

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	<i>MICROBIAL BIOTRANSFORMATION: A TOOL FOR DRUG DESIGNING (REVIEW)</i> Pervaiz I., Ahmad S., Madni M.A., Ahmad H., Khaliq F.H.	435	0
<input type="checkbox"/>	ЛЕКТИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ КОРРОЗИОННО-АГРЕССИВНЫХ БАКТЕРИЙ Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Войчук С.И., Иутинская Г.А.	450	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В МОЛЕКУЛЕ β - ГЛЮКОЗИДАЗЫ ИЗ THERMOTOGA MARITIME НА ГИДРОЛИЗ ИЗОФЛАВОНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ SOI, СТАБИЛЬНОСТЬ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА Хие Ю., Сонг С., Сун Х., Цао З.	457	0
<input type="checkbox"/>	ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СОЕДИНЕНИЙ С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ НОВОГО ПОЧВЕННОГО ИЗОЛЯТА STREPTOMYCES RIMOSUSMTCC 10792 Сингх Н., Рай В., Трипати С.	467	0
<input type="checkbox"/>	ДЕЙСТВИЕ МАСЕЛ КОРИЦЫ И ЛАВАНДЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА FTSZ STARHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 29 213 Герман А., Боченек Ж., Герман А.П.	476	0
<input type="checkbox"/>	ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ АКТИВНОГО ИЛА ПИЛОТНОЙ УСТАНОВКИ АНАЭРОБНОГО ОКИСЛЕНИЯ АММОНИЯ Козлов М.Н., Кевбрина М.В., Дорофеев А.Г., Казакова Е.А., Грачёв В.А., Поляков Д.Ю., Асеева В.Г., Николаев Ю.А.	481	1
<input type="checkbox"/>	СЕЛЕКЦИЯ СООБЩЕСТВА АЦИДОХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ВЫСОКОЙ СКОРОСТЬЮ БИООКИСЛЕНИЯ ФЛОТОКОНЦЕНТРАТА ПИРРОТИНСОДЕРЖАЩЕЙ СУЛЬФИДНОЙ РУДЫ Кондратьева Т.Ф., Пивоварова Т.А., Булаев А.Г., Мощанецкий П.В., Цаплина И.А., Григорьева Н.В., Журавлёва А.Е., Меламуд В.С., Белый А.В.	491	0
<input type="checkbox"/>	NOVEL MUTATIONS IN β -TUBULIN GENE IN TRICHODERMA HARZIANUMMUTANTS RESISTANT TO METHYL BENZIMIDAZOL-2-YL CARBAMATE Li M., Zhang H.Y., Liang B.	499	0
<input type="checkbox"/>	ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИСОМАЛЬНОЙ КАТАЛАЗЫ ИЗ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ HANSENULA POLYMORPHA Тян Я.С., Сюй Х., Сюй Д., Пенг Р.Х., Яо К.Х.	504	0
<input type="checkbox"/>	СЕКРЕЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ТРЕМЯ ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ Кудрявцева Н.Н., Софьин А.В., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Иевлева Е.В., Валуева Т.А.	513	1
<input type="checkbox"/>	ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ЛИШАЙНИКАХ Буркин А.А., Кононенко Г.П.	522	5
<input type="checkbox"/>	МЕТОД АНАЛИЗА L-АРГИНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АРГИНАЗЫ I Стасюк Н.Е., Гайда Г.З., Гончар М.В.	531	1

УДК 576.80

MICROBIAL BIOTRANSFORMATION: A TOOL FOR DRUG DESIGNING (REVIEW)

© 2013 I. Pervaiz*, S. Ahmad**, M. A. Madni**, H. Ahmad**, and F. H. Khaliq**

* Department of Pharmaceutical Sciences, COMSATS Institute of Information Technology, Abbottabad 22060, Pakistan

** Faculty of Pharmacy and Alternative Medicine, Islamia University of Bahawalpur, Bahawalpur 63100, Pakistan

e-mail: irfanpharmacist@gmail.com

Received November 26, 2012

For centuries microbial biotransformation has proved to be an imperative tool in alleviating the production of various chemicals used in food, pharmaceutical, agrochemical and other industries. In the field of pharmaceutical research and development, biotransformation studies have been extensively applied to investigate the metabolism of compounds (leads, lead candidates, etc.) using animal models. The microbial biotransformation phenomenon is then commonly employed in comparing metabolic pathways of drugs and scaling up the metabolites of interest discovered in these animal models for further pharmacological and toxicological evaluation. Microorganisms can conveniently afford drugs difficult obtained via synthesis. The plethora of reported microbial biotransformations along with its added benefits has already invoked further research in bioconversion of novel and structurally complex drugs. This review alternatively discusses the prospect of microbial biotransformation studies as a significant element ameliorating drug discovery and design in terms of cost-effectiveness, environment protection and greater structural diversity as compared to animal models used to study metabolism. To explicate the microbial biotransformation paradigm in drug designing 3 main areas in this aspect have been analyzed: 1 – lead expansion: obtaining pharmacologically improved metabolites from bioactive molecules; 2 – biosynthesis of precursors/intermediates involved in the production of bioactive molecules; 3 – resolution of racemic mixture to obtain enantiomers possessing different pharmacological profiles.

DOI: 10.7868/S0555109913050097

Biotransformations are chemical reactions catalyzed by microbial cells (growing or resting) or enzymes isolated from microorganisms. Drug biotransformation is generally considered to detoxify the drug to form more polar metabolites which can be easily excreted. However, it can also lead to the formation of metabolites possessing greater pharmacological activity than the parent compound or, alternatively, it may prove to be more toxic [1]. Active metabolites may possess on-target activity (significant or entire contribution in pharmacological action) or off-target activity (unrelated to the activity of the parent drug). In some cases metabolites formed might reverse the action of the parent drug [2].

Animal models (hepatocytes, subcellular fractions, liver slices) have been used extensively for studying drug metabolism but microorganisms could be used for the production of mammalian metabolites too. Cytochrome P450-dependent enzymes have been discovered in a variety of yeast, bacteria and fungi possessing the capability to mimic mammalian metabolic reactions partially or completely. Mammalian biotransformation is generally categorized in the phase I and phase II reactions [1].

Phase I reactions. This type of the reactions is called as functionalization since they introduce a functional group in the molecule resulting in a slight

increase in hydrophilicity and may increase its pharmacological activity. These are further classified as:

Hydrolysis.

– Carboxylesterases, cholinesterases, organophosphotases, e.g. hydrolysis of procaine (used as local anesthetic);

– Peptidases;

– Epoxide hydrolases:

– detoxifying enzyme for epoxides (aromatic, unstable and reactive molecules);

– formation of diols (accessible to phase II).

Reduction (azo- and nitro-reductions)

– Enzymes of intestinal flora (especially in large intestine);

– Cytochrome P450 (usually oxidizing enzyme), has the capacity to reduce xenobiotics under low oxygen or anaerobic conditions;

– Interactions with reducing agents (reduced forms of glutathione, NADP).

Oxidations.

These reactions include hydroxylation, epoxidation, oxidation of alcohols and aldehydes, oxidative degradation of alkyl chains, oxidative deamination.

Phase-II reactions. This type of the reactions generally further increases the hydrophilicity of the drug and facilitates the excretion of the drug and its metab-

olites. They are classified on the basis of conjugation of drug molecule or phase-I metabolite with endogenous substances and include the glucuronide, sulfate, glutathione and amino acid conjugations.

Biotransformation is crucial for estimation of specific clinical parameters of the drugs. High bioavailability and clearance usually results from high metabolism, thus establishing the fact that metabolite studies are an important factor in drug designing [1]. Identification of active metabolite is necessary when a drug exhibits unexpectedly enhanced pharmacological activity *in vivo* [2]. Initially, the purpose of microbial biotransformation was to obtain more active or less toxic metabolites. Metabolites obtained through microbial transformation could help to correlate with those obtained through *in vivo* or *in vitro* animal models. When drug metabolism is studied, microbial biotransformation offers several advantages as compared to mammalian metabolism:

1. Simple and cheap maintenance of microbial cultures as compared to cell or tissue cultures or laboratory animals.
2. Facile repetitive screening process in which different strains are used to metabolize the drug.
3. Novel metabolites showing off-target pharmacology.
4. Novel metabolites superceding the pharmacological activity of its parent molecule.
5. Less toxic novel metabolites as compared to parent molecule.
6. Mild and ecologically harmless reaction conditions (normal pressure, low temperature, neutral pH) for sustainability.
7. Dependence on the nature of the biocatalyst and substrate prediction of the metabolic reactions.
8. Convenient scaling up of the metabolite production for pharmacological and toxicological evaluation, isolation and structure elucidation when parallel animal metabolic studies reveal the required information about the metabolites.
9. Generation of structural diversity in a chemical library through introduction of functional groups at various positions of a drug molecule thus in turn affecting the structure-activity relationships.
10. Suitable alternative where it is tedious to introduce a functional group by chemical methods, e.g. 11- α and or 11- β -hydroxylation of corticosteroids. It also liberates from use of hazardous chemicals and catalysts thus provide a relatively more safe and efficient method.
11. High stereospecificity of reaction due to the complex, three dimensional and asymmetric nature of enzyme enabling to recognize its substrate and even distinguish different stereochemical configurations of the substrate molecule [3].

12. High regioselectivity as an enzyme specifically attacks its substrate at the position where the reaction takes place [3].

13. Mostly mild incubation conditions.

Biotransformation undoubtedly is a phenomenon that engulfs the solutions to major economic and financial problems faced by pharmaceutical industries regarding the discovery and synthesis of new molecules having the desired characteristics to be launched as an active drug in the market. Although biotransformation encompasses various fields and objectives, the focus of this article aims at 3 main objectives: (1) lead expansion: obtaining more active or less toxic metabolites from bioactive molecules; (2) biosynthesis of precursors/intermediates involved in the production of bioactive molecules; (3) stereochemical reactions and resolution of racemic mixture.

LEAD EXPANSION: OBTAINING PHARMACOLOGICALLY IMPROVED METABOLITES FROM BIOACTIVE MOLECULES

Biotransformations enhance the molecular diversity around active core structures after initial screening or after selecting compounds for preclinical development. In the initial lead expansion phase, the biotransformations can be utilized as a tool for drug designing, leading to substitutions at positions difficult to access by synthetic approaches. These derivatives help refine the structure-activity relationships, potentially generating new ideas of compounds to be synthesized. Also, the biotransformations are propitiously combined with synthesis, as in most cases reactions can be applied to related structures, thus multiplying the number of available compounds for screening.

Metabolites exhibiting significant pharmacological activity or less toxicity as compared to parent molecule could be expediently used as leads for drug designing. Structural modification during lead optimization phase of drug discovery might improve desired properties of lead candidates. Accordingly, if a metabolite with ample pharmacological activity and less toxicity is discovered, it might serve as a lead with an additional benefit of advanced properties. Such approach was used in the discovery of ezetimibe, a cholesterol absorption inhibitor [2]. In this study an active metabolite (lead candidate) which was 30 times more potent than the parent molecule was further optimized to produce final drug candidate which was 400 times more potent than the original lead.

Metabolites apart from possessing specific inherent distinction in its chemical characteristics from the parent drug also acquire structural similarity to the parent molecule. Hence, these metabolites show certain pharmacological characteristics similar to the parent molecule. This is mostly observed in simple functionalization reactions, e.g. O-demethylation, N-demethylation,

hydroxylation and dehydrogenation. A minor structural modification of the metabolite may cause loss of potency or modification of pharmacological activity of the parent drug. For example, O-demethylation of venlafaxine leads to an active metabolite but N-demethylation results in loss of activity [2].

Several factors need to be considered during designing drugs via microbial biotransformation. For instance, if functionalization reaction happens at the auxophoric (non-pharmacophoric) group that does not obstruct binding of the parent molecule to the receptor or enzyme, or it leads to optimization of metabolite binding, that could be expected to retain or enhance the activity of the parent compound. On the contrary, a decline in potency is to be anticipated if a functionalization reaction results in the development of auxophoric group that hinders with binding of the drug to the target or a pharmacophoric group undergoes biotransformation.

Metabolites may acquire extensive array of pharmacological activities depending on structural resemblance to the parent molecule and conservation or optimization of bioactive conformation of the parent molecule [2].

For further clarification and comprehension of the concept of biotransformation regarding its pertinence for attaining metabolites of interest from known pharmacologically active compounds or those undergoing clinical trials study of lead expansion phase of drug designing is further divided into 2 categories with regard to the origin of molecule as a natural and synthetic drugs.

Natural drugs. For thousands of years, natural products have played a significant role all over the world in treating and preventing human diseases. Natural product medicines have come from diverse source materials including terrestrial plants, vertebrates, invertebrates and microorganisms and marine organisms [4]. These are additionally classified according to their chemical nature as alkaloids, glycosides, flavonoids and terpenoids.

Alkaloids are a collection of complex nitrogen-containing organic compounds derived from a variety of sources, including microorganisms, marine organisms and plants, via complex biosynthetic pathways. They find a broad range of pharmacological applications in various diseases (malaria, cancer, hypertension) and disorders (Parkinson's disease) [5].

Due to rigid structural conformation of alkaloids, their structural modification was difficult but using the latest molecular techniques such as enzyme expression has eliminated the limits of metabolite designing of alkaloids [5].

El Sayed et al. [6] investigated the transformation of veratramine which is an alkaloid possessing anti-hypertensive and serotonin agonist activity. Out of 25 species that were screened, *Nocardia* species ATCC 21145 metabolized veratramine completely into 3

new metabolites which were subsequently tested for antimalarial activity [7].

Orabi et al. [7] have reported the biotransformation of benzosampangine (a), a semisynthetic derivative of sampangine, which possess antimycobacterial activity (Fig. 1). *Cunninghamella blakesleeana* ATCC 8688a was shown to convert the compound to β -glucopyranose conjugate (b).

Papaveraldine, a minor benzyloquinoline alkaloid isolated from *Papaver somniferum*, was effectively biotransformed to S-papaverinol and S-papaverinol N-oxide by undergoing stereoselective reduction at the ketone group (Fig. 2). Papaveraldine shows antispasmodic effect and protection against histamine-induced bronchospasm. S-papaverinol did not exhibit any significant antimicrobial (against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*), antiviral (against herpes simplex type 1) or antimalarial (against *Plasmodium falciparum* D6 and W2 clones) activities [8]. These microbial biotransformation results of papaveraldine correlated with the previous plant cell transformation studies on papaverine and isopapaverine [9–12].

Herath et al. [13] studied transformation of Harman alkaloids harmaline, harmalol and harman. Harmaline is a potent monoamine oxidase inhibitor and serotonin antagonist having hallucinogenic activity. *Rhodotorula rubra* was selected out of 37 microbes for preparative scale fermentation of harmaline and harmalol. Harmalol transformed into 2-acetyl-3-(2-acetamidoethyl)-7-hydroxy-indole. Fermentation of harmaline by *R. rubra* gave 2-acetyl-3-(2-acetamidoethyl)-7-methoxyindole which demonstrated antibacterial activity against many Gram positive bacteria and reduced toxicity as compared to using *Cunninghamella echinulata* NRRL 3655. Last microorganism completely converted harman into 2 metabolites, 6-hydroxy-harman and harman N-oxide. These may contribute in the elimination of the parent compound as they are more polar.

Bufadienolides are relatively new steroidal compounds derived from the Chinese drug Chan'su. These are C-24 steroids having the distinctive structural feature as a doubly unsaturated 6-membered lactone ring on 17- β -position. They exhibit considerable inhibitory activities against human myeloid leukemia cells and prostate cancer cells [14, 15]. Kamano et al. [16, 17] obtained 80 bufadienolides and studied their structure-activity relationships (SAR) and quantitative structure-activity relationship (QSAR) on the inhibition of colchicines-resistant primary liver carcinoma PLC/PRF/5 cells. It was found that slight changes in functionality of bufadienolides could appreciably modify their cytotoxicities. The critical structural necessities for escalating the inhibitory activities have been recognized. All the test bufadienolides are natural products isolated from Chan'su, or their chemical derivatives, and the oxyfunctionality sites are restrict-

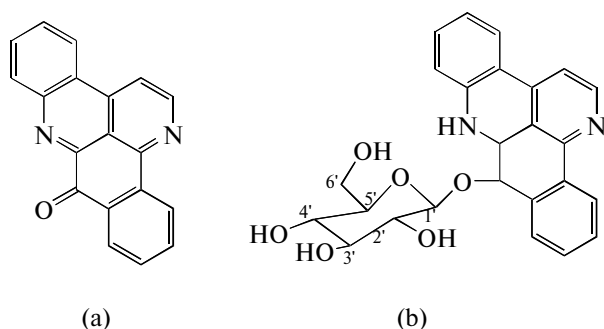


Fig. 1. Structures of benzosampangine (a) and benzosampangine β -glucopyranoside (b).

ed to C-3, C-5, C-15 and C-16-positions. The cytotoxicities of bufadienolides oxygenated at other sites, which are apparently hard to obtain by synthetic techniques remains unknown.

