

УДК 541.49:546.732/3:547.496.2

КООРДИНАЦІЙНІ СПОЛУКИ КОБАЛЬТУ (II, III) З ПОХІДНИМИ ДИТІОКАРБАМОВОЇ КИСЛОТИ — МОДИФІКАТОРИ АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ ГІДРОЛІТИЧНОЇ ДІЇ

Л. Д. Варбанець¹

О. В. Мацелюх¹

Н. А. Нідялкова¹

К. В. Авдіюк¹

О. В. Гудзенко¹

Г. Й. Сейфулліна²

Г. М. Масановець²

М. В. Хитрич²

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

²Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Отримано 30.07.2012

Хлоридні, бромідні та ізотіоціанатні комплекси кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами (1)–(12), а також комплекси кобальту (II, III) з похідними морфолін-4-карбодітійової кислоти (13)–(18) було використано як модифікатори активності ензимів гідролітичної дії — пептидаз *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324, амілаз *Bacillus subtilis* 147 і *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428, рамнозидаз *Eupenicillium erubescens* 248 та *Cryptococcus albidus* 1001. Встановлено, що сполуки кобальту (II, III) неоднаково впливають на активність досліджуваних ензимів, виявляючи як інгібуєчу, так і стимулювальну дію. Це дає підстави припустити, що прояв активності комплексної молекули залежить від ліганду та наявності аніона — Cl⁻, Br⁻ або NCS⁻. Висока активуюча дія комплексів кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами (1)–(12) на еластазу і фібринолітичну активність пептидаз, порівняно з трис(4-морфолінкарбодітійоатом)кобальту (III) (14) та продуктами його взаємодії з галогенами (15)–(17), що спричиняють, навпаки, інгібування, найімовірніше, зумовлена наявністю в них слабого зв'язку S–N, який легко піддається гомолітичному розриву. Досліджуючи вплив комплексів кобальту (II) на активність α-L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* та *Eupenicillium erubescens*, виявили, що більшість сполук інгібують їхню активність, причому інгібуєча дія більшою мірою виявляється щодо ензимного препарату *C. albidus*. Отже, можна констатувати, що характер впливу комплексів кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами, а також комплексів кобальту (II, III) з похідними морфолін-4-карбодітійової кислоти змінюється залежно як від штаму-продуцента, так і досліджуваного ензиму. Відмінність у впливі комплексів на різні ензими зумовлена характеристиками будови та функціональних груп активного центру, які також є відповідальними за зв'язування з модифікаторами.

Ключові слова: комплекси кобальту (II, III), дитіокарбамова кислота, ензими з еластазою, фібринолітичною, амілазою і рамнозидазою активністю.

Використання біологічно активних речовин мікробного походження в практичних і теоретичних цілях є однією з основних стратегій сучасних біотехнологічних процесів. Це пов'язано передусім з необмеженістю джерел, зокрема мікробних продуцентів, висока швидкість розмноження яких і контрольованість умов синтезу ними біополімерів створює умови для одержання речовин з попередньо заданими властивостями та специфічністю дії. На сьогодні мікроорганізми є найбільш технологічним і економічним джерелом отримання таких ензимів, як гідролази, рівень активності яких часто на порядок перевищує рослинні й тваринні

аналоги. Для підвищення активності ензимів можна застосовувати низку підходів, зокрема оптимізацію умов культивування, використання індукторів синтезу як синтетичного, так і природного походження. Але в останні роки особливу увагу дослідників спрямовано на пошук речовин, які здатні впливати на активність ензимів, зокрема координаційних сполук перехідних металів. Комплекси d-елементів є електроноакцепторними агентами, що приєднуються до органічних та неорганічних молекул у місцях надмірної електронної щільності. Це сприяє утворенню донорно-акцепторних зв'язків з більшою кількістю хімічно пасив-

