активность на 29–199%. Для повышения фибринолитической активности пептидазы 2 лучше использовать дибензил- или этилфенилдитиокарбаматы кобальта (III), которые приводят к увеличению активности на 15–40% по сравнению с контролем. Эти же комплексы, а также соединение $\{(CH_2)_6\}_2Ditt[CoCl_4]$ активируют α -L-рамнозидазу *C. albidus* на 10–20%.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, *Eupenicillium erubescens*, *Cryptococcus albidus*, комплексы кобальта (II, III), производные дитиокарбамовой кислоты, пептидаза с эластазной и фибринолитической активностью, α -L-рамнозидаза.

В настоящее время возрос интерес к использованию высокоэффективных энзимных препаратов, обладающих полезными свойствами для применения в пищевой, фармацевтической, химической промышленности, а также в медицине. При этом особое внимание исследователей привлекают пептидазы,

действие которых направлено на ускорение гидролиза пептидных связей в протеинах и пептидах. Важной их особенностью является высокая каталитическая активность, селективный характер действия по отношению к субстратам и способность ускорять определенные химические реакции без образования побочных продуктов.

Исследования протеаз имеют значение как в теоретическом аспекте – для понимания структуры протеинов и пептидов, механизма ферментативного катализа, так и в практическом: они характеризуются высокой некротической активностью, при этом не влияют на здоровые ткани, лизируют вязкие гнойные экссудаты, проявляют тромболитическое и противовоспалительное действие.

На сегодня известен ряд продуцентов протеаз различного происхождения. Но наиболее перспективными для широкого использования являются микроорганизмы, которые способны быстро размножаться и осуществлять синтез биологически активных веществ в контролируемых условиях [1]. Большие возможности их использования открываются благодаря селективному отбору и искусственному мутагенезу продуцентов для направленного синтеза. Кроме того, микроорганизмы выделяют значительные количества протеаз в окружающую среду, что облегчает задачу их выделения и очистки. Поскольку микробную клетку в зависимости от условий существования окружают разные протеиновые субстраты, то синтезируются протеазы как широкой специфичности, гидролизующие несколько субстратов, так и высокоспецифичные, действующие исключительно на определенный субстрат (например, эластин и фибрин). Перспективными микроорганизмами являются представители рода *Bacillus*, в частности *B. thuringiensis*, синтезирующий пептидазу с эластазной и фибринолитической активностью [2]. Внимание исследователей привлекают и такие гликозидазы, как α -L-рамнозидазы, характеризующиеся специфичностью по отношению к терминальным остаткам L-рамнозы и присутствующие в синтетических гликозидах и природных гликоконъюгатах, таких как флавоноиды, на основе которых исследователи создают препараты для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, а также препараты с противовирусным и иммуностропным действием [3]. Внеклеточные α -L-рамнозидазы были выделены из *Eupenicillium erubescens* и *Cryptococcus albidus* [4, 5]. Для повышения активности ферментов (пептидаз с эластазной и фибринолитической активностью, а также α -L-рамнозидаз) нами были оптимизированы условия культивирования продуцентов, показано, что ряд соединений могут быть использованы для повышения их активности [6]. Поскольку одним из актуальных направ-

лений бионеорганического катализа для направленного изменения ферментативных процессов является применение металлокомплексных катализаторов, нами были выбраны координационные соединения кобальта (II, III) с производными дитиокарбамовой кислоты $RR'NC(S)SH$: дитиокарбаматы кобальта (II, III), молекулярные комплексы дитиокарбаматов кобальта (III) с йодом, а также координационные соединения кобальта (II), образующиеся при взаимодействии хлоридов, бромидов, изотиоцианатов кобальта (II) с тиурамдисульфидами. Работ зарубежных авторов о влиянии подобных структур на активность ферментов нам найти не удалось. В литературе имеются только данные об их антимикробной и фунгицидной активности. Так, исследователи [7] синтезировали комплексы пропранолол дитиокарбаматов с Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II) и показали их антимикробную активность по отношению к *Bacillus megaterium*, *B. brevis*, *Yersinia enterocolitica*, *Micrococcus luteus*, *Candida tropicalis*, *Enterococcus faecalis*. Показана антифунгальная активность комплексов 1-ацетилпиперазинилдитиокарбамата с Mn(II) и Fe(II) по отношению к *Fusarium* sp., *Sclerotinia* sp. [8]. Исследование антибактериального (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*) и антифунгального (*Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. carbonarius*) действия комплексов циклогексиламин-N-дитиокарбамата с Zn(II), Co(II), Cu(II) и Ni(II) позволило установить, что комплексы с металлами проявляют большую антимикробную активность по сравнению с лигандами [9].

В связи с вышесказанным целью работы было изучать возможность использования комплексов кобальта (II, III) с производными дитиокарбамовой кислоты в качестве эффекторов микробных ферментов с эластазной, фибринолитической и α -L-рамнозидазной активностью.

Материалы и методы

Объектами исследований были внеклеточные пептидазы *Bacillus thuringiensis* ИМВ В-7324 с эластазной и фибринолитической активностью [10], а также внеклеточные α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* 248 и *Cryptococcus albidus* 1001.

Для синтеза внеклеточных пептидаз *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 культивировали

на жидких питательных средах, оптимизированных нами ранее [10]. Для синтеза эластазы использовали среду следующего состава (г/л): $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – 1,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; арабиноза – 1,5; желатин – 10,0; дрожжевой автолизат – 0,15, pH 6,5 [11], а для накопления фибринолитической пептидазы, (г/л): мальтоза – 19,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 12,0, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – 1,6, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75, pH 7,5 [12]. Штамм выращивали в течение 18 час (для получения эластолитической пептидазы 1) и 48 час (для получения фибринолитической пептидазы 2) в колбах на качалках (150–200 мл среды, 42 °С, 200 об./мин). Инокулум получали на соответствующих средах в течение 18 час и засеивали в колбы в количестве 10^5 – 10^6 КОЕ/мл.

Пептидазы из супернатанта культуральной жидкости продуцента очищали хроматографическим методом как описано [13, 14]. Содержание протеина на всех стадиях очистки измеряли на СФ-26 (Ломо, СССР) при 280 нм. Гомогенность пептидаз подтверждена электрофорезом в системе SDS-PAGE [13, 14]. Получено пептидазу 1 со специфичностью к эластину и фибрину и пептидазу 2, специфичную только к фибрину. Эластазную и фибринолитическую активность определяли как описано ранее [15]. Активность пептидазы 1 составляла 197,3 ед./мг протеина (для эластазной активности) и 100 ед./мг протеина (для фибринолитической активности), а для пептидазы 2 с фибринолитической активностью – 87,9 ед./мг протеина. Содержание протеина – 0,1 мг/мл.

Продуценты α -L-рамнозидаз *C. albidus* и *E. erubescens* выращивали глубинным способом в течение 4 сут при температуре 28 °С, на качалках при 220 об./мин. *C. albidus* культивировали на оптимизированной ранее [16] среде следующего состава, г/л: рамноза – 1, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 3, мальтэкстракт – 3, pH 6, а *E. erubescens* на среде Чапека [16], г/л: NaNO_3 – 2; $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – 1; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; рамноза – 2,5, pH – 5,5.