Ye et al. [18] obtained hydroxylated derivatives of bufalin using *Mucor spinosus* as a biocatalyst. The biotransformation products obtained in this study were bufalin derivatives hydroxylated at C-1 β , C-7 β , C-11 β , C-12 β , C-15 α , C-15 β or C-16 α positions. All the oxyfunctionalities apart from 5-hydroxylation are novel for natural bufadienolides, and are obviously difficult to obtain by chemical means. It was discovered that hydroxylation of bufalin at different sites could remarkably modify the cytotoxic activities. 1 β -hydroxybufalin and 12- β -hydroxybufalin showed potent cytotoxicities comparable to bufalin. Both compounds are even more active against the human gastric cancer BGC-823 cells and the human cervical cancer HeLa cells with IC₅₀ values of 8–10 M. Biotransformation of bufalin by *M. spinosus* yielded 12 products including 7 new compounds with novel oxyfunctionalities at 1 β -, 7 β -, 11 β -, 12 β -, and 16 β -positions. The results of cytotoxicities of 30 bufadienolides *in vitro* revealed that 3-OH glucosylation or hydroxylation at C-1 β or C-12 β sites might be promising reactions to obtain more polar bufadienolides with enhanced cytotoxic activities.

Zhang et al. [19] investigated biotransformation of 3 cytotoxic bufadienolides, – resibufogenin, cinobufagin and bufalin, by *Nocardia* sp. NRRL 5646. Resibufogenin notably transformed to a metabolite 3-acetyl 15 β -hydroxy-bufatolin by means of an unexpected 14 β ,15 β -epoxy ring cleavage and acetoxylation at 16-position. This compound exhibited strong inhibitory activities against the human hepatoma HepG2, human gastric cancer BGC-823 and human cervical carcinoma HeLa cells with IC₅₀ values of 2.8, 0.5 and 3.1 μ M, respectively. This increase in cytotoxicity could be attributed to disappearance of 14 β ,15 β -epoxide ring cleavage and presence of 16-acetoxy and 14 β -hydroxyl groups. Cinobufagin and bufalin were

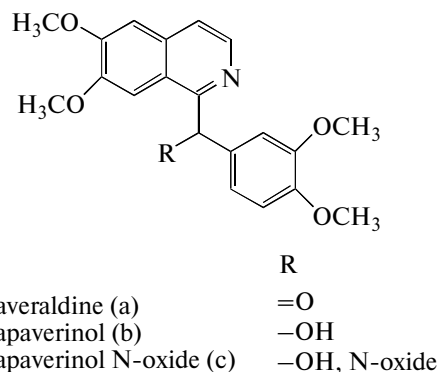


Fig. 2. Structures of papaveralidine (a), S-papaverinol (b) and S-papaverinol N-oxide (c).

biotransformed in parallel studies resulted in the creation of 3-acetylated metabolites which assayed displayed cytotoxicities weaker than their corresponding parent molecules.

The diterpene ent-pimara-8(14),15-dien-19-oic acid has shown growth inhibition of the cariogenic microorganisms with very satisfying minimal inhibitory concentration values ranging from 2.5 to 5.0 μ g/mL [20]. Its metabolism with the aim to produce lead candidates showing better pharmacological characteristics with *Glomerulla cingulata* and *Mucor rouxii* afforded 3 metabolites with one candidate ent-8(14),15-pimaradien-19-ol exhibiting 2–3-fold more activity than its precursor in the time-kill assays [21]. According to Urzúa et al [22], the structural characteristics that endorse the efficient antibacterial activity including significant lipophilicity, capable of insertion into the cell membrane, and one strategically located hydrogen-bond-donor group (HBD; hydrophilic group), which interacts with the phosphorylated groups on the membrane. In this work, it was also emphasized that a second HBD introduced in the lipophilic boundary or the absence of this hydrophilic group in the skeleton led to reduction or inhibition of the activity.

Artemisinin (Fig. 3) has been established as a clinically effective agent for the treatment of chloroquine-resistant malaria, however its low-water solubility has prevented the formulation of an efficient oral dosage form, which consequently has greatly restricted its prevalent use. In addition, it has also proven to be neurotoxic in clinical trials. Hence, it is crucial to have an oral, economical, non-toxic antimalarial drug effective against chloroquine-resistant malaria. As total synthesis of artemisinin does not provide a practical approach for drug design, studies using artemisinin as a natural product scaffold for synthetic manipulation present a logical design approach. Intricacies associated with the synthetic techniques to connect ‘synthetic handles’ to artemisinin are a limitation to an economically feasible production of any potentially effective artemisinin derivatives. Molecular modeling and SAR ex-

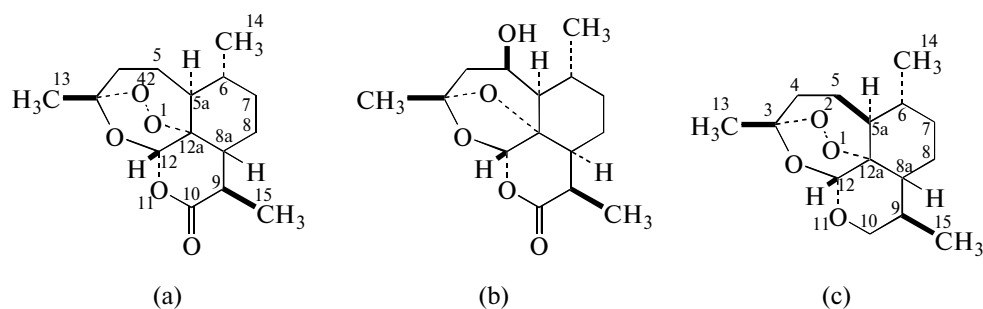


Fig. 3. Structures of artemisinin (a), 5-hydroxyartemisinin (b) and 10-deoxyartemisinin (c).

periments specify that derivatization of artemisinin in positions 4–7 present the greatest potential of enhancing water solubility however preserving its anti-malarial activity. 5- β -hydroxylated derivative of artemisinin has been successfully formed after transformation with *Eurotium amstelodami* and *Aspergillus niger*. Besides this derivative, many other compounds have been produced by SAR guided techniques that exhibit excellent anti-malarial and water solubility profiles [23].

Parshikov et al. [24] have also reported transformation of 10-deoxyartemisinin using *A. niger* into 2 derivatives, 15-hydroxy-10-deoxyartemisinin and 7- β -hydroxy-10-deoxyartemisinin, providing vital scaffolds with the capability of being used for new anti-malarial drugs.

Flavonoids are the most abundant plant derived natural compounds possessing a plethora of unique yet distinct pharmacological uses. Microbes have been extensively used for their derivatization particularly sulfation due to the well-known significance of flavonoid sulfates as potential therapeutic agents [25, 26]. Using *Cunninghamella elegans*, Ibrahim [27, 28] generated sulfated metabolites of naringenin (a potential cytotoxic), chrysin and apigenin, which possess anticarcinogenic, antioxidant, anti-inflammatory activities besides other activities. Certain regiospecificity of the biocatalyst was noted as all of the substrates were sulfated at C-7 position. Naringenin gave only one metabolite, naringenin-7-sulfate. Fermentation of chrysin gave apigenin-7-sulfate and chrysin-7,4'-disulfate, whereas apigenin transformed to apigenin-7-sulfate and apigenin-7,4'-disulfate. The replacement of chemical synthesis of expensive apigenin by a facile and economical biocatalytic technique was developed [28].

The active form of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid, is known to acquire several pharmacological activities such as anti-ulcerative, anti-inflammatory and immunomodulating effects [29] alongside hepatoprotective and significant antiviral activities, possibly due to immunomodulating activity through stimulation of nitric oxide production [30]. NO is a host defence molecule produced by the enzyme NO synthase in different im-

mune cells. It has been identified to inhibit the growth of microorganisms including bacteria, fungi and viruses. Maatooq et al. [30] biotransformed glycyrrhetic acid using 3 microbes which generated 7 metabolites. The major metabolites were 7 β ,15 α -dihydroxy-18 β -glycyrrhetic acid and 1 α -hydroxy-18 β -glycyrrhetic acid. Their hepatoprotective activity was assessed via FeCl₃/ascorbic acid-induced lipid peroxidation of the normal mice liver homogenate. 7 β ,15 α -dihydroxy-18 β -glycyrrhetic acid showed immense antioxidant activity as compared to its precursor and other major metabolites during CCl₄ induced hepatotoxicity test. Both of the metabolites along with glycyrrhetic acid induced NO production remarkably in rat macrophages, thus revealing their potential to be used as efficient hepatoprotective agents.

Hydroxylation and O-methylation of baicalin and baicalein has been observed as an increase of antioxidant activity might be according to hydroxylation in flavones system especially B ring [31]. Baicalin upon fermentation with *Coryneum betulinum* yielded 4',5,6,7-tetrahydroxyflavone whereas *Chaetomium* species yielded 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone. Fermentation of baicalein with *Chaetomium* species and *Cryptosporiopsis radicola* gave only 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone. *Penicillium chrysogenum* biotransformed baicalein to 5,7-dihydroxy-4',6-dimethoxyflavone and one metabolite observed with *Chaetomium* species. High regiospecificity was observed for methylation as only C-6 in the A ring underwent methylation [32]. Cannflavin A and B, two methylated isoprenoid flavones, represent the first aglycone flavonoids isolated from *Cannabis sativa*. Efficient antileishmanial activity for cannflavin A and B was reported [33] as IC₅₀ 10.3 and 13.6 μ M, respectively. Incubation of cannflavin A with *Mucor ramanianus* yielded 6''S,7''-dihydroxycannflavin A, 6''S,7''-dihydroxycannflavin A 7-sulfate and 6''S,7''-dihydroxycannflavin A 4'-O- α -L-rhamnopyranoside [34]. *Beauveria bassiana* transformed cannflavin B to 7-O- β -D-4'''-O-methylglucopyranoside and 7-sulfate. These products were subsequently evaluated for their

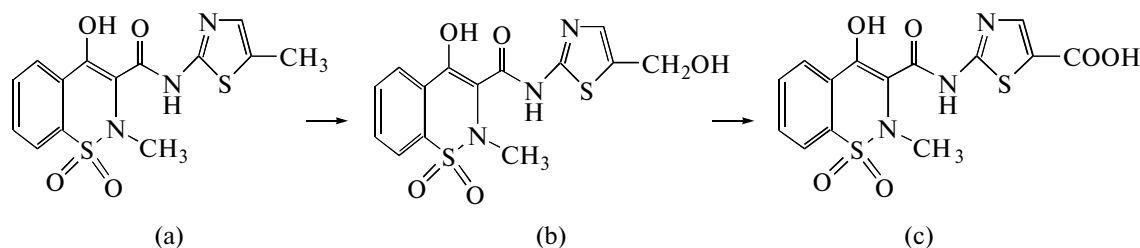


Fig. 4. Structures of meloxicam (a), 5-OH methyl meloxicam (b) and 5-carboxy meloxicam (c).

antifungal, antibacterial antimalarial and antileishmanial activity.

Steroids are the pioneer compounds which proved to be ideal substrates for biocatalysts, thus paving the way for infinite possibilities garnered by the technique of biotransformation. Prednisone was metabolized by *C. elegans* into 2 metabolites: 17,21-dihydroxy-5-pregn-1-ene-3,11,20-trione and 17,20S,21-trihydroxy-5-pregn-1-ene-3,11-dione. Upon incubation with 3 other fungi (*Fusarium lini*, *Rhizopus stolonifer*, *Curvularia lunata*) afforded a single metabolite 1,4-pregnadiene-17,20S,21-triol-3,11-dione. This compound proved to be a more potent inhibitor of arachidonate 5-lipoxygenase as compared to prednisone [35].

Mestranol, a well recognized contraceptive, was transformed by *Cunninghamella elegans* into 2 metabolites 6 β -hydroxymestranol, a known metabolite, and 6 β ,12 β -dihydroxymestranol, a novel metabolite [36].

7-hydroxy-steroids have been shown to exert neuroprotective effects. In this respect, 5-androstene-3 β ,7 α ,17 β -triol and 5-androstene-3 β ,7 β ,17 β -triol have gained popularity. 5-androstene-3 β ,7 β ,17 β -triol could stimulate concavalin A- and lipopolysaccharide-induced cell proliferation in experiment with cultured murine spleenocytes, and it also countered the effect of cortisol on Con A-activated lymphocyte proliferation as well as glucocorticoid-induced IL-2 and IL-3 production [37–39]. 5-Androstene-3 β ,17 β -diol was synthesized from diosgenin which was then biotransformed to 7-hydroxylated derivatives by *Mucor racemosus* isolated from the soil samples [40].

Recently, Russell et al. [41] have emphasized upon the idea that structural similarity shared by secondary metabolites of the phenyl propanoid pathway consumed in our daily diet with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) lead to the possibility that they could serve as leads to produce analogues corresponding to NSAIDs in their anti-inflammatory mechanisms. 5-5'-linked dimer of ferulic acid, an abundant secondary metabolite commonly found in diet, was selected as lead to produce metabolites. The metabolites formed displayed significant inhibition of prostanoid production.

Synthetic drugs. Using 2 different strains of *Streptomyces griseus* Gurram et al. [42] have observed that

the strain NCIM 2622 biotransformed meloxicam to 5-hydroxymethyl meloxicam (Fig. 4) in a higher yield and 5-carboxy meloxicam in trace amounts. However, the strain NCIM 2623 produced only the first compound in trace amounts. Although oxidative transformations are likely to increase the potency of metabolites, additional pharmacological activities of meloxicam and its metabolites need to be explored. Hence, these studies are in progress [43].

Strong structural resemblance amongst cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors has generated the prospective of their potent analogues via biotransformation [44]. Eight metabolites of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide, – celecoxib, were produced after screening with several microorganisms. The hydroxylated and carboxylated derivatives formed had been shown to possess no inhibitory activity for COX-1 and COX-2. Microbial N-acetyltransferase catalysed N4 acetylation at NH₂ position of sulfonamide group of celecoxib and increased COX-1 and COX-2 inhibitory effects 3.3 times.

Ma et al. [45] have reported 7 metabolites of metoprolol, namely O-desmethylnetoprolol, metoprolol acid, α -hydroxymetoprolol, N-desalkylmetoprolol, deaminated metoprolol, hydroxyl-O-desmethylnetoprolol and glycosylated O-desmethylnetoprolol formed during biotransformation with *C. blakesleeana* provided the opportunity of scaling up the reaction for further pharmacological evaluation and structure elucidation.