них молекул, які містять кисень і нітроген як донорні атоми. Відомо, що вибір ліганду справляє значний вплив на здатність координаційних сполук виявляти як інгібуючу, так і активуючу дію на активність ензимів. При цьому суттєву роль відіграє наявність того чи іншого комплексоутворювача. Раніше [1] нами вивчено вплив координаційних сполук цинку(II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами, які містять фрагменти диметиламіну (L_1), діетиламіну (L_2), піперидину (L_3) та морфоліну (L_4), на еластазу, α -L-рамнозидазу і α -галактозидазу активність. Виявлено, що характер взаємодії досліджуваних комплексів цинку (II) змінюється залежно від особливостей ензиму і штаму-продуцента. Це свідчить про те, що відповідальними за зв'язування з модифікаторами є різні функціональні групи, які входять до складу ензиму і відрізняються будовою та донорними центрами. Враховуючи одержані результати, постає питання: яким чином заміна металу може вплинути на активність аналогічних комплексів як модифікаторів різних ензимів, та чи виявлятиметься різниця у характері дії на ензими у разі використання різноманітних похідних дітіокарбамоїлової кислоти? Для відповіді як об'єкти було вибрано координаційні сполуки кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами та комплекси кобальту (II, III) з похідними морфолін-4-карбодитіоїлової кислоти і досліджено їх вплив на активність таких гідролітичних ензимів, як еластаза, фібринолітична пептидаза, α -амілаза, α -L-рамнозидаза.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штами *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324, *Bacillus subtilis* 147, *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428, *Eupenicillium erubescens* 248, *Cryptococcus albidus* 1001, одержаних з колекцій Інституту мікробіології і вірусології (ІМВ) ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Для синтезу позаклітинних пептидаз *B. thuringiensis* IMB B-7324 культивували на рідких живильних середовищах, оптимізованих нами раніше. Для синтезу еластази використовували середовище такого складу (г/л): KH_2PO_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; арабіноза — 1,5; желатин — 10,0; дріжджовий автолізат — 0,15; pH — 6,5 [2], а для накопичення фібринолітичної пептидази (г/л): мальтозу — 19,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 12,0, KH_2PO_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 [3]. Штам вирощували протягом 18 год (для одержання еластолітичної пептидази 1) і 48 год (фібринолітичної пептидази 2) у колбах на качалках (150–200 мл середовища, 42 °С, 200 об/хв). Інокулюм отримували на відповідних середовищах упродовж 18 год і засівали в колби у кількості 10^5 – 10^6 КУО/мл.

Очищення пептидаз здійснювали на нейтральних і заряджених TSK-гелях Toyopearl HW-55 та DEAE-650(M) (Toyosoda, Японія), як описано раніше [4, 5]. Вміст протеїну на всіх стадіях очищення реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО, СРСР) при 280 нм. Унаслідок очищення було отримано пептидазу 1 зі специфічністю до еластину і фібрину та пептидазу 2 — тільки до фібрину. Еластазу активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину під час ензиматичного гідролізу еластину, забарвленого конго-рот [6]. Інкубаційна суміш містила 5 мг еластину, 2,0 мл 0,01 М Tris-HCl буфера (pH 7,5) з додаванням 0,005 М CaCl_2 і 1 мл розчину досліджуваного препарату. Суміш інкубували протягом 5 год за 37 °С. Негідролізований еластин відділяли центрифугуванням при 8 000 g, 10 хв. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 515 нм. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз 1 мг субстрату за 1 хв у стандартних умовах.

Фібринолітичну активність вимірювали за методом Masada [7], як субстрат використовували фібрин, отриманий з плазми крові людини на станції переливання крові. Для реакційної суміші брали 1 мг фібрину, 1,8 мл 0,01 М Tris-HCl буфера (pH 7,5) з додаванням 0,005 М CaCl_2 і 0,2 мл розчину досліджуваного препарату. Інкубаційну суміш витримували 30 хв при 37 °С. Утворення продуктів розщеплення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності приймали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв в умовах дослідження.

Продуцентами α -амілази були *A. flavus* var. *oryzae* і *B. subtilis*. *A. flavus* var. *oryzae* культивували на рідкому живильному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 1; KH_2PO_4 — 1; KCl — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,015; нерозчинний картопляний крохмаль — 10; pH 6,0. Для вирощування *B. subtilis* використовували рідке живильне середовище такого складу (г/л): NaNO_3 — 2; KH_2PO_4 — 1; KCl — 0,5;

MgSO₄·7H₂O — 0,5; FeSO₄·7H₂O — 0,015; нерозчинний картопляний крохмаль — 1; соєва мука — 10; рН 6,0 [8]. Культивування мікроорганізмів на зазначених вище середовищах проводили глибинним методом в 0,5 л колбах Ерленмеєра на качалках зі швидкістю обертання 220 об/хв за температури 25 °С (*A. flavus* var. *oryzae*) та 42 °С (*B. subtilis*) протягом 5 і 3 діб, відповідно. Біомасу відділяли фільтруванням або центрифугуванням, а в супернатанті культуральної рідини визначали вміст протеїну й амілолітичну активність. Методи виділення та очищення амілаз описано раніше [8]. Вони включали гель-фільтрацію на нейтральному TSK-гелі — Toyopearl HW-50 (Toyosoda, Японія), іонообмінну хроматографію на DEAE-Toyopearl 650 M (Toyosoda, Японія), а також метод афінної сорбції на крохмалі. Амілолітичну активність визначали згідно з ГОСТом 20264.4-89 [9].

Продукенти α-L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* вирощували глибинним способом упродовж чотирьох діб за температури 28 °С, на качалках при 220 об/хв. *C. albidus* культивували на оптимізованому раніше [10] середовищі такого складу (г/л): рамноза — 1, пептон — 5, дріжджовий екстракт — 3, мальтекстракт — 3, рН — 6, а *E. erubescens* — на середовищі Чапека [10], г/л: NaNO₃ — 2; KH₂PO₄ — 1; KCl — 0,5; MgSO₄·7H₂O; FeSO₄·7H₂O — 0,015; рамноза — 2,5, рН — 5,5.