α -L-Рамнозидазы выделяли из культуральных фильтратов продуцентов осаждением сульфатом аммония (до 90% насыщения) с последующей очисткой хроматографическим методом [17, 18] на колонках с нейтральными и заряженными TSK-гелями Toyopearl HW-60 и DEAE-650(S) (Toyosoda, Япония). Активность α -L-рамнозидазы определяли методом Davis [19].

Комплексы кобальта (II, III) с производными дитиокарбамовой кислоты синтезировали как описано [20–25]. При изучении влияния комплексов кобальта (II, III) на активность энзимов их концентрация в реакционной смеси была 0,01 и 0,001%, время экспозиции 60 мин. За 100% принимали энзиматическую активность в отсутствие соединений кобальта (контроль). К 0,9 мл раствора пептидаз 1 и 2 в концентрации 0,1 мг протеина/мл 0,01 М трис-НСl буфера, pH 8,0 и 10,0 соответственно, добавляли растворенные в 0,1% ДМСО комплексы кобальта (0,1 мл) в соответствующей концентрации. Инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Для определения эластазной и фибринолитической активности отбирали соответственно по 1,0 и 0,2 мл реакционной смеси. К 1 мл раствора комплексов кобальта добавляли 1 мл раствора α -L-рамнозидазы (0,01 мг протеина/мл), выдерживали 60 мин при комнатной температуре. Для определения α -L-рамнозидазной активности из реакционной смеси отбирали 0,1 мл и по описанной выше методике определяли активность энзима.

Полученные результаты обрабатывали статистически при помощи программы Microsoft Office Excel 2010. На рисунках приведены средние арифметические значения (трех повторностей), отклонение от среднего значения не превышало 5%.

В работе использовали такие реактивы: нейтральные и заряженные TSK-гели Toyopearl HW-55, Toyopearl HW-60, DEAE-650(S) и DEAE-650(M) (Toyosoda, Япония). Реактивы, используемые в составе питательных сред, буферных растворов – отечественного производства квалификации чда и хч. Субстраты: эластин и нарингин (Sigma-Aldrich, США). Фибрин получен из плазмы крови человека на станции переливания крови.

Результаты и обсуждение

Комплексообразующие свойства производных дитиокарбамовой кислоты обусловлены наличием в их молекулах тионных и тиольных атомов серы, которые в зависимости от энергии и симметрии внешних орбиталей иона комплексообразователя могут быть σ -, π - или (σ, π)-донорами, а также π -акцепторами. Дитиокарбаматные лиганды обладают необычной способностью стабилизировать комплексы ко-

бальта в степенях окисления I, II, III и IV, что позволяет получать на их основе разнообразные соединения. В настоящей работе как эффекторы активности энзимов были использованы 33 координационных соединения, которые на основании их состава и строения были разделены на 6 групп:

1) тетрахлоркобальтаты (II) 3,6-ди(R,R')-иминио-1,2,4,5-тетратиана – $(RR')_2Ditt[CoCl_4]$;

2) тетрабромкобальтаты (II) 3,6-ди(R,R')-иминио-1,2,4,5-тетратиана – $(RR')_2Ditt[CoBr_4]$;

3) изотиоцианаты тетра((R,R')-дитиокарбаматизотиоцианат)кобальта (II) – $[Co(RR'Dite)_4](NCS)_2$;

4) дитиокарбаматы кобальта (II) – $[Co(S_2CNRR')_2]$;

5) дитиокарбаматы кобальта (III) – $[Co(S_2CNRR')_3]$;

6) молекулярные комплексы дитиокарбаматов кобальта (III) с йодом – $[Co(S_2CNRR')_3] \cdot 2I_2$.

Эти группы (1–6) объединяет наличие в их молекулах одного и того же комплексообразователя (кобальта) и фрагмента S_2CNRR' . Соединения 1–4 групп являются четырехкоординированными комплексами кобальта (II), а 5–6 – шестикоординированными комплексами кобальта (III). Исследуемые комплексы различаются по заряду внутренней координационной сферы: анионные (1–2), катионные (3) и нейтральные (4–6). В них формируются разные полиэдры комплексообразователя: тетраэдрический (1–3), плоскочувратный (4) и октаэдрический (5–6). Комплексы групп 1–4 проявляют парамагнитные, а 5–6 диамагнитные свойства. При этом соединения 1–3 групп являются высокоспиновыми, а 4–6 низкоспиновыми. Внутри каждой группы комплексов варьируется природа заместителей у атомов азота.

В результате исследования влияния комплексов кобальта (II, III) с производными дитиокарбамовой кислоты в концентрации 0,01% на эластазную активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* (рис. 1) установлено, что в большинстве своем комплексы кобальта (II) в группах (1–4) увеличивают активность пептидазы 1 в среднем на 17–100% по сравнению с соединениями кобальта (III) (5–6). Причем, наиболее активными в группах (1–4) были соединения, содержащие короткие алифатические (метил, этил) или алициклические (пентаметилен) заместители у атомов азота. Анионные (1), (2) и

нейтральные (4) комплексы более активны, чем катионные (3), в то же время дитиокарбаматы кобальта (III) (5) и их молекулярные комплексы с йодом (6) угнетали на 9–47% эластазную активность пептидазы 1. Такое различие в поведении комплексов кобальта (II) (1–4) и кобальта (III) (5–6), вероятно, связано с их разной координационной насыщенностью. Комплексы кобальта (III) (5) и (6) с координационным числом 6 являются насыщенными и поэтому их связывание с субстратом и с энзимом затруднено, тогда как соединения кобальта(II) (1–4) с координационным числом 4 являются ненасыщенными и имеют вакантные места для образования двух дополнительных связей. Ранее [26] нами было показано, что Co^{2+} необратимо ингибирует эластазную активность пептидазы, при этом предполагалось, что он связывается с субстратом и препятствует дальнейшей адсорбции и связыванию энзима с субстратом. Учитывая вышеизложенное, а также то, что большинство исследуемых в настоящей работе соединений кобальта (II) повышали эластазную активность пептидазы 1, можно допустить, что они, вероятно, не связываются с субстратом, а участвуют в формировании каталитически активной конформации энзима. Такая гипотеза косвенно подтверждается тем, что пептидаза 1 *B. thuringiensis* является металлозависимой сериновой пептидазой и присутствие металла в ее структуре является необходимым, в первую очередь, для связывания высокомолекулярных нативных субстратов.

При уменьшении концентрации исследуемых комплексов кобальта (II, III) до 0,001%-ой (рис. 2) для соединений (1–4) наблюдается снижение показателей активирования до 11–23%, а для соединений (5–6) – снижение степени ингибирования в среднем на 10–20%. Сопоставляя результаты, приведенные на рис. 1 и 2, следует выделить из групп (1–4) следующие комплексы: $\{(CH_3)_2\}_2Ditt[CoCl_4]$, $\{(CH_2)_3\}_2Ditt[CoBr_4]$, $[Co\{(CH_3)_2Dite\}_4](NCS)_2$ и $[Co\{S_2CN(CH_2)_6\}_2]$, которые в обеих концентрациях достоверно увеличивают исследуемую активность.