Schmitz et al. [46] proposed a viable alternative technique for the synthesis of fexofenadine from terfenadine using a membrane system of *Cunninghamella blakesleeana*. The reaction conditions were optimized and microcrystalline terfenadine was employed to overcome its low water solubility. Although this method failed to produce fexofenadine yet, tertiary butyl alcohol derivative of terfenadine was obtained which upon further reduction and oxidation of reagents could yield fexofenadine. Terfenadine and ebastine are more toxic compared to their active metabolites. Due to arduous chemical synthesis of fexofenadine and carebastine, a facile biocatalytic technique was devised by Mazier et al. [47] in which fermentation media were optimized by the addition of soyabean peptones because of their oxidation inducing capacity. Two bacte-

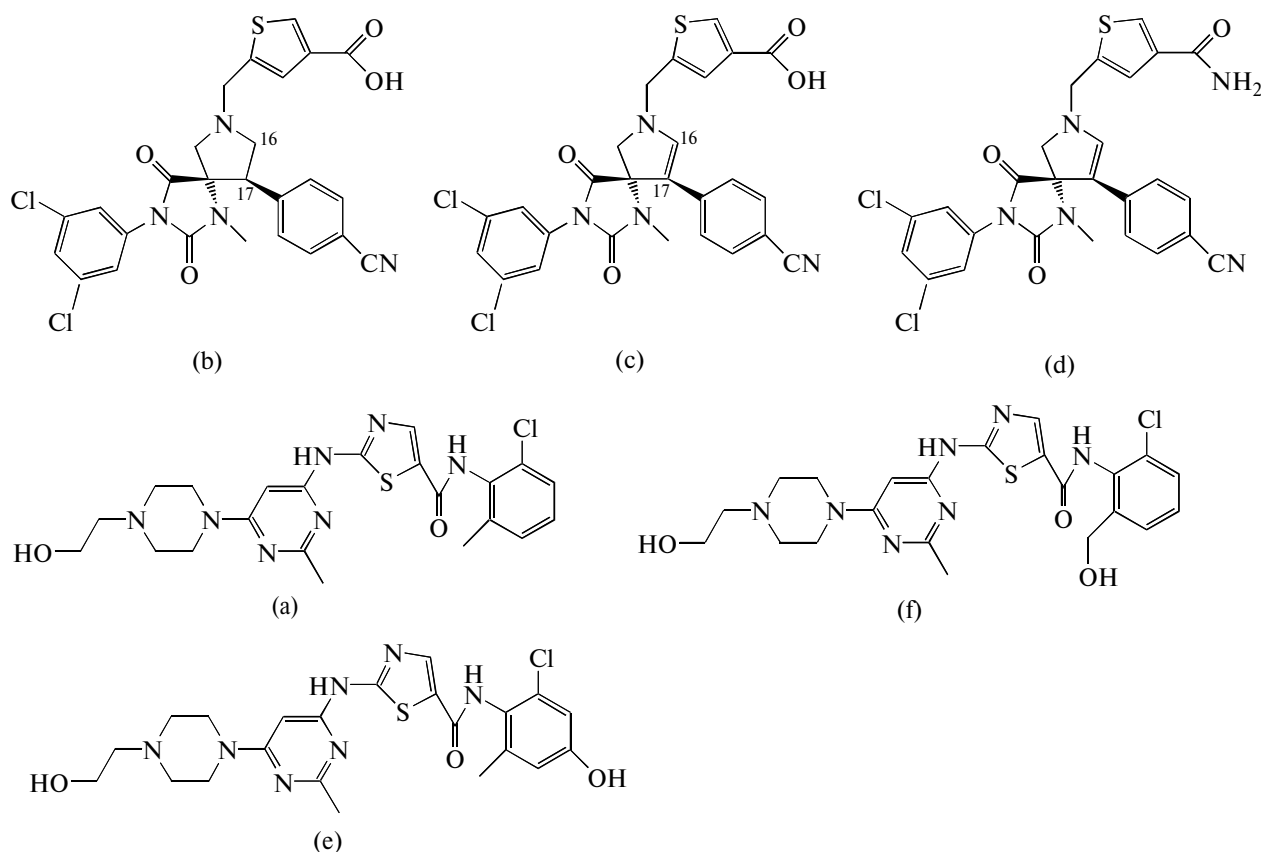


Fig. 5. Structures of dasatinib (a), BMS-587101 (b), M6 (c), amide of M6 (d), M20 (e) and M24 (f).

rial and 3 fungal strains were selected and *Absydia corymbifera* showed the complete transformation of terfenadine and ebastine. Yeast expressing human cytochrome P450 failed to oxidize terfenadine, thus showing its limitation for scaling up the metabolite production. The reason assumed was inability of the substrate to penetrate intact yeast cells [47].

N-acetylation of ciprofloxacin has been reported by *M. rammanianus* thus revealing its possible capability of transforming other fluoroquinolones to N-acetylated derivatives [48].

Albendazole, which is a benzimidazole carbamate, possesses broad antiparasitic activity. Its efficiency is due to its main metabolite, albendazole sulfoxide, which also has significant anthelmintic activity. It has greater water solubility profile as compared to the parent molecule. Twelve different bacteria and 5 actinomycetes cultures were screened to produce novel albendazole metabolites. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* produced albendazole sulfoxide. *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces griseus* transformed albendazole to albendazole sulfoxide and albendazole sulfone [49].

Regioselective oxidation of 3- β -hydroxy-5,16-dien-pregnane-20-one (CDRI 80/574) with *Aspergil-*

lus ochraeus and *A. niger* created 4 metabolites. 11 α , 15 β -Dihydroxy-4,16-dien-pregnan-3,20-dione was a novel metabolite and 3 β ,11 α -dihydroxy-5,16-dien-pregnane-20-one, a common precursor of many hormonal compounds, was also identified. CDRI 80/574 is a compound of pregnane class which exhibits significant lipid profile lowering via farnesoid X receptor antagonism. It has completed phase-III of clinical trials. Hence, its biotransformation is important with regards to correlation with mammalian metabolism and clinical evaluation of the metabolites [50].

Li et al. [51] have performed rapid synthesis of 3 major human circulating metabolites of drugs undergoing clinical trials, dasatinib and BMS-587101 (Fig. 5), by using *Actinomycetes* genera. A 24-well microtiter plate screening system was developed to screen actinomycete strains efficiently to scrutinize their ability to selectively produce metabolites of interest. Actinomycete strains had 2 benefits over fungi as they avoided possible risk of cross contamination and formation of large mycelium aggregates as observed with fungi.

P450 enzymes, as well as other monooxygenases and dioxygenases, have been identified. On the other hand, to prepare specific key mammalian metabolites, it may be helpful to have an array of microbial strains with different specificities for the production of indi-

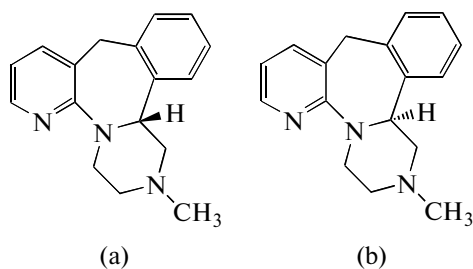


Fig. 6. Structures of R (–)-mirtazapine (a) and S (+)-mirtazapine (b).

vidual metabolites. Selective metabolite formation was demonstrated with diclofenac, the metabolism of which has been well exemplified in diverse biological systems. 24-well microtiter plate system showed that the strains in the wells C2, C5, D1, and D2 selectively prepared 4-hydroxydiclofenac and those in A3, A4 and D5 selectively formed dihydroxydiclofenac but strains in other wells produced non-selectively manifold metabolites. Hence, each actinomycete strain possesses unique oxygenases with different regio- and stereo specificities subsequently corresponding to substrate specificities. So, it is an efficient system ideal for designing the candidate/s of required interest by scaling up the metabolite production with microbes showing enhanced specificity towards the production of desired metabolite/s during screening plate studies. For successful screening plate transformation, it is imperative to consider certain aspects such as selecting strains having the ability to grow in the same medium and possessing the same growth rates. One metabolite of BMS-587101 was determined. It was assumed to be dehydrogenated between C16-C17 after M-S analysis. Enzymes corresponding to human metabolism were identified after transformation of dasatinib as Src and Bcr-Abl-kinases [52].

Metabolites of drugs produced via chemical synthesis or the scaling up of their production from mammalian systems for pharmacological and toxicological evaluation would have been quite expensive. Installation of a double bond between C16-C17 of BMS-587101 through chemical means requires an entirely synthetic route [53]. Therefore, microbial biotransformation method is once again proven to be beneficial in terms of efficiency, safety and cost-effectiveness.

Mirtazapine (Fig. 6) which is commercially available as racemic mixture is clinically used as an antidepressant. Its mechanism of action is attributed to antagonism of α -2 receptors, post-synaptic serotonin type-2 and type-3 receptors, thus reducing undesirable effects [54, 55]. Incubation of racemic mixture of R(–)- and S(+)-mirtazapine with *Cunninghamella elegans* indicated that all the seven metabolites: N-desmethyl-13-hydroxymirtazapine, mirtazapine N-oxide, N-desmethyilmirtazapine, 13-hydroxymirtazapine, 12-hydroxymirtazapine, 8-hydroxymirtazapine as

well as the minor metabolite, N-desmethyl-8-hydroxymirtazapine, were formed from the S(+)-enantiomer, with mirtazapine N-oxide as the major metabolite. The R(–) enantiomer formed N-desmethyl-8-hydroxymirtazapine, mirtazapine N-oxide, N-desmethyilmirtazapine, and 8-hydroxymirtazapine. 8-Hydroxymirtazapine was the major metabolite [54].

BIOSYNTHESIS OF PRECURSORS/INTERMEDIATES INVOLVED IN THE PRODUCTION OF BIOACTIVE MOLECULES

1-chloro-3-(1-naphthoxy)propan-2-one, a chiral halohydrin, is an important precursor of propranolol. This compound could be obtained by resolution of its racemate by lipases but the major disadvantage is that only 50% optically active product is formed. Whereas whole cell catalyst can yield higher than 50% and high e.e. is achieved [56]. The activity of propranolol resides in S-enantiomer *Saccharomyces cerevisiae* along with other microbes due to differing enantioselectivities were screened to analyze whether they converted halohydrin to R or S propranolol with high optical purity. Two models were designed to study reduction capacity of microbes which consisted of actively fermenting cells and fresh resting cells. Cyclohexanone was employed for preliminary necessary assessment of reducing ability of microbes. The reductive action of each strain was calculated as the percentage of cyclohexanone reduced to cyclohexanol, after 48 h of the addition of the ketone (1 g/L) to the Erlenmeyer culture flask. Using the actively fermenting cells model 1-chloro-3-[1-naphthoxy]propan-2-one was reduced to R-propranolol by *S. cerevisiae* 1317, *Saccharomyces bayanus* 1969, *Psilocybe mexicana* 11015, *Yarrowia lipolytica* 1240. On the other hand, *S. cerevisiae* Type II afforded the S-enantiomer. Production of 2 different enantiomers could be attributed to different enantioselectivities of different enzymes. In fresh resting cells model better results were achieved with cyclohexanone reduction, especially in case of *P. mexicana* 11015 and *Y. lipolytica* 1240. However, the stereoselectivity of the halohydrin precursor reduction in both experimental designs was almost the same. When considering 2 parameters, yield and e.e., resting cells gave better results. *Y. lipolytica* 1240 and *P. mexicana* 11015 gave excellent yields and e.e. which proves that these strains could be used for scaling up the production of S- or R-propranolol from 1-chloro-3-(1-naphthoxy)propan-2-one [57].

Benzohydroxamic acids have an attractive pharmacological profile which comprises of activities such as antimicrobial, antifungal, antifeedant, phytotoxicity and insecticidal [58]. The synthesis of 2,4-dihydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (D-DIBOA) involves 2 steps: (1) nucleophilic substitution of side chain on nitrophenol using ethyl bromoacetate as the reagent and (2) nitro group reduction followed by in-

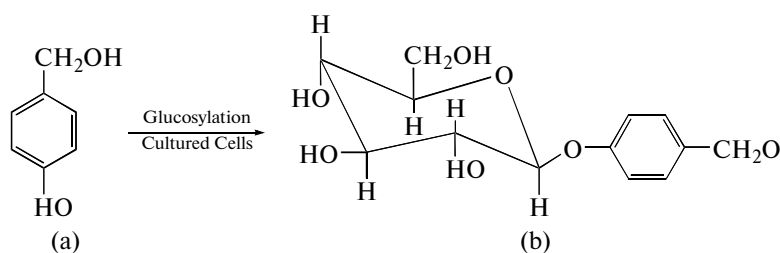


Fig. 7. Structures of *p*-hydroxybenzyl alcohol (a) and gastrodin (b).

tramolecular addition/removal of the ethyl chain from the ester [59]. Vallea et al. [60] have discovered an efficient biocatalytic technique that could replace second step of the chemical synthesis as it employs the use of Pd/C as catalyst and is exothermic in nature. *E. coli* and *Serratia marcescens* were the two strains selected for reduction of the precursor molecule, ethyl 2-(2'-nitrophenoxy)-acetate, as they have previously been used to reduce trinitrotoluene having a structure analogous to D-DIBOA precursor. Esteve-Núñez et al. [61] have demonstrated that nitro group reduction occurs via a hydroxylamine formation which further suggested the possibility of successful biocatalytic substitution of second step of synthesis. *E. coli* efficiently reduced the precursor to D-DIBOA but the yield of the process remained ineffective. It was assumed that nitroreductases presented in strains are most likely responsible for reducing the precursor. Future experiments aim at optimization of variables and identification of enzymes responsible for reduction.

Gastrodin (Fig. 7) is the major constituent of the herb *Gastrodia elata* Blume. This plant has various clinical application such as sedative, anesthetic, memory enhancement, neuroprotection, anticonvulsant and free radical scavenging activities have been reported [62–66]. Zhang et al. [67] have demonstrated a simple microbial bioconversion of *p*-2-hydroxybenzyl alcohol (HBA) to gastrodin which can replace the synthetic technique.

Preliminary screening demonstrated *Armillaria luteo-virens* Sacc gave excellent transformation rate of HBA. This study took into account various parameters which optimized the gastrodin production. Maintenance of substrate concentration and inoculums size and addition of Tween 80 and oleic acid facilitated in achieving maximal gastrodin concentrations for 5 days. This simple novel biotransformation method could be scaled up conveniently and can also be applied for C-11 hydroxylation of steroids or related compounds [67].

Abel et al. [68] have reported the N- and O- demethylation of a thebaine derivative which yielded 3 potential buprenorphine intermediates. N- and O-demethylation via chemical route requires expensive and deleterious reagents and gives poor yields. Fungi of *Cunninghamella* species gave significant results. Fur-

thermore, process optimization and product characterization has improved the yield of N-demethylated compound from 39 to 94%. Two biotransformation pathways have been recognized which include a major one resulting in N-demethylated product and a minor one resulting in formation of N,O-didemethylated product. N-demethylation occurred more prominently at 32°C while N,O-demethylation was found at 28°C. The reason assumed was decreased methyl transferase activity. Cytochrome P450 was deduced to be responsible for N-demethylation as its inhibition by 1-aminobenzotriazole and metyrapone completely inhibited the reaction [69].

Ezetimibe is a potent inhibitor of biliary and dietary cholesterol absorption from small intestine but it does not affect absorption of bile acids, glycerol, and fat-soluble vitamins. As a matter of fact, its exact mechanism of action is yet to be discovered [70]. It has been suggested that it exerts effects through inhibition of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase resulting in decreased low density lipoprotein (LDL) and Very low density lipoprotein (VLDL) production. Chiral alcohols serve as critical building blocks to synthesize pharmaceuticals demonstrating high enantiomeric purity [71]. In order to achieve economical, effective and conveniently scalable techniques for production of chiral pharmaceutical intermediates, enantioselective bioreduction has acquired significance [72]. Optimized reaction of 1-(4-fluorophenyl)-5-(2-oxo-4-phenyl-oxazolidin-3-yl)-pentane-1,5-dione (FOP dione) (Fig. 8) to give 3-[5-(4-fluorophenyl)-5-(S)-hydroxypentanoyl]-4(S)-4-phenyl-1,3-oxazolidin-2-one (FOP alcohol), a vital intermediate needed for ezetimibe synthesis produced excellent enantioselectivity and the higher yield due to oxidoreductase activity improvement [73]. It was observed that fructose when used as a carbon source maximized enzyme activity up to $[(5.07 \pm 0.028) \mu\text{mol}/\text{min g} \times 5 \times 10^{-3}]$ and cell mass up to $(8.01 \pm 0.14) \text{ g/L}$. Organic nitrogen sources supported cell growth but inorganic sources had no effect. Copper, zinc and potassium ions inhibited enzyme activity but 1.2 mM of Fe^{+3} was optimum for enzyme induction. Optimum bioreduction was achieved at pH 8.0, 40°C, a cell concentration of 250 mg/mL

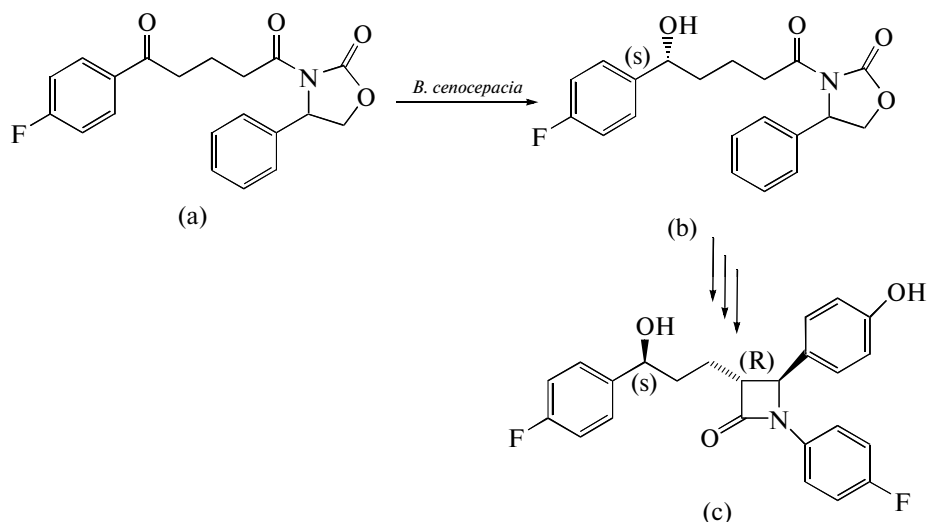


Fig. 8. Structures of 1-(4-fluorophenyl)-5-(2-oxo-4-phenyl-oxazolidin-3-yl)-pentane-1,5-dione (FOP dione) (a), 3-[5-(4-fluorophenyl)-5(S)-hydroxypentanoyl]-4(S)-4-phenyl-1,3-oxazolidin-2-one (b) and ezetimibe (c).

and agitation rate of 200 rpm. 54% chirally pure alcohol with >99% enantioselectivity was yielded which established *Burkholderia cenocepacia* as a harmless, efficient and potential biocatalytic substitute to hazardous and toxic Pd/C catalyst used for FOP dione reduction.