Ензимні препарати α-L-рамнозидаз виділяли з культуральних фільтратів продукентів осадженням сульфатом амонію (до 90% насичення) з наступною хроматографією на заряджених і нейтральних TSK-гелях (DEAE-Toyopearl 650s і Toyopearl HW-60, Toyosoda, Японія, відповідно) [11, 12].

α-L-рамнозидазну активність визначали методом Davis [13], використовуючи як субстрат нарингін. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, яка гідролізує в умовах досліду 1 мкмоль субстрату за 1 хв. Реакційна суміш містила 0,1 мл розчину ензиму в 0,1 М фосфат-цитратному буфері (ФЦБ), рН 5,2, 0,1 мл 2,5 мМ розчину субстрату. Суміш інкубували протягом 30 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 3 мл 4 М розчину NaOH. Через 30 хв вимірювали інтенсивність забарвлення реакційної суміші за довжини хвилі 310 нм на спектрофотометрі СФ-26. Специфічна α-L-рамнозидазна активність препарату становила 12 од/мг протеїну (вміст — 0,01 мг/мл) і 120 од/мг для *C. albidus* та *E. erubescens*, відповідно.

Як модифікатори активності ензимів використовували хлоридні, бромідні та ізотіоціанатні комплекси кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами (1)-(12) [14, 15], комплекси кобальту (II, III) з похідними морфолін-4-карбодитіоївої кислоти (13)–(18) [16–18], склад і будову яких наведено на рис. 1, а також CoCl₂ [19].

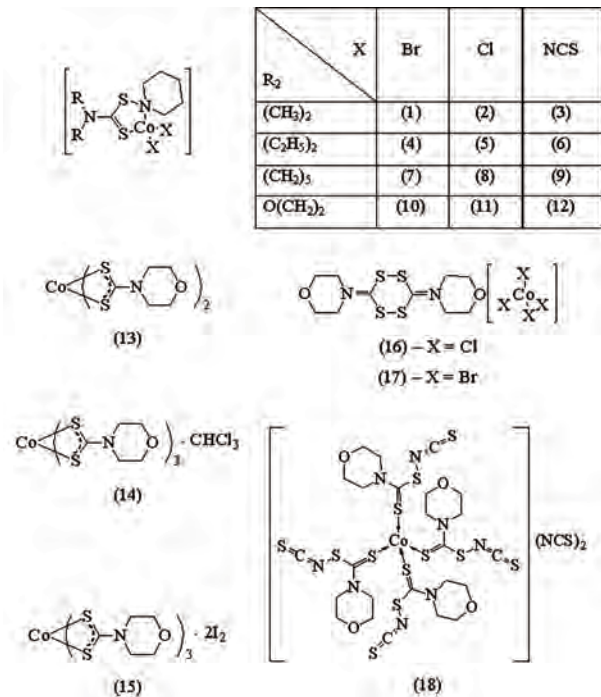
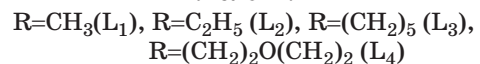


Рис. 1. Склад і будова координаційних сполук кобальту (II, III) з похідними дитіокарбамової кислоти:



Усі сполуки (1)–(18) синтезовано за розробленими методиками, підтверджено їх індивідуальність та здійснено ідентифікацію сукупністю фізико-хімічних методів дослідження: елементного і рентгенофазового аналізів, мас-спектрометрії, спектроскопії (електронної, ІЧ-, ¹H ЯМР-), термогравіметрії, кондуктометрії, магнетохімії [14–18].

Вивчаючи вплив різних сполук кобальту (II, III) на активність ензимів, використовували концентрацію від 0,1 до 0,001%, час експозиції 30–60 хв. Сполуки кобальту (II, III) розчиняли в 0,1% ДМСО. У всіх дослідах за 100% прийнято ензиматичну активність за відсутності сполук кобальту (контроль).

На рисунках наведено середні арифметичні значення за результатами п'яти повторювань, відхилення від середнього значення не перевищувало 5%.

Результати та обговорення

Проведені дослідження показали, що сполуки кобальту (II, III) в концентрації 0,01 і 0,001% неоднаково впливають на активність пептидаз (рис. 2). Еластазна активність, порівняно з контролем неістотно збільшувалась у разі використання сполук (концентрація 0,01%) (1), (7), (9), (12), і значно (у 2, 3 рази) — у випадку (11). Водночас інші сполуки практично не впливали або знижували активність — на ~30% у випадку сполуки (4). Слід зазначити, що в концентрації 0,001% досліджені сполуки можна розташувати в такий ряд за зменшенням їхньої активуючої дії на еластазну активність пептидази 1: (9) > (3) > (1) > (4) > (6) > (11) > (12) > (10) > (8) > (2) > (5) > (7). Слід звернути увагу на те, що сполуки (9), (6), (4) істотно впливають на еластазну активність пептидази 1 за концентрації 0,001% порівняно з концентрацією 0,01%. Варто відзначити, що сполука (19) (CoCl₂) інгібувала еластазну активність пептидази 1 ~30%, а комплекс (1) (12), на відміну від неї, підвищували її, тимчасом як сполуки (13)–(18) — повністю пригнічували. Із цього можна зробити висновок, що вплив має загалом стабільна комплексна молекула (1)–(18), прояв активності якої залежить від ліганду та наявності аніона, зокрема у випадку NCS-аніона [сполуки (9), (3)] вона максимальна.