В отличие от эластазной, влияние 0,01%-ой концентрации комплексов кобальта (II, III) на фибринолитическую активность той же пептидазы 1 было неоднозначным (рис. 3). Особенно это касается соединений кобальта (5), (6), демонстрирующих очень широкий диапазон действия – от 100%-го подавления до четырех-

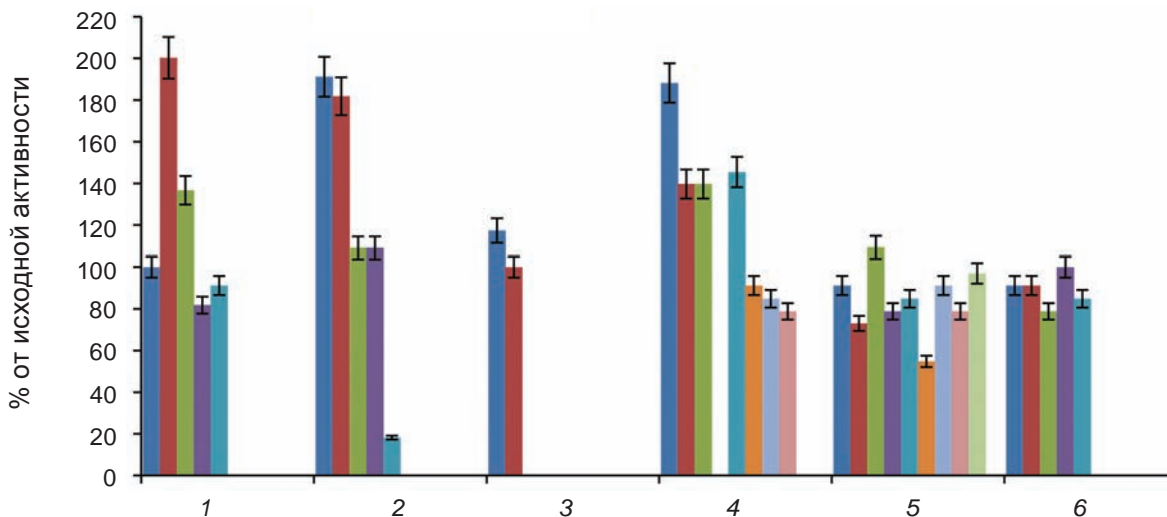


Рис. 1. Влияние комплексов кобальта (II, III) в концентрации 0,001% на эластазную активность пептидазы I *B. thuringiensis* ИМВ В-7324. Здесь и на рис. 2–10: 1 – $(RR')_2Ditt[CoCl_4]$; 2 – $(RR')_2Ditt[CoBr_4]$; 3 – $[Co(RR'Dite)_4(NCS)_2]$; 4 – $[Co(S_2CNRR')_2]$; 5 – $[Co(S_2CNRR')_3]$; 6 – $[Co(S_2CNRR')_3] \cdot 2I_2$. Здесь и на рис. 2–10: ■ – $RR' = (CH_2)_5$; ■ – $RR' = (C_6H_{11})_2$; ■ – $RR' = (n-C_3H_7)_2$; ■ – $RR' = (C_2H_5)C_6H_5$; ■ – $RR' = (CH_3)_2$; ■ – $RR' = (CH_2)_6$; ■ – $RR' = (CH_2C_6H_5)_2$; ■ – $RR' = (C_2H_5)_2$; ■ – $RR' = (n-C_4H_9)_2$; ■ – $RR' = (C_2H_5)C_6H_5$

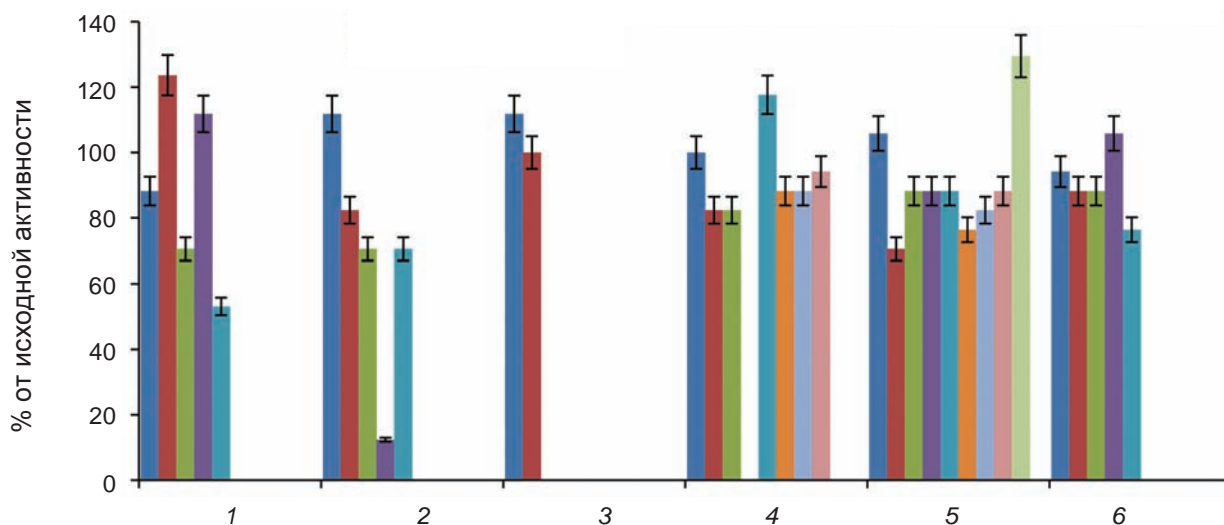


Рис. 2. Влияние комплексов кобальта (II, III) в концентрации 0,001% на эластазную активность пептидазы I *B. thuringiensis* ИМВ В-7324

кратного увеличения активности по сравнению с контролем. Такие различия трудно объяснить влиянием заместителей у атомов азота. Тем не менее, анализируя приведенные на рис. 3 данные, можно заключить, что в целом анионные и катионные комплексы кобальта (II) (1–3) уменьшают фибринолитическую активность пептидазы I *B. thuringiensis* на 28–83%, а нейтральные

соединения кобальта (II, III) (4–5) увеличивают на 129–299%. Возможно, что наличие заряда в комплексах и является причиной их ингибирующего действия, обусловленного электростатическим взаимодействием с заряженными участками молекул субстрата. Различное влияние соединений кобальта (6) на фибринолитическую активность энзима (активирование и ингибиро-