Alternatively, Kyslíková et al. [74] have analyzed the stereoselective reduction capacity of ketoreductase positive microbes using a carboxybenzyl protected form and unprotected form of the ketone 1-(4-urophenyl)-3(R)-(3-oxo-3-(4-uorophenyl)-propyl)-4(S)-(4-hydroxyphenyl)azetidin-2-one (ezetimibe). Initial microbial screening of 230 microbes revealed *Rhodococcus fascians* MO22 had significant reduction capacities. Further optimization of the reaction parameters using above mentioned microorganism displayed that at pH 7.0 and 30°C using glucose or glycerol (50 g/L) as an enzyme inducer reduced 95% of the unprotected ketone and 63% of protected ketone with 20% suspension of cells.

RESOLUTION OF RACEMIC MIXTURE TO OBTAIN ENANTIOMERS POSSESSING DIFFERENT PHARMACOLOGICAL PROFILES

Optically pure single enantiomers cause less side effects as compared to their corresponding racemates [75]. Henceforth, the aim to design drugs with high enantiopurity and their corresponding unique activity profiles by means of racemate resolution has gained momentum [76]. Biocatalysts are imperative to achieve this objective as they surpass chemical catalysts once again for achieving the higher enantiomeric ratio (E) and enantiomeric excess (e.e) values.

Commercial enzyme preparations though offer an effective substitute, it often becomes difficult to obtain

enzyme preparations possessing both enantioselectivity and kinetic resolution activity for racemates that are unnatural substrates. Lipases have been broadly used in enantioselective hydrolysis reactions to obtain the desired optically active acids or alcohols. Esterases contrarily inspite of their great biocatalytic capacity have been less used.

Ketoprofen which belongs to 2-arylpropionic acids is a racemic mixture. It inhibits prostaglandin synthesis and is used clinically as an anti-inflammatory and an analgesic compound. Its anti-inflammatory action is regarded to its S-enantiomer. Nevertheless, R-enantiomer has shown to possess some analgesic and antipyretic activity [77]. Gong et al. [78] have prepared R-enantiomer using racemic 2-ethyl ester of (R)-ketoprofen-2-(3-benzoylphenyl)propionic acid as substrate for *Citeromyces matriensis* CGMCC 0573. Careful microbial screening exhibited that most organisms had a natural tendency towards hydrolysis of S-enantiomer or they had a nonselective hydrolytic approach towards ketoprofen ester whereas microbes containing R-isomer hydrolyzing esterases were rare. Optimized conditions were maintained to enhance expression of esterase activity. Carbon sources had no effect but yeast extract as a nitrogen source proved effective. Isopropanol significantly reduced enzyme activity. The limitation of poor water solubility of ketoprofen was overcome by subsequent addition of ethanol and Tween 80 alternatively as this strategy eradicated the microbes using additives instead of substrate as an energy source. Tween 80 was assumed to contribute greatly to the ester hydrolysis by increasing membrane permeability of the yeast cells, inducing enzyme biosynthesis, providing carbon source for cell growth. Thus, Tween 80 enhances reaction rates. Characterization of esterase of *C. matriensis* CGMCC 0573 and its function regarding production

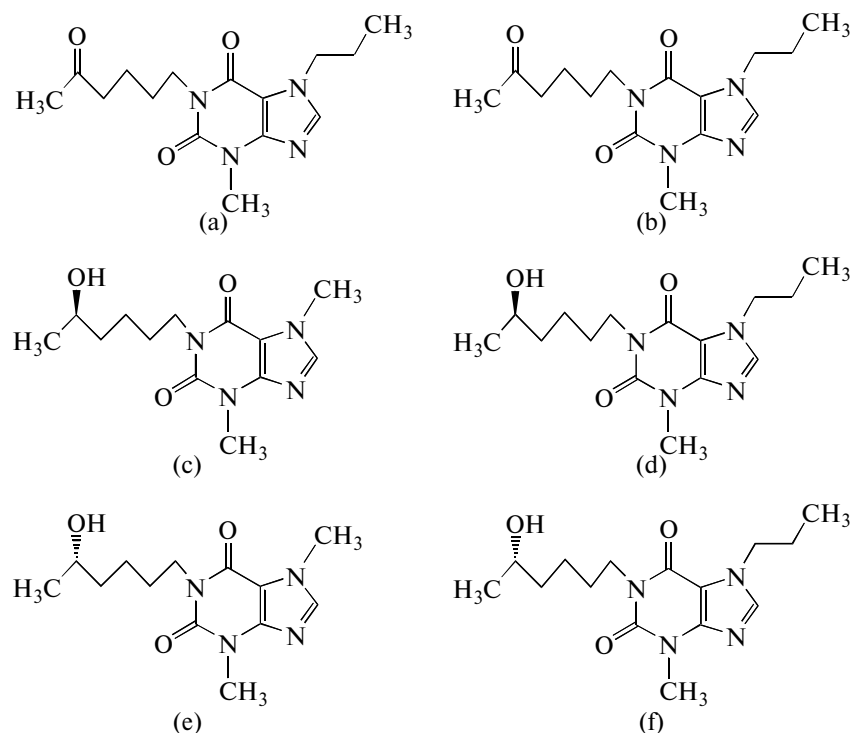


Fig. 9. Structures of pentoxifylline (PTX) (a), propentofylline (PPT) (b), lisofylline (LSF-(R)-OHPTX) (c), hydroxypropentofylline (1-(5-hydroxyhexyl)-3-methyl-7-propyl-xanthine) (R) – OHPPT (d), hydroxypentoxifylline (1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethyl-xanthine) (S) – OHPTX (e) and hydroxypropentofylline (1-(5-hydroxyhexyl)-3-methyl-7-propyl-xanthine) (S) – OHPPT (f).

of R-ketoprofen are underway by the authors. Liu et al. [79] have focused on clinical importance of S-ketoprofen and directed their approach in developing a convenient method to obtain S-isomer by the mutant strain *Trichosporon laibacchii*. Racemic ketoprofen ester is hydrolyzed to yield a biotransformed broth consisting of ketoprofen acid considerably supplemented with S-isomer and ketoprofen ester considerably supplemented with R-isomer. The remaining ketoprofen ester after the biotransformation can be promptly purified, racemized and recycled to be used in further biotransformations to diminish raw-material costs. Procedure of optimization afforded to get satisfactory results in which E was 82.5 with an e.e. of 0.94. The two different procedures of biocatalytic resolution of ketoprofen ester are a vivid exemplification of stereospecificities of enzymes which in turn depend on their specific type or nature and direct their preference towards the formation of particular enantiomer from a racemic mixture.

Ibuprofen is a significant member of NSAIDs belonging to the 2-arylpropionic acids (profens family). Its anti-inflammatory activity is also believed to reside in S (+)-enantiomer. Microbial lipases have a great prospective for commercial uses because of their stability, enantioselectivity and broad substrate specificity. Chiral resolution of racemic ibuprofen via lipases is documented. Lipase from *Aspergillus niger* AC-54 spe-

cifically esterifies R (–)-ibuprofen and that afforded the best results in terms of enantioselectivity and thermostability as compared to other native lipases [80,81]. Carvalho et al. [82] have studied the characterization of parameters effecting the enantioselective resolution of (R,S)-ibuprofen by this lipase and optimized the technique of obtaining a cost-effective enzymic esterification. Variables influencing the control of the resolution of (R,S)-ibuprofen by lipase *A. niger* (such as enzyme concentration and ratio molar propanol : ibuprofen) were assessed. This experimental study provided a great contrivance to optimize the esterification conditions that allow an essential development of the enantiomeric excess of active (S)-ibuprofen and enantioselectivity of lipase in this process. Under optimum conditions, a fine enantioselective resolution of (R,S)-ibuprofen has been attained, which is significantly advanced previously reported results using this lipase.

β -blockers are drugs that antagonize the effects of catecholamines on β_1 and β_2 receptors. Atenolol and propranolol (Prop) are the most commonly used β -blockers which are used as racemic mixtures for their basic clinical effect i.e. hypertension. The biological activity of β -blockers resides mostly in S-enantiomer. Damle et al. [83] have successfully achieved high e.e. values for S-isomer of both atenolol and Prop employing resolution capacities of *Rhizopus ar-*

rhizus and *Geotrichum candidum*. Comparative studies performed showed that incubation of pure racemate of β -blockers furnished better results than corresponding esters of β -blockers. Thus, the superiority of the microbial transformation over other biological models (enzymes, mammals) was demonstrated in terms of cost-effectiveness, less time consumption and single step synthesis.

Endophytic fungi are a remarkable source for microbial biotransformation but they have been less investigated. The term endophytic fungus has been applied to those fungi which can be noticed at a specific moment in the tissues of apparently healthy plant host [84]. Kinetics of Prop transformation by some endophytic fungi has been recently evaluated which monitored metabolite concentrations as well as formation and consumption of metabolites corresponding to time. All endophytic fungi utilized had the ability to enantioselectively biotransform Prop to the active metabolite 4-OH-Prop. *Glomerella cingulata* showed significance for the production of the active enantiomer of the metabolite by transforming (–)-(S)-Prop to (–)-(S)-4-OH-Prop within 24 and 72 h of incubation. (+)-(R)-4-OH-Prop metabolite was formed after 72 h. *Aspergillus fumigatus* and *Chaetomium globosum* showed higher enantioselectivity in the production of the (–)-(S)-metabolite after 144 h of incubation [85]. These fungi have also been employed to biotransform enantioselectively thioridazine which is a phenothiazine neuroleptic used for psychiatric disorders such as schizophrenia. It is commercially available as a racemic mixture of (–)-(S) and (+)-(R)-enantiomers. *In vivo* experiments demonstrated sulfated metabolites to be pharmacologically active which are generated via oxidation of sulfur at 2-position producing thioridazine-2-sulfoxide (THD-2-SO). This metabolite undergoes additional oxidation to become sulfone THD-2-SO₂. Cardiotoxic effect of thioridazine is attributed to its metabolite THD-5-SO. The fungi used oxidized thiomethyl substituent at position 2 and sulfur at position 5 of phenothiazine ring. *Diaporthe phaseolorum* biotransformed (S)- and (R)-THD in relative amounts. The 2-sulfoxidation occurred with higher preference resulting in the R configuration of the sulfoxide to form (S,R)-THD-2-SO and (R,R)-THD-2-SO. Among all fungi evaluated, *A. fumigatus* exhibited higher formation of (S,S)-THD-2-SO and (R,R)-THD-2-SO metabolites. The 5-sulfoxidation in the thiazine ring was less [86].

Buspirone is an anxiolytic and antidepressant which most probably exerts its effects after binding to 5HT_{1A} receptor. Liver cytochrome P450 3A4 metabolizes the drug generating its major metabolite 6-hydroxybuspirone which is present at 30–40 times higher concentration in human blood and thus it may be responsible for the clinical actions of the drug. Both the (R)- and (S)-enantiomers of 6 hydroxybuspirone separated by chiral HPLC, showed considerable potency in tests using a rat model of anxiety [87, 88]. While the (R)-enantiomer demonstrated rather strong

binding and specificity for the 5HT_{1A} receptor [89], the (S)-enantiomer had the benefit of being cleared more slowly from the blood [90]. Hanson et al. [89] have reported hydroxylation of buspirone to (S)-6-hydroxybuspirone directly by means *Streptomyces antibioticus* ATCC 14980. (S)-6-Hydroxybuspirone was also afforded enzymatically by the enantioselective hydrolysis of racemic 6-acetoxybuspirone using L-amino acid acylase. Hydrolysis of the isolated (R)-acetate yielded (R)-6-hydroxybuspirone.

Pentoxifylline (PTX: 1-(5-oxohexyl)-3,7-dimethyl-xanthine) and propentofylline (PPT: 1-(5-oxohexyl)-3-methyl-7-propyl-xanthine) are derivatives of theobromine which inhibit phosphodiesterase (Fig. 9). These drugs inhibit the transcription of the gene responsible for tumor necrosis factor (TNF- α) synthesis. As non-specific phosphodiesterase inhibitors, they enhance the cAMP level in the cells, by this means inhibiting the synthesis of TNF- α , IL-1b, IL-6 and IL-8 [90, 91].

Hydroxypentoxifylline (OHPTX: 1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethyl-xanthine) and hydroxypropentofylline (OHPPT: 1-(5-hydroxyhexyl)-3-methyl-7-propyl-xanthine) are pharmacologically important derivatives. The (R)-enantiomer of the OHPTX active metabolite, called as lisofylline (LSF), is a lysophosphatidic acid acyl-transferase inhibitor recognized as a drug candidate for the prevention of treatment-related toxicity in cancer patients [92, 93] and bone marrow transplant recipients [94]. Racemic OHPPT increases cerebral blood flow, but the (R)-enantiomer of OHPPT is three times more effective compared to the S-enantiomer in stimulating cerebral blood flow [95]. Pekala et al. [96] used *C. echinulata* NRRL 1384 to biocatalyze the (S)-oxidation of the racemic hydroxy metabolites OHPTX and OHPPT and for (S)-reduction of PTX and PPT. The biotransformation of (\pm)-OHPTX gave an (R)-enantiomer (LSF) with an enantiopurity of approximately 93% e.e. compared to the bioconversion of (\pm)-OHPPT, where the greatest e.e. value for (R)-OHPPT was confirmed at 83%. Augmenting the bioconversion with glucose gave 47–51% yields and 80–93% e.e. values analogous to those obtained with no glucose.

* * *

Microbial biotransformation as a fundamental process has gained significant momentum whether it is concerning correlation studies with other *in vitro* (animal tissue, plant tissue, etc.) and *in vivo* (animals, humans) models or discovering metabolites superior from their predecessors in terms of activity, toxicity, pharmacokinetic and physicochemical parameters. However, no *in vitro* model could ever totally replace *in vivo* models as their predictive values are often questionable due to differing enzymology, physiology, reaction conditions etc.

Various drugs are transformed to active metabolites that may considerably participate in displaying overall pharmacology or adverse effects. They may inherit the exact pharmacological behavior with the added benefit of better safety and pharmacokinetic profile. On the contrary, they may exhibit pharmacological pattern differing significantly from the parent molecule. Active metabolites can be subjected to further structural modifications resulting in optimization of properties of parent molecule. The present review has shed light upon 3 important routes for designing therapeutic molecules. The numerous examples given above lead us to the conclusion that microbial biotransformation can prove to be an ideal tool for drug designing as it is cost effective, less hazardous environment friendly and easily scalable for metabolite production.