Найбільш сильний вплив сполуки кобальту (II) справляють на фібринолітичну активність. Так, показано, що максимальна активність пептидази 1 (рис. 3) в 11,2 і 4,5 рази вища за контроль у присутності комплексу (12) в концентраціях 0,01% і 0,001%, відповідно. Фібринолітична активність підвищувалася під дією сполук (1), (5), (6), (7), які активують ензим в 3,5–6 разів, але пригнічувалася за дії сполук (15)–(18) в обох концентраціях на 40–100%. Окрім того, встановлено стабілізуючий вплив сполуки (19), що може також свідчити про вплив різних складових частин молекул комплексних сполук кобальту(II) на активацію або інгібування фібринолітичної активності цього ензиму.

Дослідження впливу сполук кобальту (II, III) на пептидазу 2 показало (рис. 4), що максимальне збільшення фібринолітичної активності відбувається під дією сполук (6) і (18) у концентрації 0,001% і 0,01%, відповідно. Активуючу дію в 1,15–2,0 рази спостерігали і в разі сполук (1), (5), (6), (8), (11), (12) у концентрації 0,01% та в 1,2 рази — (10), (12), (13) у концентрації 0,001%. Було

встановлено інгібуючий вплив сполук (2), (3), (4), (9), (14)–(17) в обох концентраціях. Було також виявлено підвищення на 40% фібринолітичної активності за дії сполуки (19). Це може свідчити про участь кобальту (II) в складі досліджуваних координаційних сполук в активації пептидази 2.

Висока активуюча дія комплексів кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметилсульфенамідами (1)–(12) на еластазну і фібринолітичну активність пептидаз, порівняно з трис(4-морфолінкарбодитіоатом)кобальту (III) (14) і продуктами його взаємодії з галогенами (15)–(17), що спричинюють, навпаки, інгібування, найімовірніше, зумовлена наявністю в них слабого зв'язку S–N, який легко піддається гомолітичному розриву.

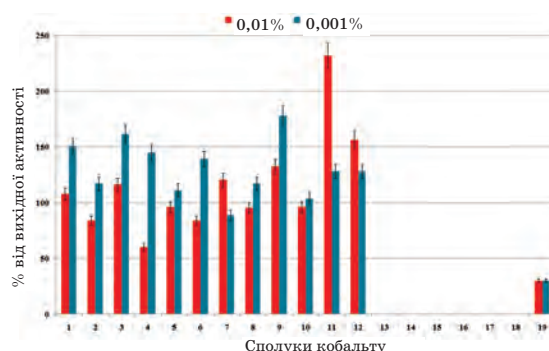


Рис. 2. Вплив координаційних сполук кобальту (II, III) на еластазну активність пептидази 1 *B. thuringiensis*:

тут і на рис. 3–8 за 100% прийнято ензиматичну активність за відсутності сполук кобальту

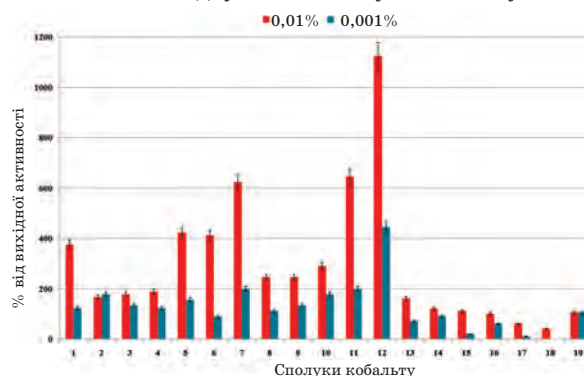


Рис. 3. Вплив координаційних сполук кобальту (II, III) на фібринолітичну активність пептидази 1 *B. thuringiensis*

На активність α -амілази *B. subtilis* 147 і *A. flavus* var. *oryzae* 80428 досліджені сполуки кобальту (II, III) впливали по-різному: виявляли як активуючу, так і інгібуючу дію. Активність α -амілази *B. subtilis* 147 активувалася такими сполуками кобальту (II, III), як (1), (2), (3), (4), (5), (7), (10), (11), (12), (13), (14) у концентрації 0,01%

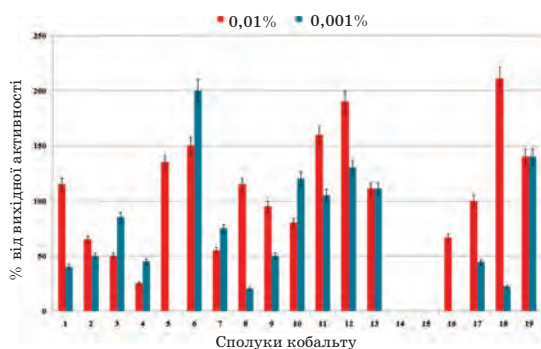


Рис. 4. Вплив координаційних сполук кобальту (II, III) на фібринолітичну активність пептидази 2 *B. thuringiensis*