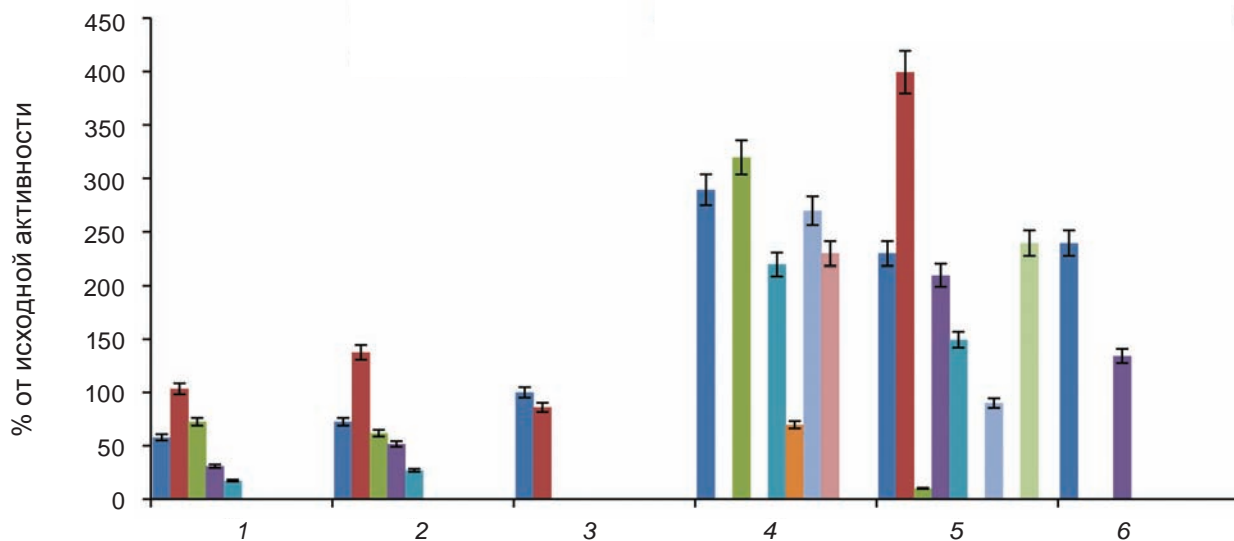


Рис. 3. Влияние соединений кобальта (II, III) в концентрации 0,01% на фибринолитическую активность пептидазы I *B. thuringiensis* ИМВ В-7324

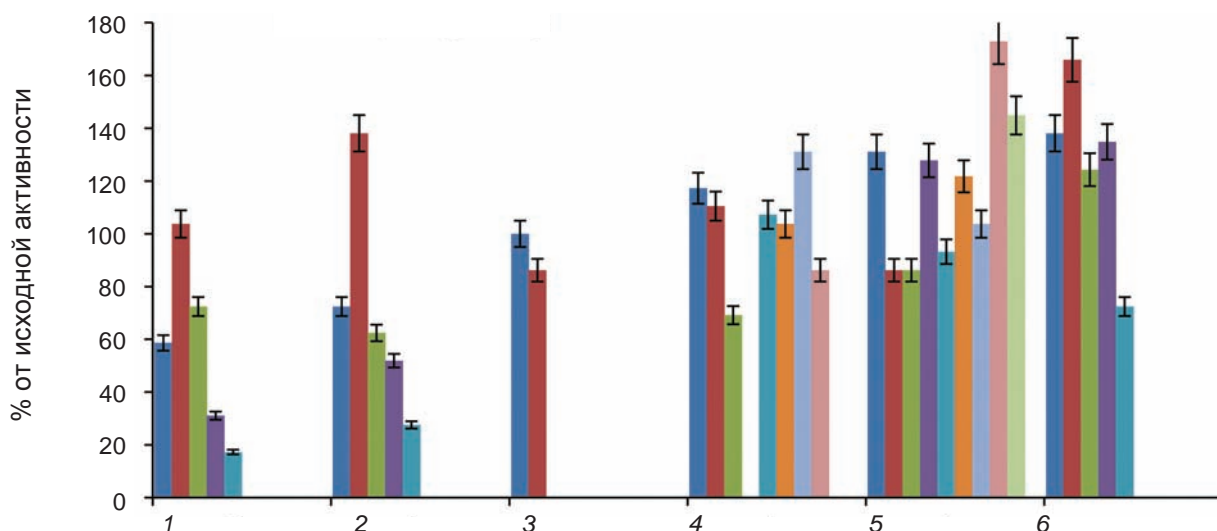


Рис. 4. Влияние соединений кобальта (II, III) в концентрации 0,001% на фибринолитическую активность пептидазы I *B. thuringiensis* ИМВ В-7324

вание) можно объяснить существованием в их растворах равновесий, которые в упрощенной форме представлены следующим образом: исходные компоненты ↔ молекулярный комплекс ↔ ионный ассоциат ↔ ионы. В зависимости от среды и концентрации соединений эти равновесия смещаются в сторону образования исходных $[Co(S_2CNR'R')_3]$ и I_2 , либо – ионных ассоциатов и продуктов их диссоциации.

Уменьшение концентрации соединений кобальта (II, III) с 0,01 до 0,001%-ой (рис. 4) прак-

тически не влияет на показатели активности, полученные для анионных и катионных комплексов кобальта (II) (1–3), и существенно снижает их для дитиокарбаматов кобальта (II, III) (4–5). Соединения групп (5) и (6) в исследуемых концентрациях повышают фибринолитическую активность в 0,3 и 3,0 раза, что, по-видимому, связано с диссоциацией $[Co(S_2CNR'R')_3] \cdot 2I_2$ и смещением вышеприведенных равновесий в сторону образования исходных веществ. Из рис. 3 и 4 видно, что соединения, приведенные

ниже: $\{(CH_3)_2\}_2Ditt[CoCl_4]$, $\{(CH_3)_2\}_2Ditt[CoBr_4]$,
 $[Co\{S_2CN(CH_2)_5\}_2]$, $[Co\{S_2CN(CH_2)_6\}_2]$,
 $[Co\{S_2CN(n-C_3H_7)_2\}_2]$, $[Co\{S_2CN(CH_2)_5\}_3]$,
 $[Co\{S_2CN(C_6H_{11})_2\}_3]$, $[Co\{S_2CN(C_2H_5)C_6H_5\}_3]$,
 $[Co\{S_2CN(CH_2)_5\}_3] \cdot 2I_2$ и $[Co\{S_2CN(C_6H_{11})_2\}_3] \cdot 2I_2$ в
обеих концентрациях увеличивают фибринолитическую активность пептидазы 1. Из полученных данных следует, что комплексы кобальта (II, III) с производными дитиокарбамовой кислоты оказывают более сильное влияние на фибринолитическую активность пептидазы 1, чем

на эластазную. При этом их активность в меньшей степени зависит от заместителей у атомов азота, что сказывается на увеличении числа высокоэффективных соединений.