REFERENCES

- Venisetty, R.K. and Ciddi, V., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2003, vol. 4, no. 3, pp. 153–167.
- Fura, A., *Drug Discov. Today*, 2006, vol. 11, no. 3/4, pp. 133–141.
- Leuenberger, H.G.W., *Pure Appl. Chem.*, 1990, vol. 62, pp. 753–768.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M. *Nat. Prod. Rep.*, 2000, vol. 17, no. 3, pp. 215–234.
- Rathbone, D.A. and Bruce, N.C., *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002, vol. 5, no. 3, pp. 274–281.
- El Sayed, K., *J. Nat. Prod.*, 1998, vol. 61, no. 1, pp. 149–151.
- Orabi, K.Y., Li E., Clark, A.M., and Hufford, C.D., *J. Nat. Prod.* 1999, vol. 62, no. 7, pp. 988–992.
- El Sayed, K.A., *Phytochemistry*, 2000, vol. 53, no. 6, pp. 675–678.
- Bister-Miel, F., Agier, C., Bury, M., Postaire, E., Guignard, J.L., and Viel, C., 1986, *Plant Med. Phytother.*, vol. 20, no. 1, pp. 3–7.
- Christinaki, H., Bister-Miel, F., Hammoumi, A., Bury, M., Guignard, J.L., and Viel, C., 1987, *Phytochemistry*, vol. 26, no. 11, pp. 2991–2994.
- Dorisse, P., Gleye, J., Loiseau, P., Puig, P., Edy, A.M., and Henry, M., 1988, *J. Nat. Prod.*, vol. 51, no. 3, pp. 532–536.
- Rideau, M., Morard, P., Gansser, C., Chenieux, J.C., and Viel, C., 1988, *Pharmazie*, vol. 43, no. 5, pp. 332–334.
- Herath, W., Mikell, J.R., Ferreira, D., and Khan, I.A., *Chem. Pharm. Bull.*, 2003, vol. 51, no. 6, pp. 646–648.
- Nogawa, T., Kamano, Y., Yamashita, A., and Pettit, G.R., *J. Nat. Prod.*, 2001, vol. 64, no. 9, pp. 1148–1152.
- Yeh, J.Y., Huang, W.J., Kan, S.F., and Wang, P.S., *The Prostate*, 2003, vol. 54, no. 2, pp. 112–124.
- Kamano, Y., Kotake, A., Hashima, H., Inoue, M., Morita, H., Takeya, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, vol. 6, no. 7, pp. 1103–1115.
- Kamano, Y., Yamashita, A., Nogawa, T., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H. et al., *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45, no. 25, pp. 5440–5447.
- Ye, M., Qu, G., Guo, H., and Guo, D. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2004, vol. 91, no. 1–2, pp. 87–98.
- Zhang, J., Sun, Y., Liu, J.H., Yu, B.Y., and Xu, Q., *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, vol. 17, no. 22, pp. 6062–6065.
- Porto, T.S., Rangel, R., Furtado, N.A.J.C., De Carvalho, T.C., Martins, C.H.G., Veneziani, R.C.S., et al., *Molecules* 2009, vol. 14, no. 1, pp. 191–199.
- Severiano, M.E., Simão, M.R., Porto, T.S., Martins, C.H., Veneziani, R.C., Furtado, et al., *Molecules*, 2010, vol. 15, no. 12, pp. 8553–8566.
- Urzúa, A., Rezende, M.C., Mascayano, C., and Vasquez, L., *Molecules*, 2008, vol. 13, no. 4, pp. 882–891.
- Parshikov, I.A., Miriyala, B., Muraleedharan, K.M., Avery, M.A., and Williamson, J.S., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 33, no. 5, pp. 349–352.
- Parshikov, I.A., Miriyala, B., Avery, M.A., and Williamson, J.S., *Biotechnol. Lett.*, 2004, vol. 26, no. 7, pp. 607–610.
- Yagi, A., Uemura, T., Okamura, N., Haraguchi, H., Imoto, T., and Hashimoto, K., *Phytochemistry*, 1997, vol. 35, no. 4, pp. 885–887.
- Haraguchi, H., Ohmi, I., Sakai, S., Fukluda, A., Toihara, Y., Fujimoto, T., et al., *J. Nat. Prod.*, 1996, vol. 59, pp. 443–445.
- Ibrahim, A.R., *Phytochemistry*, 2000, vol. 53, no. 2, pp. 209–212.
- Ibrahim, A.R., *Chem. Pharm. Bull.*, 2005, vol. 53, no. 6, pp. 671–673.
- Chung, W.T., Lee, S.H., Kim, J.D., Sung, N.S., Hwang, B., Lee, S.Y., et al., *Cytotechnology*, 2001, vol. 37, no. 1, pp. 55–64.
- Maatooq, G.T., Marzouk, A.M., Gray, A.I., and Rossazza, J.P., *Phytochemistry*, 2010, vol. 71, no. 2–3, pp. 262–270.
- Chen, J.W., Zhu, Z.Q., Hu, T.X., and Zhu, D.Y., *Acta Pharmacol. Sin.*, 2002, vol. 23, no. 7, pp. 667–672.
- Kostrzewa-Susłow, E., Dmochowska-Gładysz, J., and Oszmiański, J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2007, vol. 49, pp. 113–117.
- Radwan, M.M., Elsohly, M.A., Slade, D., Ahmed, S.A., Wilson, L., El-Alfy, A.T., et al., *Phytochemistry*, 2008, vol. 69, no. 14, pp. 2627–2633.
- Ibrahim, K.A., Radwan, M.M., Ahmed, S.A., Slade, D., Ross, S.A., Elsohly, M.A., and Khan, I.A. *Phytochemistry*, 2010, vol. 71, no. 8–9, pp. 1014–1019.
- Choudhary, M.I., Siddiqui, Z.A., Musharraf, S.G., Nawaz, S.A., and Atta-Ur-Rahman, *Nat. Prod. Res.*, 2005, vol. 19, no. 4, pp. 311–317.
- Choudhary, M.I., Musharraf, S.G., Siddiqui, Z.A., Khan, N.T., Ali, R.A., Ur-Rahman, A., *Chem. Pharm. Bull.*, 2005, vol. 53, no. 8, pp. 1011–1013.
- Padgett, D.A. and Loria, R.M., *J. Immunol.*, 1994, vol. 153, no. 4, pp. 1544–1552.

38. Loria, R.M., Padgett, D.A., and Nuynh, P.N., *J. Endocrinol.*, 1996, vol. 150, Suppl: S 209–220.
39. Loria, R.M. *Psychoneuroendocrinology*, 1997, vol. 22 (Suppl. 1), S 103–108.
40. Li, He-Ping, Yu, Peng, Zhang, Hong-Jie, Liu, Hong-Min. *Chin. J. Chem.*, 2008, vol. 26, no. 9, pp. 1666–1668.
41. Russell, W.R., Scobbie, L., Chesson, A., Richardson, A.J., Stewart, C.S., Duncan, S.H., et al., *Nutr. Cancer*, vol. 60, no. 5, pp. 636–642.
42. Gurram, P.S., Girisham, S., and Reddy, S.M., *Iranian J. Biotech.*, 2009, vol. 7, no. 3, pp. 142–147.
43. Shyam Prasad, G., Girisham, S., and Reddy, S.M., *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009, vol. 19, no. 9, pp. 922–931.
44. Srisailam, K. and Veeresham, C., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2010, vol. 160, no. 7, pp. 2075–2089.
45. Ma, B., Huang, H.H., Chen, X.Y., Sun, Y.M., Lin, L.H., and Zhong, D.F., *Acta Pharmacol. Sin.*, 2007, vol. 28, no. 7, pp. 1067–1074.
46. Schmitz, G., Franke, D., Stevens, S., Takors, R., Weuster-Botz, D., and Wandrey, C., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2000, vol. 10, no. 1–3, pp. 313–324.
47. Mazier, C., Jaouen, M., Sari, M.A., and Buisson, D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, vol. 14, no. 21, pp. 5423–5426.
48. Parshikov, I.A. Freeman, J.P., O.Lay Jr., J., Beger, R.D. Williams, and A.J., Sutherland, J.B., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, vol. 177, no. 1, pp. 131–135.
49. Prasad, G.S., Girisham, S., and Reddy, S.M., *Indian J. Exp. Biol.*, 2010, vol. 48, no. 4, pp. 415–420.
50. Verma, A.K., Khemaria, P. Gupta, J., Singh, D.P., Joshi, B.S., Roy, R., et al., *Arxivoc.*, 2010, vol. 9, pp. 1–11.
51. Li, W., Josephs, J.L., Skiles, G.L., and Humphreys, W.G., *Drug. Metab. Dispos.*, 2008, vol. 36, no. 4, pp. 721–730.
52. Das, J., Chen, P., Norris, D., Padmanabha, R., Lin, J., Moquin, R.V., et al., *J. Med. Chem.*, 2006, vol. 49, no. 23, pp. 6819–68326.
53. Potin, D., Monatlik, F., Malabre, P., Fabreguettes, M., Fouquet, A., et al., *J. Med. Chem.*, 2006, vol. 49, no. 24, pp. 6946–6949.
54. Puzantian, T., *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 1998, vol. 55, no. 1, pp. 44–49.
55. Stimmel, G.L., Dopheide, J.A., and Stahl, S.M., *Pharmacotherapy*, 1997, vol. 17, no. 1, pp. 10–21.
56. Martinez, F., del Campo, C., Sinisterra, J.V, and Llama, E.F., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, vol. 11, no. 23, pp. 4651–4660.
57. Martinez, F., del Campo, C., Sinisterra, J.V, and Llama, E.F *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, vol. 30, no. 3, pp. 895–901.
58. Macías, F.A., Molinillo, J.M., Galindo, J.C., Varela, R.M., Simonet, A.M., and Castellano, D. J., *Crop. Prod.*, 2001, vol. 4, no. 2, pp. 237–255.
59. Macías, F.A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Chinchilla, D., Simonet, A.M., and Molinillo, J.M.G., *J. Agric. Food Chem.*, 2006, vol. 54, no. 4, pp. 991–1000.
60. Vallea, A., Cabreraa, G., Molinillo, J.M.G., Gómez, J.M., Macías, F.A., and Cantero, D., *Process Biochem.*, 2011, vol. 46, no. 1, pp. 358–364.
61. Esteve-Núñez, A., Caballero, A., and Ramos, J.L., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001, vol. 65, no. 3, pp. 335–352.
62. Yang, S.L., Lan, J., and Xu, J.T., *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, 2000, vol. 31, no. 1, pp. 66–69.
63. Ojemann, L.M., Nelson, W.L., Shin, D.S., Rowe, A.O., and Buchanan, R.A., *Epilepsy Behav.*, 2006, vol. 8, no. 2, pp. 376–383.
64. Jin, W.S. and Tian, D.Q., *Chin. Tradit. Drugs Technol.*, 2000, vol. 2, pp. 21–23.
65. Gong, X.D. and Sucher, N.J., *Trends Pharm.*, 1999, vol. 20, no. 5, pp. 191–196.
66. Wang, X. and Zhou, M.M., *West China J. Pharm. Sci.*, 2003, vol. 18, pp. 269–270.
67. Zhang, H.F., He, G.Q., Liu, J., Ruan, H., Chen Q.H., Zhang, Q., et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 2008, vol. 43, pp. 25–30.
68. Abel, A.M., Carnell, A.J., Davis, J.A., and Paylor, M., *Biotechnol. Lett.*, 2002, vol. 24, no. 15, pp. 1291–1294.
69. Abel, A.M., Carnell, A.J., Davis, J.A., and Paylor, M. *Enzyme. Microb. Technol.*, 2003, vol. 33, no. 5, pp. 743–748.
70. Clader, J.W., *Curr. Top. Med. Chem.*, 2005, vol. 5, no. 3, pp. 243–56.
71. May, S.W., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, vol. 10, no. 4, pp. 370–375.
72. Patel, R.N., *Coord. Chem. Rev.*, 2008, vol. 252, no. 5, pp. 659–701.
73. Singh, A., Basit, A., and Banerjee, U.C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009, vol. 36, no. 11, pp. 1369–1374.
74. Kyslíková, E., Babiak, P., Marešová, H., Palyzová, A., Hájíček, J., and Kyslíka, P., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, vol. 67, no. 3–4, pp. 266–270.
75. Hamon, D.P., Massy-Westropp, R.A., and Newton, J.L., *Tetrahedron*, 1995, vol. 51, no. 46, pp. 12645–12660.
76. Federsel, H-J., *Chemtech.*, 1993, vol. 23, no. 12, pp. 24–33.
77. US Patent 002505, 1994.
78. Gong, P.F., Wu, H.Y., Xu, J.H., Shen, D., and Liu, Y.Y., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 58, no. 6, pp. 728–734.
79. Liu, J., Zhang, Y., Qiu, Lh., Yang, F., Ye, L., and Xia, Y.J., *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, vol. 31, no. 11, pp. 495–499.
80. Carvalho, P.O., Calafatti, S.A., Marassi, M., Silva, D.M., Contesini, F.J., Bizaco, R., and Macedo, G.A., *Quim Nova*, 2005, vol. 28, no. 4, pp. 614–621.
81. Carvalho, P.O., Contesini, F.J., Almeida, A.P., and Macedo, G.A., *Food Biotechnol.*, 2005, vol. 19, no. 3, pp. 183–192.
82. Carvalho, P.O., Contesini, F.J., Bizaco, R., Calafatti, S.A., and Macedo, G.A., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 33, no. 8, pp. 713–718.

83. Damle, S.V., Patil, P.N., and Salunkhe, M.M., *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, vol. 8, no. 8, pp. 2067–2070.
84. Schulz, B. and Boyle, C., *Mycol. Res.*, 2005, vol. 109, no. 6, pp. 661–686.
85. Borges, K.B., Bonato, P.S., and Pupo, M.T., *Quim. Nova*, 2011, vol. 34, no. 8, pp. 1354–1357.
86. Borges, K.B., Borges, W.S., Pupo, M.T., and Bonato, P.S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, vol. 77, no. 3, pp. 669–674.
87. US Patent 0055063 A1, 2003.
88. US Patent 0022899 A1, 2003.
89. Hanson, R.L., Parker, W.L., Brzozowski, D.B., Tully, T.P., Liu, M., Kotnis A., and Patel, R.N., *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, vol. 16, no. 16, pp. 2711–2716.
90. Dorazil-Dudzik, M., Mika, J., Schafer, M.K., Li, Y., Obara, I., Wordliczek, J., and Przewłocka, B., *Anesth. Analg.*, 2004, vol. 98, no. 6, pp. 1566–1573.
91. Sweitzer, S.M., Schubert, P., and DeLeo, J.A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, vol. 297, no. 3, pp. 1210–1217.
92. Wong, J.S., Keyes, S.R., Herbst, R., Coleman, C.N., and Teicher, B.A., *Oncol. Res.*, vol. 8, pp. 513–518.
93. Margolin, K., Atkins, M., Sparano, J., Sosman, J., Weiss, G., Lotze, M., et al., *Clin. Cancer Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 565–572.
94. List, A.F., Maziarz, R., Stiff, P., Jansen, J., Liesveld, J., Andrews, F., et al., *Bone Marrow Transplant.*, 2000, vol. 25, no. 3, pp. 283–291.
95. US Patent 5407815, 1995.
96. Pekala, E., Kochan, M., and Carnell, A.J., *Lett. Appl. Microbiol.*, 2009, vol. 48, no. 1, pp. 19–24.

УДК 541.13.620.193.8

ЛЕКТИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ КОРРОЗИОННО-АГРЕССИВНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2013 г. Л. М. Пуриш, Л. Г. Асауленко, Д. Р. Абдулина, С. И. Войчук, Г. А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Д 03680

e-mail: purish@serv.imv.kiev.ua

Поступила в редакцию 15.11.2012 г.

Методом трансмиссионной электронной микроскопии исследованы углеводные компоненты биопленок коррозионно-агрессивных бактерий с использованием лектинов, меченных коллоидным золотом. В составе экзополимеров выявлены аминоксахара – N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин и нейтральные углеводы D-глюкоза и D-манноза. Установлено, что лектины с одинаковой углеводной специфичностью в разной степени взаимодействовали с углеводными компонентами биопленок бактерий. Показано, что для выявления N-ацетил-D-галактозамина в биопленке *Desulf vibrio* sp. 10 и *Bacillus subtilis* 36 наиболее специфичен лектин LBA, а для N-ацетил-D-глюкозамина в биопленке *B. subtilis* 36 и *Pseudomonas aeruginosa* 27 – WGA. Для визуализации нейтральных углеводов в исследуемых культурах наиболее специфичен лектин PSA. Доказано, что лектины, меченные коллоидным золотом, можно применять как экспресс метод для выявления и локализации углеводов в составе гликополимеров экзополимерного матрикса биопленок.

DOI: 10.7868/S0555109913050103

В последнее десятилетие значительное внимание исследователей направлено на изучение биопленок, так как большинство важных природных и инженерных систем находятся под их воздействием [1–3]. Биопленки, сформированные сульфатредуцирующими бактериями и их гетеротрофными спутниками на поверхности стали, являются также факторами микробной коррозии [4, 5]. Установлено, что ведущую роль в формировании биопленок играют экзополисахариды (ЭПС), продуцируемые бактериями в экзополимерном матриксе [6–8]. В составе ЭПС обнаружены нейтральные углеводы, а также уроновые кислоты и аминоксахара, которые, взаимодействуя с другими компонентами матрикса с помощью карбоксильных и аминокгрупп, участвуют в формировании структуры биопленки [9, 10]. Помимо этого, полисахариды способны связывать в матриксе ионы металлов и сульфиды, активизируя таким образом коррозионный процесс [5]. Поэтому всестороннее исследование различными методами углеводного состава экзополимерного матрикса биопленок является актуальным.

Ранее нами был исследован состав экзополимерного матрикса, продуцируемого коррозионно-агрессивным микробным сообществом при формировании биопленки на стали. Методом газожидкостной хроматографии проведен анализ моносахаридного состава углеводных компонентов экзополимерного матрикса биопленки. Установлено наличие в его составе нейтральных

углеводов, а также уроновых кислот и аминоксахаров [11].

В настоящее время в научных исследованиях все большее распространение завоевывает полифазный анализ, при котором сопоставляются результаты, полученные разными методами, с целью их дополнения или детализации. Одним из таких подходов при исследовании поверхности бактериальных клеток, наряду с биохимическими методами, является применение в качестве молекулярных зондов меченых лектинов.