(активація від 7 до 37%) і (1), (3), (4), (5), (6), (7) за концентрації 0,1% (активація від 3 до 25%). Сполуки (8), (13) (17) у концентрації 0,01% виявляли інгібуючу дію на активність цього ензиму (ступінь інгібування становив 11–51%), а сполуки (2), (13)–(17) у концентрації 0,1% інгібували ензим на 23,5–81% (рис. 5). Вивчення впливу сполук кобальту (II, III) на активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 показало, що перші 12 сполук у концентрації 0,01% активували дію ензиму на 7–21,5%. Слабку інгібуючу дію на активність α -амілази виявляли сполуки (1), (4), (5), (6), (7), (8) (від 5 до 10,5%), більш виражену — сполуки (13)–(18) у концентраціях 0,01% і 0,1% — від 10 до 86%. Виняток становили сполуки (16) і (17), які в концентрації 0,01%, не впливали на активність ензиму (рис. 6).

Отже, найбільшу інгібуючу дію на активність α -амілази *B. subtilis* 147 справляли сполуки (14), (15) (0,01%) — активність знижувалася на 33% і 55%; (13), (14), (15), (16), (17), (18) (0,1%) — активність знижувалася на 24%, 41%, 48%, 33,5%, 81%, 26%, відповідно.

Найбільший інгібуючий вплив на активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae* 80428 мали сполуки (15) (0,01%) — 30% інгібування, а також (13), (14), (15), (17), (18) (0,1%) — 27%, 16%, 85,5%, 86%, 51%, відповідно.

Досліджуючи вплив комплексів кобальту (II) на активність α -L-рамнозидази *C. albidus* та *E. erubescens*, виявили, що більшість сполук інгібують їхню активність (рис. 7 і 8). Причому інгібуюча дія більшою мірою виявляється щодо ензимного препарату *C. albidus*. Сполука (18) у концентрації 0,1% підвищує активність α -L-рамнозидази *E. erubescens* на 10%, а *C. albidus* — на 18%.

Отже, можна констатувати, що характер впливу досліджених комплексів кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметилсульфенамідами змінюється залежно від штаму-продуцента та ензиму.

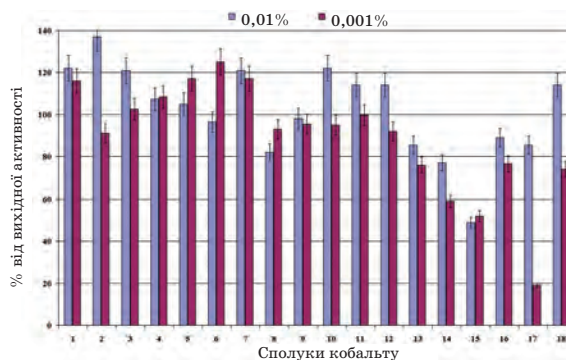


Рис. 5. Вплив сполук кобальту (II, III) на активність α -амілази *B. subtilis*

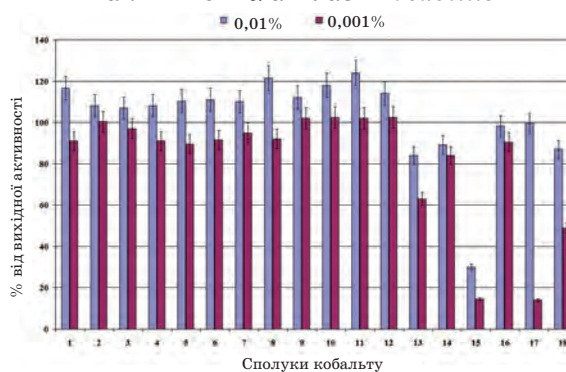


Рис. 6. Вплив сполук кобальту (II, III) на активність α -амілази *A. flavus* var. *oryzae*

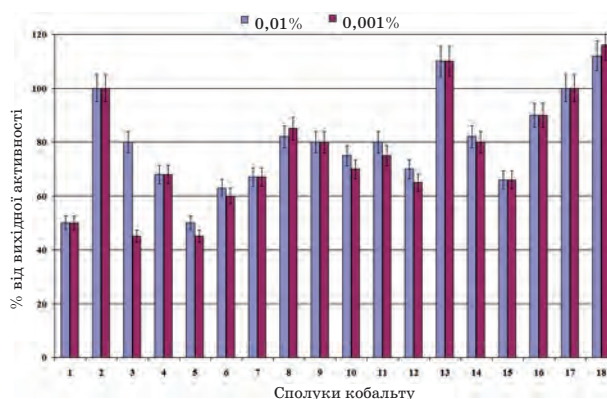


Рис. 7. Вплив сполук кобальту (II, III) на активність α -L-рамнозидази *C. albidus*