В результате исследования влияния соединений кобальта на фибринолитическую активность пептидазы 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 (рис. 5, 6) установлено, что, как и в случае с пептидазой 1, характер и эффективность действия исследуемых соединений, в основном, зависит от заряда комплексов. Только нейтральные ди-

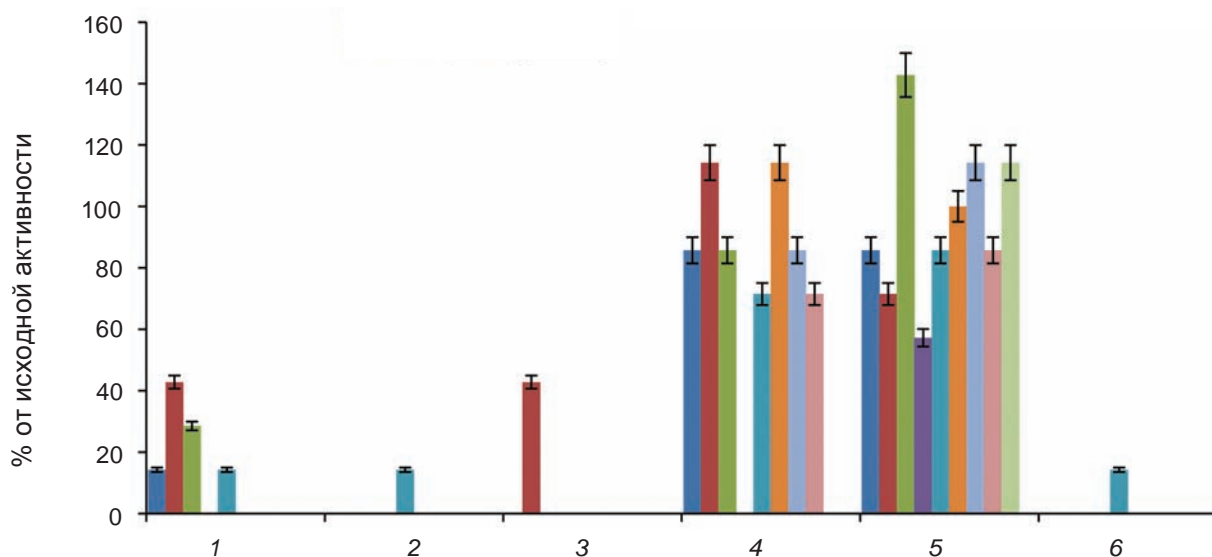


Рис. 5. Влияние соединений кобальта (II, III) в концентрации 0,01% на фибринолитическую активность пептидазы 2 *B. thuringiensis*

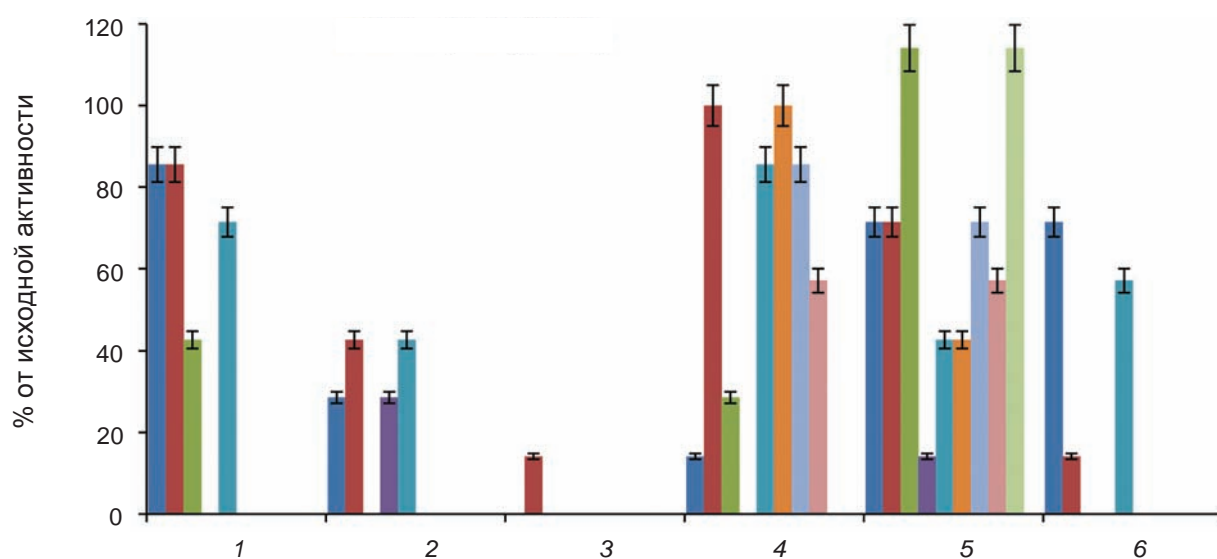


Рис. 6. Влияние соединений кобальта (II, III) в концентрации 0,001% на фибринолитическую активность пептидазы 2 *B. thuringiensis*

тиокарбаматы кобальта (II, III) (4–5) незначительно повышают фибринолитическую активность пептидазы 2, в то время как все остальные соединения эту активность ингибируют, причем сильнее, чем в случае с пептидазой 1.

Комплексы кобальта в концентрации 0,001% (рис. 6) обладали как активирующим (соединения 4 и 5), так и ингибирующим действием (соединения 1–3 и 6). Это связано с недостаточной концентрацией комплексов для осуществления процессов активирования или ингибиро-

вания. Из исследованных 33 соединений следует выделить два дитиокарбамата кобальта (III) $[Co\{S_2CN(C_2H_5)_2\}_3]$ и $[Co\{S_2CN(C_2H_5)C_6H_5\}_3]$, которые в обеих концентрациях увеличивают фибринолитическую активность пептидазы 2 на 15–40% по сравнению с контролем.

При исследовании влияния всех изученных соединений на α -L-рамнозидазную активность *E. erubescens* (рис. 7, 8) обнаружено, что сильнее других ингибируют активность комплексы $[Co\{S_2CN(CH_3)_2\}_3] \cdot 2I_2$ и $[Co\{S_2CN(C_2H_5)_2\}_3] \cdot 2I_2$.

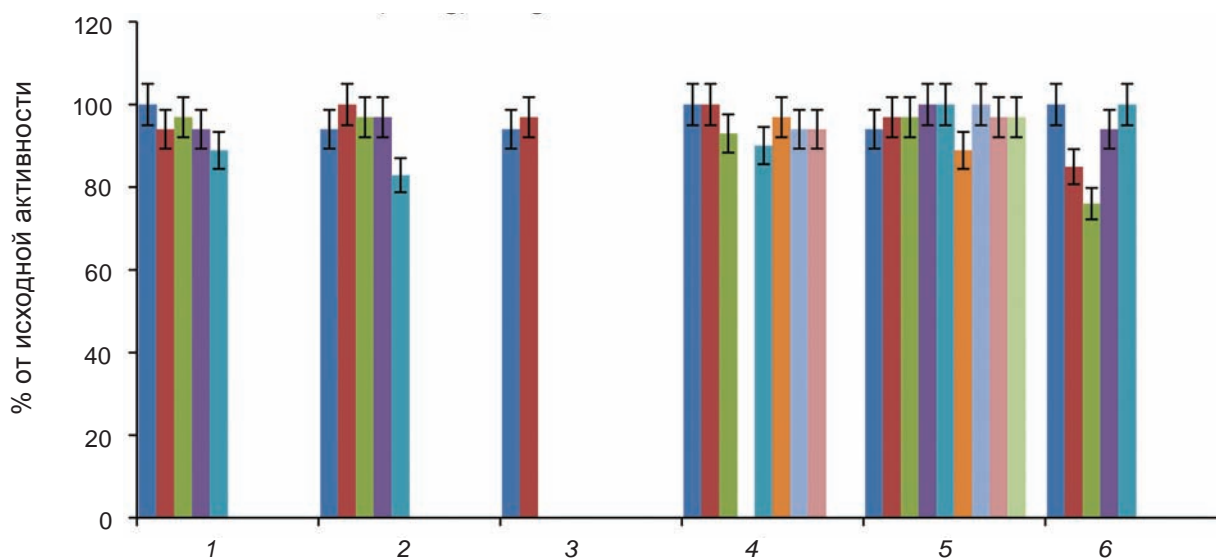


Рис. 7. Влияние соединений кобальта (II, III) в концентрации 0,001% на α -L-рамнозидазную активность *E. erubescens*