Меченые лектины успешно используются при исследовании микробных культур для зондирования структур клеточной поверхности, изучения бактериальных капсул [12, 13] и локализации углеводов на поверхности клетки [14]. Свойство лектинов проявлять максимальное сродство к олигосахаридам строго определенной структуры дает также возможность изучения определенных углеводных компонентов, продуцируемых бактериями при формировании биопленки.

Лектины, меченные флуоресцентными красителями, применяются как маркеры для исследования пространственной локализации гликополимеров, продуцируемых *in situ* в модельных биопленках с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) [15–19]. Применение этой *in situ* техники позволяет оценить ЭПС-специфичные гликоконъюгаты и даже дифференцировать несколько их типов [20]. Однако этот метод не всегда доступен.

Таблица 1. Характеристика лектинов, используемых в работе (НПО “Лектинтест”)

Лектин	Источник получения лектина	Название	Углеводная специфичность	Молекулярная масса, кДа	Количество субъединиц в молекуле	Количество центров связывания углеводов*
Конканавалин А	<i>Canavalia ensiformis</i> , семена	Con A	α -D-глюкоза α -D-манноза	102	4 α	4
Лектин завязей пшеницы	<i>Triticum vulgare</i> , завязи	WGA	N-ацетил-D-глюкозамин, сиаловая кислота	36	2 α	2
Лектин картофеля	<i>Solanum tuberosum</i> , клубни	STA	N-ацетил-D-глюкозамин	105	2	—
Лектин чечевицы	<i>Lens culinaris</i> , семена	LCA	α -D-глюкоза α -D-манноза	48	2 α 2 β	2
Лектин гороха	<i>Pisum sativum</i> , семена	PSA	α -D-глюкоза-D-манноза	48	4 α β	—
Лектин сои	<i>Glycine max</i> , бобы	SBA	N-ацетил-D-галактозамин	110	4 α	2
Лектин фасоли	<i>Phaseolus limensis</i> , семена	LBA	N-ацетил-D-галактозамин	127	4	—

* “—” — нет данных.

Цель работы — исследование возможности использования лектинов, меченных коллоидным золотом, для определения углеводных компонентов биопленки, образуемой на поверхности стали коррозионно-агрессивными бактериями, методом трансмиссионной электронной микроскопии.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использованы ранее выделенные нами из коррозионно-агрессивного сульфидогенного микробного сообщества бактерии *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36, *Pseudomonas aeruginosa* 27, а также искусственно созданная из этих монокультур ассоциация [21].

Методы культивирования. Моно- и ассоциативные культуры выращивали на жидкой среде Постгейта “В” [21] во флаконах объемом 50 мл, инокулированной в зависимости от варианта опыта культурами бактерий в экспоненциальной фазе роста. Количество посевного материала составляло 10% от объема среды, начальный титр монокультур — 10^7 кл./мл. Биопленку наращивали на образцах стали 3. Стальные образцы предварительно обрабатывали согласно методике, описанной в [11], затем погружали во флаконы и герметически закрывали резиновыми пробками. Инкубировали при 28°C в течение 10 сут. Каждый опыт ставили в 3 повторностях.

Коммерческие препараты лектинов. Использованные в опыте препараты лектинов, меченные коллоидным золотом (НПО “Лектинтест”, Львов), приведены в табл. 1. Выбор лектинов для данного исследования обусловлен предварительно проведенным нами биохимическим анализом моносахаридного состава экзополимерного матрикса вышеуказанных бактерий [11], а также данными литературных источников о составе углеводов в биопленке [6, 8–10].

Лектины использовали в виде золь, который содержал в качестве консерванта 0.02% азида натрия, 10–20% этиленгликоля в 0.01 М фосфатном буферном растворе (рН 6.5–8.5). Размер частиц коллоидного золота составлял 8–12 нм. Концентрация лектинов по $A_{520} = 5.0 \pm 0.2$. Растворы лектинов готовили согласно инструкции производителя.

Подготовка образцов для электронной микроскопии. Препараты биопленки для электронной микроскопии получали методом отпечатков. Для этого после окончания экспозиции стальные образцы с образованной на них биопленкой вынимали из флаконов, затем на поверхность биопленки накладывали медные сеточки, покрытые формваровой пленкой. После 1 мин экспозиции, сеточки с отпечатком биопленки осторожно снимали и высушивали на воздухе. Для получения препаратов суспензионных культур на сеточки наносили суспензию бактерий (10–20 мкл) и также высушивали на воздухе.

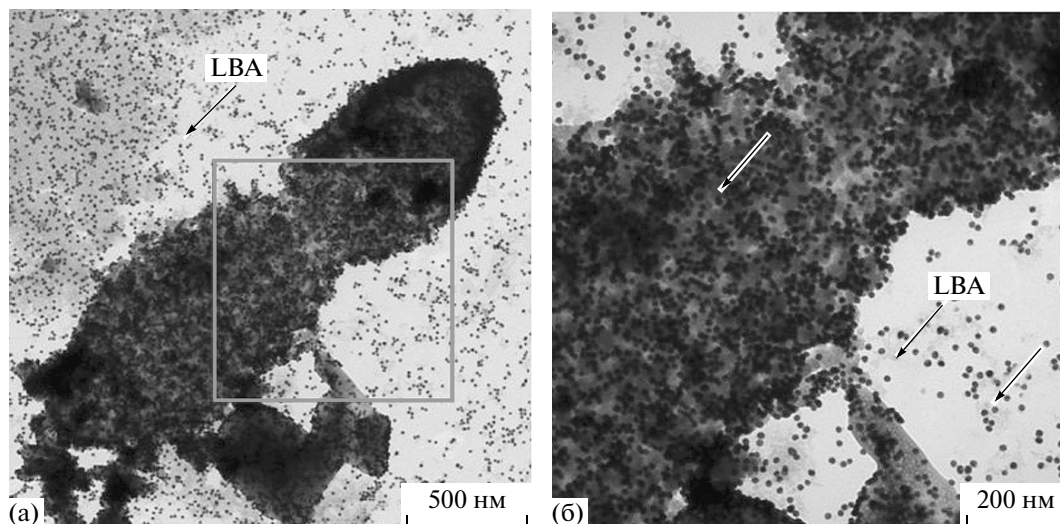


Рис. 1. Связывание лектинов с углеводами *Desulfovibrio* sp. 10 в биопленке. Масштабная метка: а – 500 нм, б – 200 нм. На рис. 1–3 локализация частиц коллоидного золота на поверхности клетки и во внеклеточном матриксе выборочно указана стрелками.

На сеточки с образцами биопленки и суспензионных культур наносили раствор соответствующего лектина, меченного коллоидным золотом, и выдерживали 1 ч для связывания лектина с углеводами экзополимерного матрикса. После экспозиции, для удаления остатков раствора лектинов, сеточки трижды промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Микроскопические исследования. Приготовленные образцы исследовали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1400 (“JEOL”, Япония) при ускоряющемся напряжении 80 кВ и общем инструментальном увеличении $\times 3000$ – 12000 . Методом рандомизированного отбора просматривали не менее 20 полей зрения. Количество коллоидных частиц золота, связанных с углеводными компонентами экзополимерного матрикса биопленки и суспензии, подсчитывали в 1 мкм^2 площади поля зрения, используя программу ImageJ ver. 143u (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя стандартное отклонение по выборке связанных частиц коллоидного золота в поле зрения с помощью программы MS Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Способность лектинов специфически взаимодействовать с различными углеводами позволяет использовать их при изучении свойств, структуры и локализации углеводсодержащих биополимеров, а также для идентификации биологических объектов. Используя лектинсвязывающий анализ

для биохимической характеристики биопленок, необходимо знать полный спектр углеводного связывания данного лектина. Однако стандартные лектины из каталога, по данным производителя, испытываются только относительно некоторых углеводов. Как правило, эти углеводы имеют важное значение для биологических исследований клетки, но не обязательно могут присутствовать в экзополимерах природных биопленок. Кроме того, некоторые специфические гликоконъюгаты, например альгинат, могут быть уникальными для бактерий и биопленок [8].

Учитывая это, мы сочли целесообразным исследовать специфичность ряда коммерческих лектинов относительно углеводов, продуцируемых в экзополимерном матриксе бактериями компонентами коррозионно-агрессивного сообщества.

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии нами было показано, что связывание лектинов с углеводами происходило непосредственно в экзополимерном матриксе, а также на поверхности бактериальных клеток, о чем свидетельствовало наличие частиц коллоидного золота. Меченные коллоидным золотом лектины визуализировались на снимках как небольшие округлые электронно-плотные частицы размером 8–12 нм (рис. 1–3).

Для определения в биопленке N-ацетил-D-галактозамина были использованы меченые лектины фасоли LBA и сои SBA, имеющие соответствующую углеводную специфичность (табл. 2). В биопленке *Desulfovibrio* sp. 10 и *B. subtilis* 36, а также ассоциативной культуры отмечено связывание вышеуказанных лектинов с углеводами, о чем свидетельствовало наличие частиц коллоидного золо-

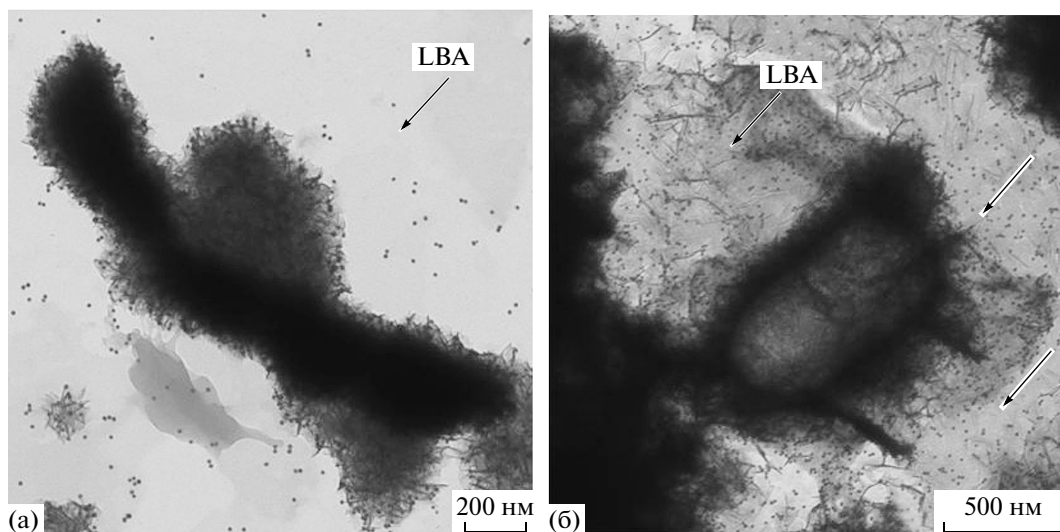


Рис. 2. Связывание лектина LBA с углеводами в био пленке: а – *B. subtilis* 36, в – *P. aeruginosa* 27. Масштабная метка: а – 200 нм; б – 500 нм.

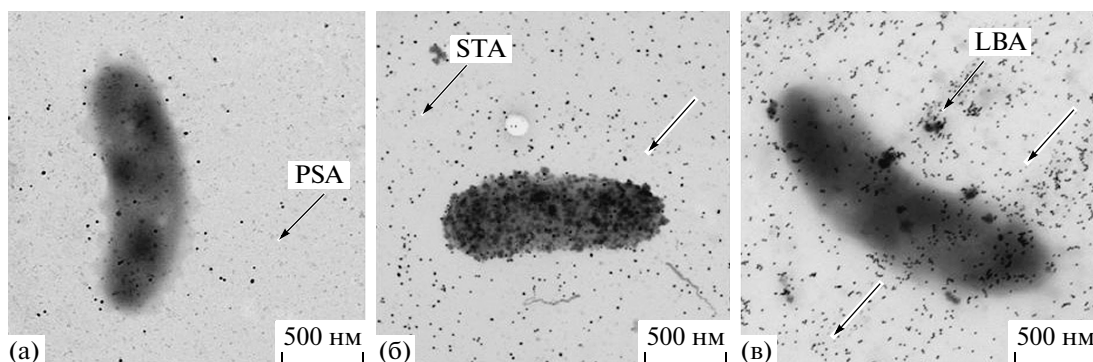


Рис. 3. Связывание лектинов с углеводами в суспензионной культуре *Desulfovibrio* sp. 10: а – лектин PSA, б – лектин STA, в – лектин LBA. Масштабная метка – 500 нм.

та. Количество лектина LBA, связанного с N-ацетил-D-галактозамином в био пленке *Desulfovibrio* sp. 10 и *B. subtilis* 36, было в 3.8 и 6 раз соответствен-

но больше по сравнению с лектином SBA, что свидетельствовало о необходимости исследования матрикса этих культур с наиболее для них специ-

Таблица 2. Связывание лектинов с углеводными компонентами в био пленке*

Био пленка, сформированная бактериями	Лектин						
	LBA	SBA	STA	WGA	LSA	PSA	Con A
	Специфичность						
	N-ацетил-D-галактозамин		N-ацетил-D-глюкозамин		D-глюкоза, D-манноза		
<i>Desulfovibrio</i> sp.10	178 ± 15*	47 ± 17	109 ± 30	69 ± 32	21 ± 7	136 ± 30	13 ± 2
<i>Bacillus subtilis</i> 36	384 ± 33	65 ± 15	24 ± 7	100 ± 7	22 ± 6	51 ± 20	32 ± 12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27	53 ± 24	47 ± 18	46 ± 16	132 ± 11	15 ± 2	20 ± 11	11 ± 5
Искусственная ассоциация	151 ± 40	13 ± 6	64 ± 15	33 ± 8	29 ± 6	25 ± 6	4 ± 1

* Количество частиц коллоидного золота/мкм².

Таблица 3. Связывание лектинов с углеводными компонентами в суспензионных культурах*

Суспензия бактерий	Лектин						
	LBA	SBA	STA	WGA	LSA	PSA	Con A
	Специфичность						
	N-ацетил-D-галактозамин		N-ацетил-D-глюкозамин		D-глюкоза, D-манноза		
<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	494 ± 117	133 ± 18	118 ± 33	10 ± 3	10 ± 2	16 ± 4	12 ± 6
<i>Bacillus subtilis</i> 36	128 ± 21	41 ± 8	33 ± 12	29 ± 14	8 ± 3	11 ± 6	3 ± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27	87 ± 7	16 ± 5	28 ± 9	12 ± 5	7 ± 3	26 ± 14	2 ± 1
Искусственная ассоциация	291 ± 91	85 ± 21	68 ± 21	17 ± 9	8 ± 2	10 ± 3	4 ± 1

* – Количество частиц коллоидного золота/мкм².

фичным лектином LBA. В биопленке, образованной *P. aeruginosa* 27, количество частиц коллоидного золота не зависело от вида лектина и было почти одинаковым для SBA и LBA, мишенями для которых был N-ацетил-D-галактозамин, поэтому для выявления в биопленке псевдомонад этого углевода могут быть использованы оба лектина.

Визуализация связывания лектина LBA с N-ацетил-D-галактозамином, продуцируемом бактериями в биопленке, представлена на рис. 1, 2. На выделенном (рис. 1а) и увеличенном (рис. 1б) участке отпечатка биопленки *Desulfovibrio* sp. 10 четко видна локализация меченого лектина LBA непосредственно на поверхности клетки и во внеклеточном матриксе. На препаратах отпечатков биопленки *Bacillus subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27 также зафиксировано разное количество связанных лектином частиц коллоидного золота, что подтверждает наличие N-ацетил-D-галактозамина (рис. 2).

Для выявления N-ацетил-D-глюкозамина использованы лектины картофеля STA и завязей пшеницы WGA. Согласно полученным результатам с углеводами биопленки *Desulfovibrio* sp. 10, активнее всего взаимодействовал лектин STA, а для *B. subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27 более специфичен лектин WGA.

Для определения нейтральных углеводов, а именно D-маннозы и D-глюкозы, применяли лектины чечевицы – LSA, гороха – PSA и конканавалин А. Наибольшее количество частиц коллоидного золота в экзополимерном матриксе всех исследуемых биопленок было выявлено при использовании лектина PSA. Лектины LSA и конканавалин А в незначительном количестве связывались с D-маннозой и D-глюкозой. Так, количество частиц коллоидного золота лектина PSA, связанных в биопленке *Desulfovibrio* sp. 10, было в 6.5 и 10.5 раз больше, чем при использовании лектинов LSA и Con A соответственно.

Следует отметить, что конканавалин А является наиболее распространенным и широко употребляемым лектином в биологических исследованиях [12]. Однако, используя его для изучения углеводного состава ЭПС бактерий – компонентов коррозионно-агрессивного сообщества, мы установили, что Con A проявлял наименьшее сродство к углеводам во всех вариантах опыта. Возможно, в исследуемых экзополимерных комплексах было мало мишеней именно для этого лектина.