За активністю дії на α -L-рамнозидазу *C. albidus* ліганди можна розташувати в такий ряд: $L_1 > L_3 > L_4 > L_2$, а відповідні аніони таким чином: $Cl^- > NCS^- > Br^-$. Порівняно з даними, отриманими раніше для комплексів цинку (II) [1], зазначені ряди змінюються: $L_1 > L_3 > L_2 > L_4$ і: $NCS^- > Br^- > Cl^-$. Дія комплексів цинку (II) на α -L-рамнозидазу *C. albidus* дещо відрізняється від дії комплексів кобальту (II): незважаючи на те, що більшість сполук цинку (II), так само як і кобальту (II), є інгібіторами або діють на рівні контролю, ізотіоціанатні комплекси

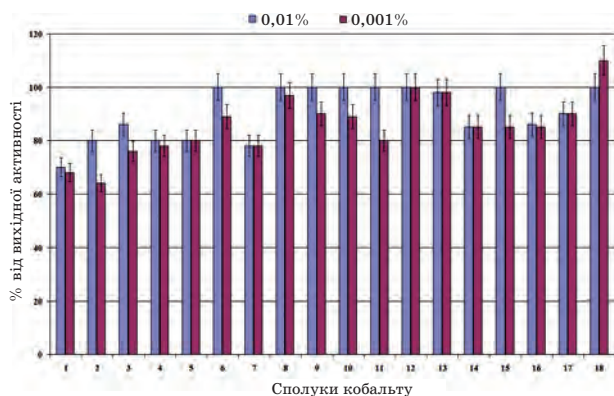


Рис. 8. Вплив сполук кобальту (II, III) на активність α -L-рамнозидази *E. erubescens*

цинку (II) з L_1 та L_3 є активаторами незалежно від часу експозиції.

Щодо дії комплексів кобальту (II) на α -L-рамнозидазу *E. erubescens*, відповідні ліганди зменшують свою активність у такій послідовності: $L_4 > L_3 > L_2 > L_1$, аніони: $NCS^- > Cl^- > Br^-$. Ці ряди мають інший вигляд для комплексів цинку (II): $L_4 > L_1 > L_3 > L_2$ і: $Br^- > Cl^- > NCS^-$. Окрім того, комплекси цинку (II) справляють різноманітну дію на α -L-рамнозидазу *E. erubescens*: інгібуючу — на рівні контролю та активуючу, яка суттєво залежить від часу експозиції, зі збільшенням якого всі сполуки цинку (II) виявилися активаторами.

З проведеного порівняння дії досліджених комплексів кобальту (II) та цинку (II) випливає, що присутність кобальту (II) у складі комплексів надає їм властивості інгібіторів, тимчасом як сполуки цинку (II), залежно від умов, виявляють ще й активуючу дію. Здатність морфолін-4-карбодитіоатів (14), (15) більшою мірою інгібувати активність α -амілази *B. subtilis* 147 та α -L-рамнозидази *C. albidus* порівняно з комплексом (13) можна пояснити різним станом окиснення в них кобальту— III і II, відповідно, і свідчить про те, що процес інгібування/активації має окисно-відновний характер.

Таким чином, хлоридні, бромідні та ізоціанатні комплекси кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами (1)–(12), а також комплекси кобальту (II, III) з похідними морфолін-4-карбодитіоївої кислоти (13)–(18) було вико-

ристано як модифікатори активності ензимів гідролітичної дії — пептидаз *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324, амілаз *Bacillus subtilis* 147 і *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, рамнозидаз *Eupenicillium erubescens* 248 та *Cryptococcus albidus*. Встановлено, що сполуки кобальту (II, III) неоднаково впливають на активність досліджених ензимів, виявляючи як інгібуючу, так і стимулюючу дію. Це дає підстави припустити, що у вияві активності комплексної молекули відіграє роль сумарний ефект від усіх складових комплексів, як лігандів, так і певних аніонів — Cl^- , Br^- або NCS^- . Висока активуюча дія комплексів кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами (1)–(12) на еластазу і фібринолітичну активність пептидази, порівняно з трис(4-морфолінкарбодитіоато)кобальтом (III) (14) і продуктами його взаємодії з галогенами (15)–(17), що спричинюють, навпаки, інгібування, найімовірніше, зумовлена наявністю в них слабого зв'язку S–N, який легко піддається гомолітичному розриву. Досліджуючи вплив комплексів кобальту (II, III) на активність α -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* та *Eupenicillium erubescens*, встановили, що більшість сполук інгібують їхню активність, причому інгібуюча дія більшою мірою виявляється щодо ензимного препарату *C. albidus*.

Отже, можна констатувати, що характер впливу комплексів кобальту (II) з N-заміщеними тіокарбамоїл-N'-пентаметиленсульфенамідами, а також комплексів кобальту (II, III) з похідними морфолін-4-карбодитіоївої кислоти змінюється залежно як від штаму-продуцента, так і досліджуваного ензиму. Відмінність у впливі комплексів на різні ензими зумовлена тим, що вони мають різні будову і функціональні групи активного центру, які також є відповідальними за зв'язування з модифікаторами.