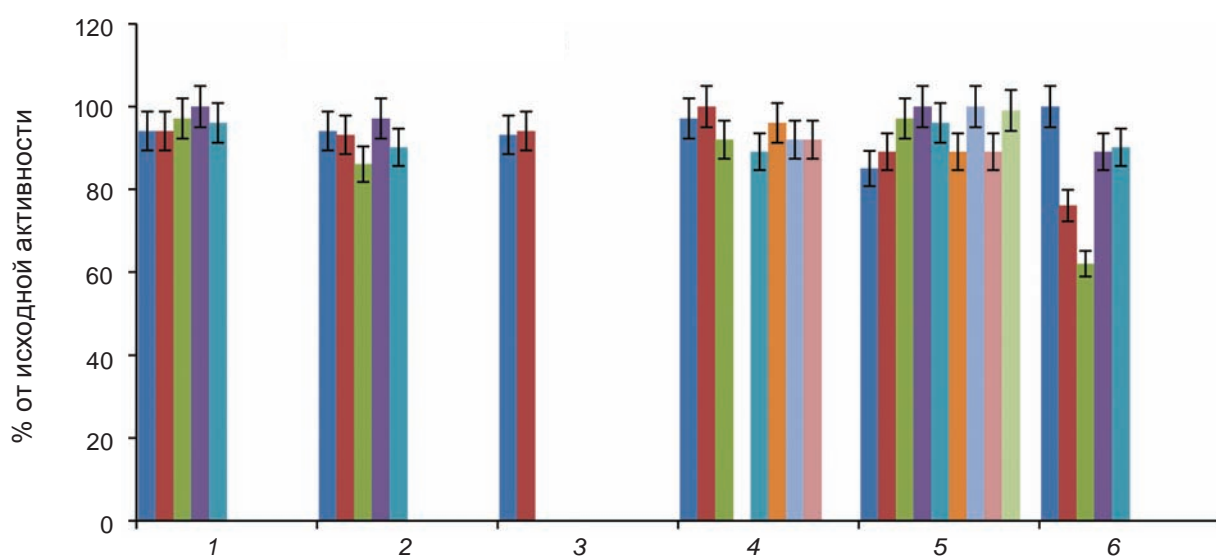


Рис. 8. Влияние соединений кобальта (II, III) в концентрации 0,01% на α -L-рамнозидазную активность *E. erubescens*

Все остальные комплексы в концентрации 0,001 и 0,01% либо не влияют на активность, либо ингибируют ее на 5–20%. При этом увеличение концентрации соединений от 0,001 до 0,01% приводит к повышению степени ингибирования (до 40%).

Более разнообразное действие исследуемые соединения проявляли по отношению к α -L-рамнозидазе *C. albidus* (рис. 9, 10). В этой серии экспериментов установлено, что комплексы (в концентрации 0,001%) $\{(CH_2)_6\}_2Ditt[CoCl_4]$, $[Co\{S_2CN(CH_2C_6H_5)_2\}_3]$ и $[Co\{S_2CN(C_2H_5)C_6H_5\}_3]$

повышали активность α -L-рамнозидазы на 10–20%. Все остальные соединения либо не влияли на активность α -L-рамнозидазы *C. albidus*, либо ее ингибировали. С увеличением концентрации комплексов до 0,01% степень ингибирования уменьшалась на 10–35%.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что соединения кобальта (II, III) могут служить эффекторами исследованных энзимов, оказывая как активирующее, так и ингибирующее действие на их активность в зависимости от состава, строения,

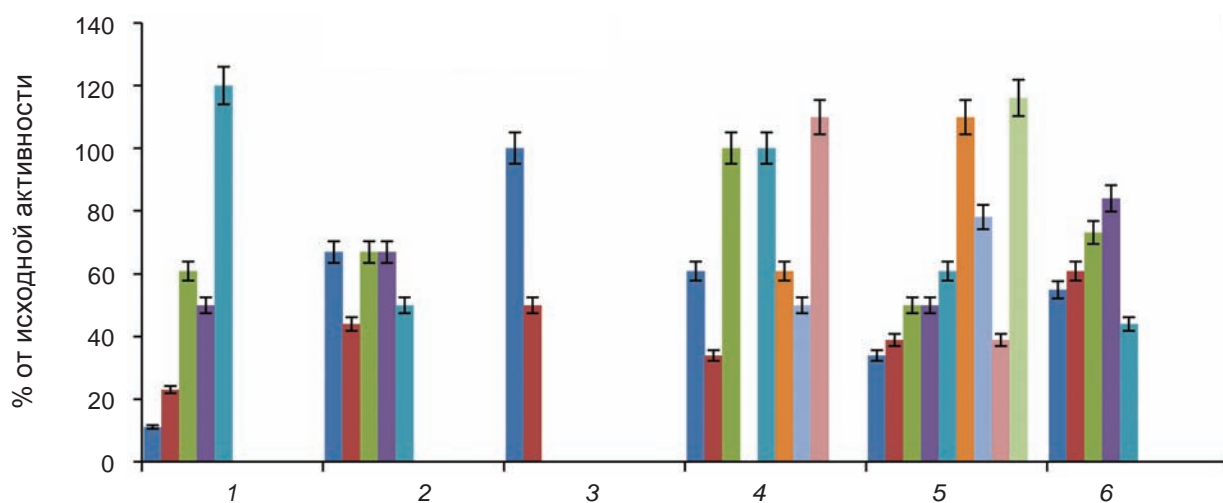


Рис. 9. Влияние соединений кобальта (II, III) в концентрации 0,001% на α -L-рамнозидазную активность *C. albidus*