Результаты лектинсвязывающего анализа для визуализации гликоконъюгатов, продуцируемых суспензионными культурами, практически не отличались от таковых в биопленке. Наиболее специфичным для идентификации N-ацетил-D-глюкозамина был лектин STA, N-ацетил-D-галактозамина – лектин LBA, а для определения D-глюкозы и D-маннозы больше всего подходил лектин PSA (табл. 3). Например, в биопленке и суспензионной культуре *Desulfovibrio* sp. 10 лектин LBA связывал наибольшее количество N-ацетил-D-галактозамина 178 ± 14.9 и 494 ± 117 частиц коллоидного золота соответственно. Визуализация связывания лектинов PSA, STA и LBA с углеводами, продуцируемыми в экзополимере суспензионной культуры *Desulfovibrio* sp. 10, представлена на рис. 3. Частицы коллоидного золота в разном количестве обнаружены на поверхности клетки и во внеклеточном матриксе.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что лектины с одинаковой углеводной специфичностью в разной степени взаимодействовали с углеводами, содержащимися в экзополимерах бактерий – компонентов сульфидогенного микробного сообщества. Полученные результаты, по всей вероятности, можно объяснить как свойствами лектинов, так и структурой углеводов, являющихся мишенью в изучаемой системе. Ранее [22–24] исследователями было показано, что взаимодействие лектинов с углеводами зависит от

структуры последних: от конформации пиранозных и фуранозных форм моносахаридных остатков, входящих в состав углеводной части биополимеров, от конфигурации аномерного центра моносахаридов (D- или L-формы пиранозного кольца углевода), от α - или β -положения гликозидной связи при C₁-позиции моносахарида. Следовательно, к наиболее важным факторам взаимодействия лектинов с углеводами следует отнести такие, как стереоспецифичность при связывании моносахаридов с лектинами, присутствие или отсутствие координационных связей, водородных, а также гидрофобных и Ван дер Ваальсовы взаимодействия.

Кроме того, при исследовании гликоконъюгатов ЭПС биопленки *in situ*, методом флуоресцентного лектинсвязывающего анализа, авторами также было установлено, что специфичность лектина зависит от применяемого красителя, используемого для маркировки лектина. Показано, что на специфичность лектинов влияет как присутствие, так и природа флуорохрома [16, 17].

Можно сделать заключение, что выбирая лектины для визуализации углеводов в составе экзополимерного матрикса, продуцируемого бактериями, необходимо основываться на биохимических исследованиях экзополимеров и особенностях бактериальной культуры, а также учитывать углеводную специфичность лектина. На основании специфичности лектинов, меченных коллоидным золотом, нами были визуализированы в составе ЭПС исследуемых бактерий нейтральные углеводы – D-глюкоза, D-манноза и аминсахара – N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин. Подобные результаты были получены с применением флуоресцентного лектинсвязывающего анализа [19]. Исследователями было установлено, что в составе ЭПС, продуцируемых цианобактериями, содержатся нейтральные углеводы, такие, как фруктоза и галактоза, аминсахара N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин и сиаловые кислоты. С помощью меченных флуорохромами лектинов показано, что биопленка, образующаяся *Deinococcus geothermalis* на нержавеющей стали, интенсивно взаимодействовала с лектином WGA, что свидетельствовало о наличии N-ацетил-D-глюкозамина и N-ацетилсиаловой кислоты [25].

Таким образом, сравнивая полученные ранее результаты биохимического исследования экзополимерного матрикса, продуцируемого компонентами сульфидогенного микробного сообщества [11] с данными лектинсвязывающего анализа, можно констатировать, что использование лектинов, меченных коллоидным золотом, возможно для предварительного выявления и локализации углеводов в составе гликополимеров экзополимерного матрикса. Дополнительными помехами

применения лектинсвязывающего анализа является, в первую очередь, сложная природа матрикса биопленки, а также вероятность отсутствия мишени для используемого лектина, огромное разнообразие потенциальных комбинаций углеводов. Чтобы исключить некоторые неопределенности, каждая биопленочная система должна быть протестирована набором различных лектинов.

В то же время, в отличие от биохимического метода, лектинсвязывающий анализ позволяет исследовать полностью гидратированные (нативные) матриксы в моно- и ассоциативных культурах биопленок для выявления качественного углеводного состава, без выделения индивидуальных полисахаридов. Таким образом, лектинсвязывающий анализ может быть использован *in situ* для исследования распределения гликополимеров в микробных сообществах.

Использование углеводной специфичности лектинов, меченных коллоидным золотом, при изучении углеводов, продуцируемых бактериями, является наиболее удобной, доступной и быстрой условной тест-системой, не дающей, однако, полной характеристики состава экзополимерного матрикса.

Естественно, для изучения биопленок целесообразно, наряду с лектинсвязывающим анализом, применять биохимические методы исследования, что позволит не только визуализировать локализацию гликополимеров в ЭПС, но и определить их углеводный состав. В этом аспекте доступные в настоящее время лектины могут быть ценным инструментом для оценки распределения гликополимеров в сложных системах биопленок. Лектинсвязывающий анализ можно также рассматривать как экспресс-метод определения состава экзополимерного матрикса в полностью гидратированных и сложных биопленочных системах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Watnick P., Kolter R.* // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 10. P. 2675–2679.
2. *Davey M.E., O'Toole G.A.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. № 4. P. 847–867.
3. *Смирнова Т.А., Дибенко Л.В., Азизбекян Р.Р. Романова Ю.М.* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 435–446.
4. *Hamilton W.A.* // Biofouling. 2003. V. 19. № 1. P. 65–76.
5. *Beech I., Summer J.* // Current Opinion Biotechnol. 2004. V. 15. № 3. P. 181–186.
6. *Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P.* // Molecules. 2009. V. 14. № 7. P. 2535–2554.
7. *Flemming H.C., Neu T.R., Watnick D.* // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 22. P. 7945–7947.
8. *Christensen B.E.* // J. Biotechnol. 1989. V. 10. № 3–4. P. 181–202.

9. Lewandowski Z. Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control. / Ed L.V. Evans. Harwood: Acad. Publishers, 2000. P. 1–17.
10. Sutherland I.W. // Microbiology. 2001. V. 147. № 1. P. 3–9.
11. Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Васильев В.Н., Иутинская Г.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 3. С. 294–301.
12. Лахтин В.М. // Биохимия. 1995. Т. 60. № 2. С. 87–217.
13. Vasse J.M., Dazzo F.B., Truchet G.L. // J. Gen. Microbiol. 1984. V. 130. № 11. P. 3037–3047.
14. Jones A.H., Lee C.-C., Moncla B.J., Robinovitch M.R., Birdsell D.C. // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. № 12. P. 3381–3391.
15. Sanford B.A., Thomas V.L., Mattingly S.J., Ramsay M.A., Miller M.M. // J. Ind. Microbiol. 1995. V. 15. № 3. P. 156–161.
16. Neu T.R., Swerhone D.W., Lawrence J.R. // Microbiology. 2001. V. 147. № 2. P. 299–313.
17. Neu T.R., Manz B., Volke F., Dynes J.J., Hitchcock A.P., Lawrence J.R. // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. № 72. P. 1–21.
18. Lawrence J.R., Swerhone G.D.W., Leppard G.G., Araki T., Zhang X., West M.M., Hitchcock A.P. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 9. P. 5543–5554.
19. Zippel B., Neu T.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 2. P. 505–516.
20. Lawrence J.R., Swerhone G.D.W., Neu T.R. // Can. J. Microbiol. 2007. V. 53. № 3. P. 450–458.
21. Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Пуриш Л.М. // Микробиол. журн. 2009. Т. 72. № 4. С. 3–10.
22. Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J. The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Orlando: Acad. Press, 1986. 600 p.
23. Weiss W.I., Drickamer K. // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 441–473.
24. Elgavish S., Shaanan B. // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. № 12. P. 462–467.
25. Kolari M. // Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki. 2003 ISBN 952-10-0345-6.

Lectin-Binding Analysis of the Biofilm Exopolymeric Matrix Carbohydrate Composition of Corrosion-Aggressive Bacteria

L. M. Purish, L. G. Asaulenko, D. R. Abdulina, S. I. Voychuk, and G. A. Iutynskaya

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

e-mail: purish@serv.imv.kiev.ua

Received November 15, 2012

Abstract—The carbohydrate components of biofilms of corrosion-aggressive bacteria were studied by transmission electron microscopy using lectins labeled with colloidal gold. N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, and neutral carbohydrates D-glucose and D-mannose were found within the exopolymeric matrix. Lectins with equal carbohydrate specificity demonstrated different degrees of interaction with the carbohydrate components of bacterial biofilms. To identify N-acetyl-D-galactosamine in biofilms of *Desulfovibrio* sp. 10 and *Bacillus subtilis* 36, the LBA lectin appeared to be most specific; in the case of N-acetyl-D-glucosamine in biofilms of *B. subtilis* 36 and *Pseudomonas aeruginosa* 27, the WGA lectin. During visualization of neutral carbohydrates in the studied cultures, the PSA lectin was most specific. We have shown that lectins labeled with colloidal gold could be used as an express method for the identification and localization of carbohydrates in glycopolymers of the biofilm exopolymeric matrix.

УДК 577.154.2

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В МОЛЕКУЛЕ β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ ИЗ *Thermotoga maritime* НА ГИДРОЛИЗ ИЗОФЛАВОНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ СОИ, СТАБИЛЬНОСТЬ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2013 г. Ю. Хие*, С. Сонг**, Х. Сун**, З. Цао***

*Департамент науки продовольствия и питания, колледжа Гин-Лин, Университет Нанкина, Нанкин, Китай 210097

**Колледж наук о жизни, Университет Нанкина, Нанкин, КНР 210023

***Медицинский университет Нанкина, Первая больница, Нанкин, КНР 210006

e-mail: caozhigang11@sina.com; xueyemin@njnu.edu.cn

Поступила в редакцию 15.10.2013 г.

Термостабильная β -глюкозидаза (TmBglA) из *Thermotoga maritime* — перспективный биокатализатор для получения изофлавоновых агликонов. Для эффективного гидролиза соевых изофлавоновых конъюгатов необходим поиск ферментов с высокой специфичностью к природным субстратам. Изучено влияние аминокислот, расположенных в агликонсвязывающем кармане с неконсервативными остатками специфичных групп фермента, принадлежащего семейству 1 гликозидгидролаз (GH1), с использованием TmBglA (дикого типа) из *T. maritime* и трех мутантных, в которых были произведены замены аминокислот — M1-TmBglA, M2-TmBglA и M1M2-TmBglA. Три мутантных белка были экспрессированы в *Escherichia coli*, выделены и охарактеризованы. Мутации привели к сдвигам в значениях оптимальной температуры, термостабильности, сужению кривой рН-зависимости в результате удаления ионизированной боковой цепи. Все мутации снижали эффективность катализа, по отношению к природным субстратам, таким как гликозид салицина, по сравнению с синтетическим *p*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозидом. Это свидетельствует о том, что замененные аминокислоты являются ключевыми, определяющими специфичность к агликону. Меньшая степень гидролиза генистеина и даидзеина ферментом M2-TmBglA, по сравнению с M1-TmBglA, свидетельствовала в пользу того, что остатки L400, A407 и E408 в TmBglA в большей степени необходимы для проявления каталитической активности и связывания соевого изофлавонового гликозида, чем V170, A171, V173, G174, H180.

DOI: 10.7868/S0555109913050152

Изофлавоны — структурные гомологи человеческого эстрогена, существуют в виде гликозидов и в наибольшем количестве присутствуют в сое. Широко известен тот факт, что эстрогенная активность соевых изофлавонов может использоваться в оздоровительных целях, кроме того в целях профилактики некоторых видов рака [1], снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний и улучшения состояния костей [2, 3]. Изофлавоновые агликоны обладают более высокой фармацевтической активностью, по сравнению с изофлавоновыми гликозидами [4, 5]. Способность многих бактериальных и грибных β -глюкозидаз к гидролизу последних с образованием агликонов — предмет многочисленных исследований в последние годы. Наиболее перспективны для применения термостабильные β -глюкозидазы из *Dictyoglomus turgidum*, *Sulfolobus solfataricus*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* и *Thermotoga maritime*, обладающие высокой гидролитической активностью в отношении изофлавоновых

конъюгатов [6–10]. Растительные β -глюкозидазы из *Glycine max* (soybean), *Dalbergia nigrescens* и *Zea mays* (кукуруза) более активны с изофлавоновыми гликозидами, чем с *p*-нитрофенил-гликозидом (рНФГ), и гидролизуют изофлавоновые гликозиды с высокой степенью эффективности [11–13].

Недавно были проведены исследования некоторых растительных β -глюкозидаз из бобовых, миндаля, а также из термофильных грибов и бактерий с целью сравнения их способности к гидролизу конъюгатов изофлавонов сои из соевых бобов [9, 12, 14]. Были обнаружены различия в гидролизе соевых изофлавонов этими ферментами, что свидетельствует об их различной специфичности к этим субстратам. Однако наши знания о том, что определяет специфичность β -глюкозидазы к агликонам на молекулярном уровне весьма ограничены, хотя возможность изменить специфичность фермента важна для выяснения механизма гидролиза и биотехнологического применения фермента.

В предыдущей работе было показано, что применение термостабильной β -глюкозидазы (TmBglA) из *T. maritima*, эффективно гидролизующей изофлавоновые гликозиды, увеличивает содержание изофлавоновых агликонов в соевой муке, что позволяет получать агликоны в одну стадию [10]. Такой подход предполагает использование ферментов с высокой термостабильностью. TmBglA может быть перспективным биокатализатором при использовании ее для реализации способа очистки с термической обработкой. Однако фермент гидролизует изофлавоновые конъюгаты менее эффективно чем *p*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (пНФГ). β -глюкозидаза другого типа из *Glycine max* (GmGH1) обладает высокой специфичностью к соевым изофлавоновым конъюгатам, эффективно их гидролизует, по сравнению с пНФГ, при разных условия связывания [11]. Выявление факторов, определяющих различия в специфичности β -глюкозидаз различного происхождения к агликонам поможет раскрыть детали механизма катализа, что, в свою очередь, позволит рационально оптимизировать их субстратную специфичность к изофлавоновым гликозидам.

β -глюкозидаза (КФ 3.2.1.21, TmBglA) принадлежит к семейству 1 гликозид-гидролаз (GH1) и катализирует гидролиз β -глюкозидных связей с сохранением аномерной конфигурации. Методом рентгеноструктурного анализа была определена трехмерная структура этого фермента. Показано, что фермент имеет конфигурацию бочки, состоящей из 8 повторов α/β -структур [15]. В семействе TLNER и ITENG являются высоко консервативными пептидными фрагментами, которые содержат, в том числе и два аминокислотных остатка Глу, участвующих в катализе — E166 и E351 (нумерация по TmBglA, рис. 1). Эти аминокислоты расположена в β -листах 4 и 7, и составляют часть активного центра, имеющего форму кратера. Роль этих остатков в катализе была установлена с помощью мутагенеза, а также с помощью ингибиторных исследований с ферментами семейства 1 β -глюкозидаз [16–18]. Однако, мало известно о том, как именно β -глюкозидазы связывают агликон. Если связывающие сахар аминокислотные остатки высоко консервативны для всех ферментов семейства 1, аминокислоты, расположенные в связывающемся с агликоном кармане различаются у разных ферментов (рис. 1).

На основании сравнения аминокислотной последовательности ферментов семейства 1 и анализа структурной модели TmBglA было высказано предположение, что следующие аминокислотные остатки участвуют в связывании агликона V170, V173, H180, A407 и E408. Рассмотрены 3 дополнительных аминокислотных остатка A171, G174 и L400, которые также могут влиять на связывание агликона, и которые расположены в непосредственной близости от TLNER и ITENG моти-

вов в TmBglA. Для того, чтобы выявить их влияние на гидролиз соевых изофлавоновых гликозидов, стабильность и каталитические свойства фермента были осуществлены мутации по этим аминокислотным остаткам и исследован гидролиз искусственного субстрата пНФГ и природного гликозида салицина. Эти субстраты имеют общую β -гликозидную группу и различные агликоновые фрагменты. Проведено исследование pH-зависимости и термической стабильности при гидролизе соевых изофлавоновых гликозидов для TmBglA дикого типа и мутантов.

Цель работы — исследовать, каким образом аминокислотные остатки, связывающие агликон и участвующие в катализе, определяют специфичность нативного фермента.