Автори висловлюють подяку співробітникам ІМВ НАН України, які надали для досліджень штами мікроорганізмів: к. б. н. Курченко І. М., к. б. н. Харкевич О. К., к. б. н. Нагорній С. С., к. б. н. Сафроновій Л. А.

ЛІТЕРАТУРА

1. Варбанець Л. Д., Мацелюх Е. В., Гудзенко Е. В. и др. Координационные соединения цинка(II) с N-замещенными тиокарбамоил-N'-пентаметиленсульфенамидами — модификаторы ферментов протеолитического и

гликолитического действия // Укр. біохім. журн. — 2011. — Т. 83, № 3. — С. 25–36.
2. Нідялкова Н. А., Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. Оптимізація середовища для синтезу фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324// Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 4. — С. 74–81.

3. Мацелюх О. В., Нідялкова Н. А., Варбанець Л. Д. Особливості росту і біосинтезу еластази мутантним варіантом *Bacillus* sp. 27-88ELS⁺ // Там само. — 2011. — Т. 4, № 3. — С. 43–50.
4. Мацелюх О. В., Нідялкова Н. А., Варбанець Л. Д. Очистка і фізико-хімічні властивості пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324 з еластазою і фібринолітичною активністю // Укр. біохім. журн. — 2012. — Т. 84, № 6. — С. 25–36.
5. Нідялкова Н. А., Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. Виділення фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324 // Мікробіол. журн. — 2012. — Т. 74, № 5. — С. 10–16.
6. Trombridg G. O., Moon H. D. Purification of human elastase // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 1972. — V. 141, N 3. — P. 928–931.
7. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // Food style. — 2004. — V. 8, N 1. — P. 92–95.
8. Авдюк Е. В., Варбанець Л. Д. Очистка, α -амилаз *Aspergillus flavus* var. *oryzae* и *Bacillus subtilis* и их свойства // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 5. — С. 91–99.
9. ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилалитической активности // Изд-во стандартов. — 1989. — 17 с.
10. Гудзенко О. В., Борзова Н. В., Варбанець Л. Д. Оптимізація умов культивування продуцентів α -L-рамнозидаз — представників різних таксономічних груп мікроорганізмів // Мікробіол. журн. — 2011. — Т. 73, № 3. — С. 46–53.
11. Гудзенко Е. В., Варбанець Л. Д. Очистка и физико-химические свойства α -L-рамнозидазы *Eupenicillium erubescens* // Там же. — 2012. — Т. 74, № 2. — С. 14–21.
12. Гудзенко Е. В., Варбанець Л. Д. Очистка и физико-химические свойства α -L-рамнозидазы *Cryptococcus albidus* // Там же. — 2012. — Т. 74, № 6. — С. 16–23.
13. Davis D. W. Determination of flavonones in citrus fruits // Anal. Chem. — 1947. — V. 19, N 1. — P. 46–48.
14. Сейфуллина И. И., Хитрич Г. Н., Овчаров В. И., Охтина О. В. Синтез и вулканизационная активность N-замещенных тиокарбамоил-N'-пентаметиленсульфенамидов и их бромидных комплексов с кобальтом(II) и цинком(II) // Вопр. химии и хим. технол. — 2010. — № 3. — С. 111–116.
15. Сейфуллина И. И., Хитрич Г. Н., Вологжанина А. В. Молекулярные комплексы хлоридов и бромидов кобальта(II) и цинка(II) с пиперидин-1-ил диметилкарбамодитиоатом (L). Кристаллические структуры L и [ZnLBr₂] // Журн. неорг. химии. — 2011. — Т. 56, № 2. — С. 222–227.
16. Хитрич М. В., Сейфуллина І. Й. Синтез та будова трис(дитіокарбаматів) кобальту(III) // Вісн. Одеськ. нац. ун-ту. Хімія. — 2000. — Т. 5, № 2. — С. 27–32.
17. Хитрич Н. В., Сейфуллина И. И., Старикова З. А. Молекулярные комплексы дитиокарбаматов кобальта(III) с иодом // Журн. неорг. химии. — 2002. — Т. 47, № 1. — С. 85–91.
18. Хитрич Н. В., Сейфуллина И. И. Особенности взаимодействия дитиокарбаматов кобальта (III) с хлором и бромом // Коорд. химия. — 2000. — Т. 26, № 11. — С. 848–853.

КООРДИНАЦИОННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КОБАЛЬТА (II, III) С ПРОИЗВОДНЫМИ ДИТИОКАРБАМОВОЙ КИСЛОТЫ — МОДИФИКАТОРЫ АКТИВНОСТИ ЭНЗИМОВ ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Л. Д. Варбанец¹, Е. В. Мацелюх¹,
Н. А. Нідялкова¹, Е. В. Авдюк¹,
А. В. Гудзенко¹, І. І. Сейфуллина²,
Г. Н. Масановец², Н. В. Хитрич²

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

²Одесский национальный университет
им. И. И. Мечникова

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Хлоридные, бромидные и изотиоцианатные комплексы кобальта (II) с N-замещенными тиокарбамоил-N'-пентаметиленсульфенамидами (1)–(12), а также комплексы кобальта (II, III) с производными морфолин-4-карбодитио-

THE COORDINATION COMPOUNDS OF COBALT (II, III) WITH DITHIOCARBAMIC ACID DERIVATIVES — MODIFIERS OF HYDROLYTIC ENZYMES ACTIVITY

L. D. Varbanets¹, O. V. Matselyukh¹,
N. A. Nidyalkova¹, E. V. Avdiyuk¹,
A. V. Gudzenko¹, I. I. Seifullina²,
G. N. Masanovets², N. V. Khitrich²

¹Zabolotny Institute of Microbiology
and Virology of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

²Mechnikov Odesa National University

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Chloride, bromide and isothiocyanate complexes of cobalt(II) with N-substituted thiocarbamoyl-N'-pentamethylenesulfenamides (1)–(12), and also complexes of cobalt(II, III) with derivatives of morpholine-4-carbodithioic acid (13)–(18) have been used as modifiers of enzymes of hydrolytic action — *Bacillus thurin-*

вой кислоты (13)–(18) были использованы как модификаторы активности энзимов гидролитического действия — пептидаз *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324, амилаз *Bacillus subtilis* 147 и *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428, рамнозидаз *Eupenicillium erubescens* 248 и *Cryptococcus albidus* 1001. Установлено, что соединения кобальта (II, III) неодинаково влияют на активность исследуемых энзимов, проявляя как ингибирующее, так и стимулирующее действие. Это дает основание предположить, что проявление активности комплексной молекулой зависит от лиганда и наличия аниона — Cl^- , Br^- или NCS^- . Высокое активирующее действие комплексов кобальта (II) с N-замещенными тиокарбамоил-N'-пентаметилсульфенамидами (1)–(12) на эластазную и фибринолитическую активность пептидаз, по сравнению с трис(4-морфолинкарбодитиоатом)кобальта (III) (14) и продуктами его взаимодействия с галогенами (15)–(17), которые, наоборот, вызывают ингибирование, вероятнее всего обусловлено наличием в них слабой связи S–N, которая легко поддается гомолитическому разрыву. При исследовании влияния комплексов кобальта(II) на активность α -L-рамнозидаз *Cryptococcus albidus* и *Eupenicillium erubescens* было показано, что большинство соединений ингибируют их активность, причем ингибирующее действие в большей степени проявляется по отношению к энзимному препарату *C. albidus*. Таким образом, можно констатировать, что характер влияния комплексов кобальта (II) с N-замещенными тиокарбамоил-N'-пентаметилсульфенамидами, а также комплексов кобальта (II, III) с производными морфолин-4-карбодитиовой кислоты изменяется в зависимости как от штамма-продуцента, так и исследуемого энзима. Отличие во влиянии комплексов на разные энзимы обусловлено характеристиками строения и функциональных групп активного центра, которые также являются ответственными за связывание с модификаторами.

Ключевые слова: комплексы кобальта (II, III), дитиокарбамовая кислота, энзимы с эластазной, фибринолитической, амилазной и рамнозидазной активностью.

giensis IMB B-7324 peptidases, *Bacillus subtilis* 147 and *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 amylases, *Eupenicillium erubescens* 248 and *Cryptococcus albidus* 1001 rhamnosidases.

It was shown that cobalt (II, III) compounds influence differently on the activity of enzymes tested, exerted both inhibitory and stimulatory action. It gives a possibility to expect that manifestation of activity by complex molecule depends on ligand and anion presence — Cl^- , Br^- or NCS^- . The high activating action of cobalt(II) complexes with N-substituted thiocarbamoyl-N'-pentamethylenesulphenamides (1)–(12) on elastase and fibrinolytic activity of peptidases compared to tris(4-morpholinecarbodithioato)cobalt(III) (14) and products of its interaction with halogens (15)–(17), causes inhibitory effect that is probably due to presence of a weakly S–N link, which is easy subjected to homolytic breaking. The studies of influences of cobalt(II) complexes on activity of *C. albidus* and *E. erubescens* α -L-rhamnosidases showed, that majority of compounds inhibits of its activity, at that the most inhibitory effect exerts to *C. albidus* enzyme. To sum up, it is possible to state that character of influence of cobalt(II) complexes with N-substituted thiocarbamoyl-N'-pentamethylenesulphenamides, and also cobalt(II, III) complexes with derivatives of morpholine-4-carbodithioic acid varies depending on both strain-producer and enzyme tested. The difference in complex effects on enzymes tested are due to peculiarities of building and functional groups of their active centers, which are also responsible for binding with modifiers.

Key words: complexes of cobalt(II, III), dithiocarbamic acid, enzymes with elastase, fibrinolytic, amylase and rhamnosidase activities.