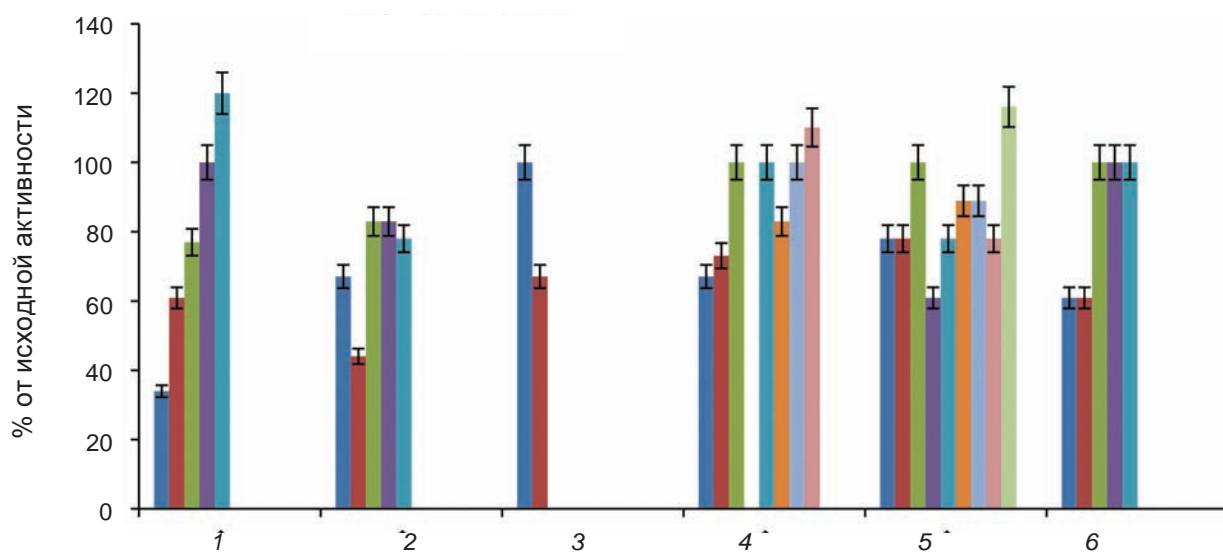


Рис. 10. Влияние соединений кобальта (II, III) в концентрации 0,01% на α -L-рамнозидазную активность *C. albidus*

заряда комплексу, координаційного числа комплексообразувача, а також от штамма, продуцирующего ензим. Так, максимальний активуючий ефект для пептидази 1 *B. thuringiensis* с еластазної і фібринолітичної активністю досягався при використанні координаційно ненасичених комплексів кобальта (II) (1–4), що містять у атомів азота короткі алифатичні або ациклическі замісники; а також нейтральних дитіокарбаматів кобальта (II, III) (4–5) відповідно. Для підвищення фібринолітичної активності пептидази 2 можна використовувати дибензил- або етилфенілдитіокарбамати кобальта (III). Ці ж комплекси, а також сполучення $\{(CH_2)_6\}_2Ditt[CoCl_4]$ мали активуючий вплив на α -L-рамнозидазу *S. albidus*. Слід зауважити, що інформація про інгібування дією більшості досліджених сполучень представляє суттєвий науковий інтерес, оскільки досліджувані комплекси кобальта з дитіокарбаматною кислотою синтезовані авторами вперше і їх вплив на активність ензимів вивчено також вперше. Отримані результати важливі для можливого їх використання в практиці, зокрема для гальмування активності еластаз патогенних організмів, що беруть участь у розвитку інфекційних процесів.

Автори висловлюють щиру подяку співробітникам відділу систематики мікроциетів і відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ к.б.н. С. С. Нагорної і к.б.н. І. Н. Курченко за надані для досліджень культури мікроорганізмів.

**КОМПЛЕКСИ КОБАЛЬТУ (II, III)
З ПОХІДНИМИ ДИТІОКАРБАМОВОЇ
КИСЛОТИ – ЕФЕКТОРИ
ПЕПТИДАЗИ *Bacillus thuringiensis*
ТА α -L-РАМНОЗИДАЗИ *Eupenicillium
erubescens* І *Cryptococcus albidus***

Л. Д. Варбанець¹, О. В. Мацелюх¹,
І. І. Сейфулліна², М. В. Хитрич²,
Н. А. Нідялкова¹, О. В. Гудзенко¹

¹Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ;

²Одеський національний університет
ім. І. І. Мечникова, Україна;
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Вивчали вплив комплексів кобальту (II, III) з похідними дитіокарбаматової кислоти на активність пептидази *Bacillus thuringiensis* із еластазною і фібринолітичною активністю, а також α -L-рамнозидази *Eupenicillium erubescens* та *Cryptococcus albidus*. Досліджувані сполуки кобальту (II, III) на основі їхнього складу і будови було розділено на 6 груп: 1) тетрагалокобальтати (II) 3,6-ди(R,R')-імініо-1,2,4,5-тетратіана – (RR')₂Ditt[CoCl₄]; 2) тетрабромкобальтати (II) 3,6-ди(R,R')-імініо-1,2,4,5-тетратіана – (RR')₂Ditt[CoBr₄]; 3) ізотіоціанати тетра((R,R')-дитіокарбаматізоціанат)кобальту (II) – [Co(RR'Dite)₄](NCS)₂; 4) дитіокарбамати кобальту (II) – [Co(S₂CNRR')₂]; 5) дитіокарбамати кобальту (III) – [Co(S₂CNRR')₃]; 6) молекулярні комплекси дитіокарбаматів кобальту (III) з йодом – [Co(S₂CNRR')₃]₂I₂. Ці групи (1–6) об'єднувала наявність в їхніх молекулах одного і того ж комплексоутворювача (кобальту) і фрагмента S₂CNRR'. Досліджувані ком-

плекси відрізняються зарядом внутрішньої координаційної сфери: аніонні (1–2), катіонні (3) і нейтральні (4–6). У межах кожної групи комплексів варіюється природа замісників при атомах нітрогену. Встановлено, що вивчені сполуки кобальту (II, III) активують або інгібують ензиматичну активність, в залежності від складу, будови, заряду комплексу, координаційного числа комплексоутворювача, а також від ензиму і штаму, який його продукує. Максимальний ефект досягається за активування пептидази *B. thuringiensis* IMV B-7324 із еластазою і фібринолітичною активністю. Так, для покращення каталітичних властивостей пептидази 1 в залежності від виду активності, яку вона проявляє, можна рекомендувати такі сполуки: для еластазої – координаційно ненасичені комплекси кобальту (II) (1–4), які містять при атомах нітрогену короткі аліфатичні або аліциклічні замісники і підвищують активність в середньому на 17–100%; для фібринолітичної – нейтральні дитіокарбамати кобальту (II, III) (4–5) (на 29–199%). Для підвищення фібринолітичної активності пептидази 2 краще використовувати дибензил- або етилфенілдитіокарбамати кобальту (III), які збільшують активність на 15–40% порівняно з контролем. Ці ж комплекси, а також сполука $\{(CH_2)_6\}_2Ditt[CoCl_4]$ активують α -L-рамнозидазу *C. albidus* на 10–20%.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, *Eupenicillium erubescens*, *Cryptococcus albidus*, комплекси кобальту (II, III), похідні дитіокарбамової кислоти, пептидаза з еластазою і фібринолітичною активністю, α -L-рамнозидаза.

COMPLEXES OF COBALT (II, III) WITH DERIVATIVES OF DITHIOCARBAMIC ACID – EFFECTORS OF PEPTIDASES OF *Bacillus thuringiensis* AND α -L-RHAMNOZIDASE OF *Eupenicillium erubescens* AND *Cryptococcus albidus*

L. D. Varbanets¹, E. V. Matseliukh¹,
I. I. Seifullina², N. V. Khitrich²,
N. A. Nidialkova¹, E. V. Gudzenko¹

¹D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²I. I. Mechnikov Odessa National University, Ukraine;
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

The influence of cobalt (II, III) coordinative compounds with derivatives of dithiocarbamic acid on *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 peptidases with elastase and fibrinolytic activity and *Eupenicillium erubescens* and *Cryptococcus albidus* α -L-rhamnosidases have been studied. Tested coordinative compounds of cobalt (II, III) on the basis of their composition and structure are presented by 6 groups: 1) tetrachlorocobaltates (II) of 3,6-di(R,R')-iminio-1,2,4,5-tetratiane – $(RR')_2Ditt[CoCl_4]$; 2) tetrabromocobaltates (II) of 3,6-di(R,R')-iminio-1,2,4,5-tetratiane – $(RR')_2Ditt[CoBr_4]$; 3) isothiocyanates of tetra((R,R')-dithiocarbamatoisothiocyanate)cobalt (II) – $[Co(RR'Ditc)_4](NCS)_2$; 4) dithiocarbamates of cobalt (II) – $[Co(S_2CNRR')_2]$; 5) dithiocarbamates of cobalt (III) – $[Co(S_2CNRR')_3]$; 6) molecular complexes of dithiocarbamates of cobalt (III) with iodine – $[Co(S_2CNRR')_3] \cdot 2I_2$. These groups (1-6) are combined by the presence of the same complexing agent (cobalt) and a fragment S_2CNRR' in their

molecules. Investigated complexes differ by a charge of intrinsic coordination sphere: anionic (1-2), cationic (3) and neutral (4-6). The nature of substituents at nitrogen atoms varies in each group of complexes. It is stated that the studied coordination compounds render both activating and inhibiting effect on enzyme activity, depending on composition, structure, charge of complex, coordination number of complex former and also on the enzyme and strain producer. Maximum effect is achieved by activating of peptidases *B. thuringiensis* IMV B-7324 with elastase and fibrinolytic activity. So, in order to improve the catalytic properties of peptidase 1, depending on the type of exhibited activity, it is possible to recommend the following compounds: for elastase – coordinately nonsaturated complexes of cobalt (II) (1-4) containing short aliphatic or alicyclic substituents at atoms of nitrogen and increasing activity by 17-100% at an average; for fibrinolytic – neutral dithiocarbamates of cobalt (II, III) (4-5) (by 29-199%). For increasing the fibrinolytic activity of peptidase it is better to use dibenzyl- or ethylphenyldithiocarbamates of cobalt (III), which increase activity by 15-40% at an average. The same complexes, and also compound $\{(CH_2)_6\}_2Ditt[CoCl_4]$ make an activating impact on α -L-rhamnosidase *C. albidus* (by 10-20%).

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Eupenicillium erubescens*, *Cryptococcus albidus*, cobalt, dithiocarbamate, peptidase with elastase and fibrinolytic activity, α -L-rhamnosidase.

1. Варбанець Л. Д., Мацелюх О. В. Протеолітичні ферменти мікроорганізмів. – Київ, 2008. – 107 с.
2. Мацелюх О. В., Нідялкова Н. А., Варбанець Л. Д. // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 6. – С. 25–36.
3. Гудзенко О. В., Варбанець Л. Д. // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 6. – С. 9–26.
4. Гудзенко Е. В., Варбанець Л. Д. // Мікробіол. журн. – 2012. – **74**, № 2. – С. 14–21.
5. Гудзенко Е. В., Варбанець Л. Д. // Мікробіол. журн. – 2012. – **74**, № 6. – С. 16–23.
6. Варбанець Л. Д., Мацелюх Е. В., Гудзенко Е. В. и др. // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 3. – С. 25–36.
7. Golcu A. // Transit. Metal Chem. – 2006. – **31**. – P. 404–412.
8. Mohammad A., Varsney C., Nami S. // Spectrochim. Acta. – 2009. – **73**, Part A. – P. 20–24.
9. Mamba S., Mishra A., Mamba B. et al. // Spectrochim. Acta. – 2010. – **77**, Part A. – P. 579–587.
10. Мацелюх О. В. // Біотехнологія. – 2010. – **3**, № 2. – С. 42–47.
11. Нідялкова Н. А., Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 4. – С. 74–81.
12. Мацелюх О. В., Нідялкова Н. А., Варбанець Л. Д. // Біотехнологія. – 2011. – **4**, № 3. – С. 43–50.
13. Мацелюх О. В., Нідялкова Н. А., Варбанець Л. Д. // Укр. біохім. журн. – 2012. – **84**, № 6. – С. 25–36.
14. Нідялкова Н. А., Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. // Мікроб. журн. – 2012. – **74**, № 5. – С. 10–16.
15. Варбанець Л. Д., Мацелюх Е. В., Нідялкова Н. А. и др. // Biotechnol. Acta. – 2013. – **6**, № 1. – С. 73–80.
16. Гудзенко О. В., Борзова Н. В., Варбанець Л. Д. // Мікробіол. журн. – 2011. – **73**, № 3. – С. 46–53.
17. Гудзенко Е. В., Варбанець Л. Д. // Мікробіол. журн. – 2012. – **74**, № 2. – С. 14–21.
18. Гудзенко Е. В., Варбанець Л. Д. // Мікробіол. журн. – 2012. – **74**, № 6. – С. 16–23.
19. Davis D. W. // Anal Chem. – 1947. – **19**, N 1. – P. 46–48.
20. Юрченко Э. Н., Хитрич Н. В., Парыгина Г. К. и др. // Изв. СО АН СССР. – 1988. – № 12, Вып. 4. – С. 89–93.
21. Хитрич Н. В., Сейфуллина И. И., Нефедов С. Е. и др. // Журн. неорг. химии. – 2006. – **51**, № 7. – С. 1–9.
22. Хитрич Н. В., Сейфуллина И. И., Старикова З. А. // Журн. неорг. химии. – 2002. – **47**, № 1. – С. 85–91.
23. Хитрич М. В., Сейфуллина И. И. // Вісн. Одеськ. нац. ун-ту. Хімія. – 2000. – **5**, № 2. – С. 27–32.
24. Хитрич Н. В., Колчинский Е. В. / Матер. науч. конф. мол. ученых хим. фак. Одес. ун-та. – Одесса, 1989. – С. 2–6. Деп. в УкрНИИНТИ 02.01.89, № 1-Ук89.
25. Хитрич Н. В., Сейфуллина И. И. // Коорд. химия. – 2000. – **26**, № 11. – С. 848–853.
26. Варбанець Л. Д., Мацелюх О. В., Нідялкова Н. А. та ін. // Biotechnologia Acta. – 2013. – **6**, № 1. – С. 73–80.

Получено 21.02.2013