МЕТОДИКА

Материалы. Для экспрессии гена β -глюкозидазы A использовали штамм *Escherichia coli* JM109 (DE3) (“Promega”, США). Ген из *T. maritima* экспрессировали с помощью T₇ РНК-полимеразной системы экспрессии с плазмидой pET-20b (“Novagen”, США)

Клетки культивировали при 37°C в среде Луриа-Бертани (LB), в присутствии ампициллина (100 мкг/мл). ДНК-модифицирующие ферменты и полимеразы были получены из “Takara” (Китай), *p*-нитрофенол, рНФГ, салицин, стандарты изофлавонов, даидзеин и генистеин — “Sigma” (США).

ДНК-манипуляции. Манипуляции с ДНК проводили в соответствии с ранее описанными протоколами [19]. ДНК трансформацию проводили с использованием набора GenePulser (“Bio-Rad”, США). Плазмидная ДНК и продукты ПЦР были выделены и очищены с использованием Qiagen plasmid kit и PCR purification kit (“Qiagen”, USA). ПЦР проводили в приборе PE Applied Biosystems 9700 thermal cycler (“Foster City”, USA) с использованием стандартных условий для проведения реакции.

Получение плазмид, содержащих мутантный ген. Дизайн плазмиды осуществляли согласно стандартным протоколам [19]. Ген β -глюкозидазы A из *T. maritima*, *bglA*, основываясь на заявленном в генбанке (Genbank, X74163), был амплифицирован и лигирован в сайты рестрикции *Eco* RV и *Pst*I плазмиды pET-20b, которая названа pET-20b-*TmBglA*. В качестве праймеров были использованы четыре синтетических олигонуклеотида P1, P2, P3 и P4 для замены кодонов аминокислотных остатков V170, A171, V173, G174, H180, L400, A407 и E408 в TmBglA на кодоны AAA, CCA, AAA, AGC, AAA, AAA и CGC (табл. 1). Все олигонуклеотиды были синтезированы в “Sangon” (Shanghai, Китай). ПЦР-амплификация проводилась

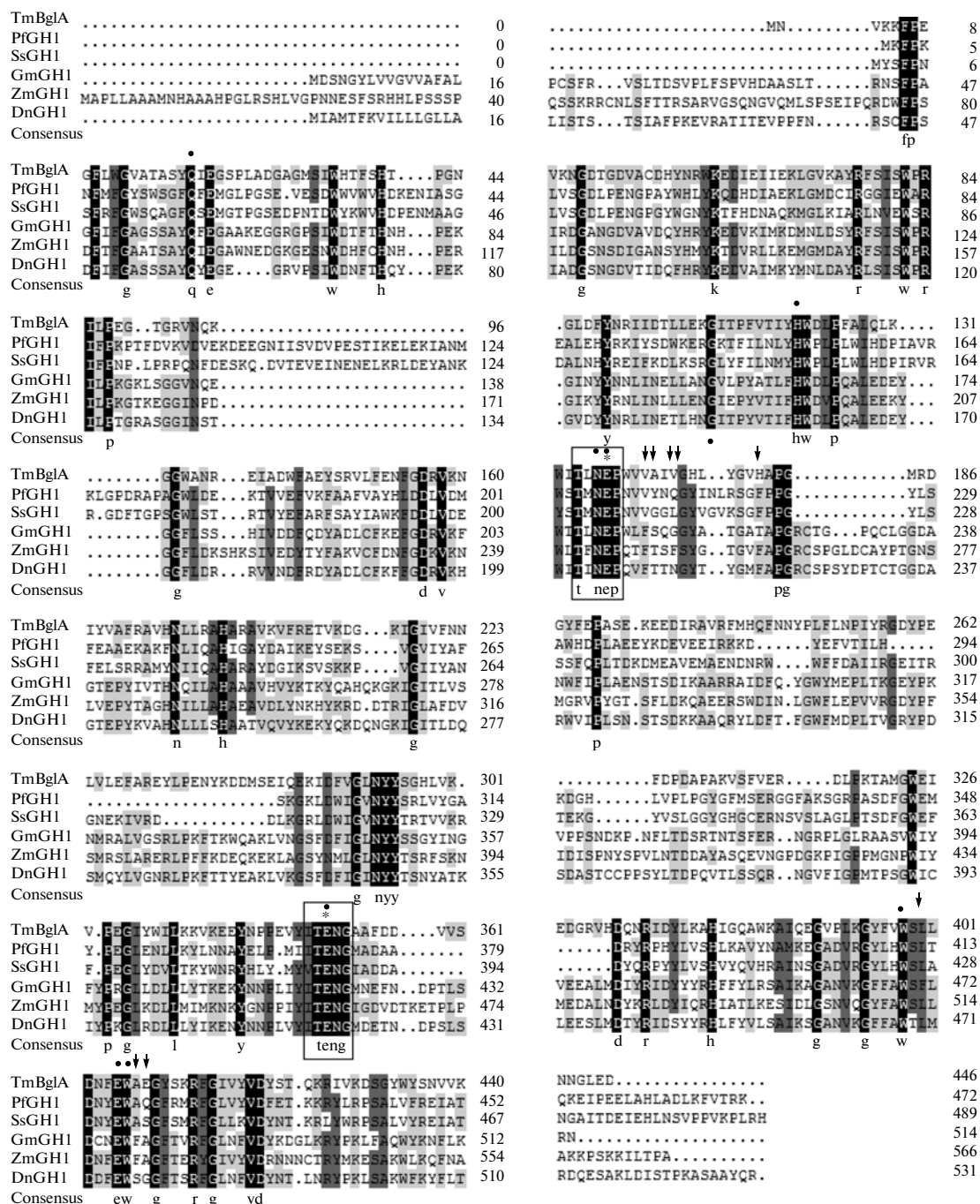


Рис. 1. Сопоставление аминокислотной последовательности TmBglA *T. maritima* (X74163) с другими последовательностями семейства β-глюкозидазы. Сопоставлены следующие ферменты (регистрационный номер): ZmGH1 – β-глюкозидаза из *Zea mays* (AAA65946); DnGH1 – β-глюкозидаза из *Dalbergia nigrescens* (AY766303); GmGH1 – β-глюкозидаза из *Glycine max* (AB259819); SsGH1: – β-глюкозидаза из *Sulfolobus solfataricus* (P22498) и PfGH1 – β-глюкозидазы из *Pyrococcus furiosus* (AAC2555). Аминокислоты, обозначенные стрелками, были выбраны для направленного мутагенеза. Высококонсервативные или подобные аминокислоты β-глюкозидазы выделенные сплошным или серым соответственно. Высококонсервативные мотивы TFNER и ITENG даны в прямоугольниках, соответствующие каталитические аминокислотные остатки отмечены звездочкой. Сахарсвязывающие аминокислотные остатки обозначены кружочками.

программой из 35 циклов с использованием Ru-robest ДНК полимеразы (“ТаКаРа”, Китай) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 0.2 мМ

каждого дНТФ, 20–35 пмоль каждого праймера и 0.05 мкг плазмиды pET-20b-*TmBglA*. Каждый цикл состоял: нагревание при 95°C 5 мин, 94°C в течение

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3')*	Заменяемая аминокислота
P1	<i>TTT AGC</i> (GTGGGG) KAT CTG TAC GGA GTC <i>TTT</i> (CAC) GCT CCT GGA ATG AGA GAT	V173F, G174S, H180F
P2	TAT <i>GGT AAA</i> (GGCAAC) AAC CCA CGG TTC GTT CAAGGT GAT CCA GTT CTT CAC	V170F, A171T
P3	GAA TGG <i>TTT GCG</i> (GCAGAG) GGA TAT TCC AAG AGA TTT GG	A407F, E408A
P4	GAA ATT GTC <i>AAA</i> (GAG) GAG CGA CCA GAC GAA GTA	L400F

* Нуклеотиды в скобках – нативные нуклеотиды сайтов мутации. Курсивом показаны нуклеотиды после мутации. Нуклеотиды в скобках были заменены на нуклеотиды, показанные курсивом.

50 с, 50°C 40 с и 72°C 2 мин 30 с. ПЦР-продукты очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР “QIAquick PCR” и проводили фосфатирование с T4 полинуклеотидкиназой, лигировали в T₇ экспрессионный вектор pET-20b, с получением pET-20b-m1-TmBglA, pET-20b-m2-TmBglA, pET-20b-m1m2-TmBglA. Очистку рекомбинантных плазмид проводили с помощью набора QIAmini-prep kit (“Qiagen”, США). Вставки затем секвенировали в Biological Services Unit of Shang Hai (Китай). Нуклеотидная и аминокислотная последовательности были проанализированы с использованием программного обеспечения Dna-man версии 6.0 (“Lynnon Biosoft”, США).

Экспрессия и очистка. Клетки *E. coli* JM109 (DE3) были трансформированы соответствующими векторами экспрессии pET-20b-TmBglA, pET-20b-m1-TmBglA, pET-20b-m2-TmBglA and pET-20b-m1m2-TmBglA и выращены при 37°C в 100 мл в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампицилина. Клетки индуцировали при достижении значения OD₆₀₀ 0.6–0.8 добавлением 0.25 мМ изо-пропилтио-β-галактопиранозида (ИПТГ), после чего выращивание продолжали в течение 10 ч. Клетки собирали центрифугированием при 9600 × g при 4°C в течение 20 мин. Осадок суспензировали в буфере для связывания (5 мМ имидазола и 0.5 М NaCl, 20 мМ трис-НСl, pH 7.9), проводили лизис 3 циклами на френч-прессе (“Thermo Electron”, США), полученный гомогенат затем центрифугировали при 9600 × g, при 4°C 30 мин. После термической обработки в течение 20 мин при 70°C белковые фракции собирали центрифугированием и наносили на колонку для металл-аффинной хроматографии, заполненную с Ni-хелатной смолой (“Novagen”, США). Несвязавшиеся белки элюировали связывающим буфером, после чего через колонку пропускали буфер для промывания (60 мМ имидазол, 0.5 М NaCl в

20 мМ трис-НСl, pH 7.9). Ферменты дикого типа и мутантные с гистидиновой меткой смывали буфером для элюирования (1.0 М имидазол, 0.5 М NaCl в 20 мМ трис-НСl, pH 7.9), собирали и использовали для последующего анализа в ПААГ с Na-ДДС в 10%-ном полиакриламидном разделяющем геле и 4%-ном концентрирующем.

Определение ферментативной активности. Активность β-глюкозидазы оценивали по образованию п-нитрофенола из пНФГ. Реакционная смесь содержала 10 мкл фермента соответствующего разведения, 170 мкл 0.1 М калий-фталатного буфера (КФБ, pH 6.2) и 20 мкл раствора субстрата (20 мМ пНФГ). После инкубации при 65°C в течение 5 мин реакцию останавливали добавлением 0.6 мл 1.0 М Na₂CO₃, и регистрировали D₄₀₅. Стандартная кривая была получена с использованием п-нитрофенола. Единицу активности TmBglA и мутантных белков определяли как количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль п-нитрофенола за 1 мин.

Активность β-глюкозидазы в реакции гидролиза с салицином в качестве субстрата определяли, анализируя количество освободившейся глюкозы (“Sigma”, США) в соответствии с модифицированным методом [9]. Реакционную смесь (0.1 мл), содержащую 1.0 мМ салицин, 50 мМ КФБ (pH 6.2) и фермент, разведенный в том же буфере, инкубировали при необходимой для протекания реакции температуре в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 0.75 мл 3,5-динитросалициловой кислоты, реакционную смесь кипятили 5 мин, охлаждали на ледяной бане и измеряли D₅₂₀ [20]. Ферментативную активность выражали в международных единицах (Ед.), как количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль глюкозы за 1 мин.

Определение концентрации белка. Общую концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд с использованием БСА (“Sigma”, США) в качестве стандарта [21].

Кинетические параметры. Для определения кинетических параметров (K_M , V_{\max} , $k_{\text{кат}}/K_M$), скорость ферментативной реакции измеряли при оптимальных концентрациях субстратов. Для салицина использовали интервал концентраций 2.0–20 мМ, и для пНФГ интервал от 0.2 до 2.0 мМ. Кинетические параметры (K_M и V_{\max}), определяли по уравнению Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнувера-Берка. Параметры, определяющие эффективность процесса $k_{\text{кат}}/K_M$, были рассчитаны при определении субстратной специфичности для каждого фермента. Для расчета $k_{\text{кат}}$, использовали значение молекулярной массы 52338 Да для TmBglA. Каждый эксперимент был проведен дважды, и каждое измерение проводили в 3 повторностях. Относительное стандартное отклонение не превышало 2%.

Зависимость от pH и температуры, термостабильность β -глюкозидазы. Оптимальное значение pH для действия фермента определяли, используя 0.1 М фталат-имидазольный буфер (ФИБ), в интервале от 3.4 до 8.2 при 80°C. Значение оптимальной температуры определяли при оптимальном pH. Аликвоты очищенного белка инкубировали при различных температурах (от 50 до 95°C), после чего активность β -глюкозидазы определяли, как это описано ниже. Самую высокую остаточную активность принимали за 100%. Для определения термостабильности очищенные ферменты предварительно инкубировали при оптимальном pH и различной температуре от 45 до 95°C в течение 1 ч без субстрата, после чего охлаждали на ледяной бане и проводили измерение активности ферментов в оптимальных условиях, как это описано выше. Активность фермента без предварительной инкубации принимали за 100%. Для исследования pH-стабильности очищенные ферменты инкубировали в 0.1 М ФИБ при различных значениях pH от 3.8 до 8.2 в течение 1 ч при 37°C, затем отобранные аликвоты вносили в стандартную реакционную смесь для определения остаточной активности фермента. Активность фермента без предварительной инкубации принимали за 100%.

Гидролиз изофлавоновых гликозидов. Для сравнения гидролитической активности 3 мутантных ферментов в реакции с изофлавоновыми гликозидами 0.1 мкМ даидзеина или генистеина инкубировали с одним из выделенных мутантных ферментов (TmBglA, M1-TmBglA, M2-TmBglA и M1M2-TmBglA) в 50 мМ ФКБ буфере (pH 6.2). Реакционную смесь выдерживали в термостате при температуре 70°C в течение 40 мин и 1 ч. Использовали равные молярные концентрации

4 ферментов с тем, чтобы исследовать их эффективность в реакции гидролиза с изофлавоновыми гликозидами. Реакции были остановлены охлаждением во льду перед измерением. Гидролизованные растворы экстрагировали 80%-ным метанолом при комнатной температуре в течение 1 ч. Метанольный экстракт центрифугировали при 13000 g в течение 20 мин. Степень гидролиза даидзеина и генистеина определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием силикагеля 60 F254 (“Yantai Jianguyou Silica Gel Development Co.”, Китай) [12]. Аликвоты метанольного экстракта наносили на пластины. Для разделения использовали смесь этилацетат–бутанол–метанол–вода (10 : 7 : 1 : 1, об./об.). Результат разделения веществ на пластинах наблюдали при OD_{254} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование, экспрессия и выделение мутантных ферментов. Были созданы три вектора экспрессии, кодирующие измененную β -глюкозидазу. Нуклеотидная последовательность каждой мутантной β -глюкозидазы А была подтверждена методом секвенирования ДНК. Ферменты TmBglA, ZmGH1 и GmGH1 обладали различным сродством как к природным флавоноидным гликозидам, так и пНФГ, поэтому аминокислотные остатки V170, A171, V173, G174 и H180 были изменены на соответствующие аминокислотные остатки из ZmGH1 фермента, т.е. были произведены следующие замены V170F /A171T /V173F /G174S /H180F. Полученный белок был обозначен M1-TmBglA. Аминокислотные остатки L400, A407 и E408 были заменены на соответствующие остатки в GmGH1, путем произведения следующих замен: L400F /A407F /E408A. Полученный белок обозначили M2-TmBglA. Двойной мутант (V170F /A171T /V173F /G174S /H180F /L400F /A407F /E408A) был назван M1M2-TmBglA. Аминокислотные последовательности измененных участков показаны на рис. 1. Мутантные ферменты и дикого типа экспрессировали в *E. coli*, выделяли с помощью Ni-аффинной хроматографии. Полученные белки проявлялись на электрофорезе в ПААГ с Na-ДДС в виде одной полосы, соответствующей белку с молекулярной массой 52 кДа (рис. 2).

Кинетические параметры β -глюкозидаз мутантных и дикого типа. Исследованы кинетические параметры мутантов и фермента дикого типа в реакции с искусственным субстратом пНФГ и природным субстратом салицином. Оба субстрата принадлежат к одной и той же группе β -гликозидов, но обладают разными агликонами. Полученные результаты приведены в табл. 2. Значения K_M (мМ) для M1-TmBglA и M1M2-TmBglA, полученные с субстратом пНФГ, – 1.14 и 1.06 соответ-

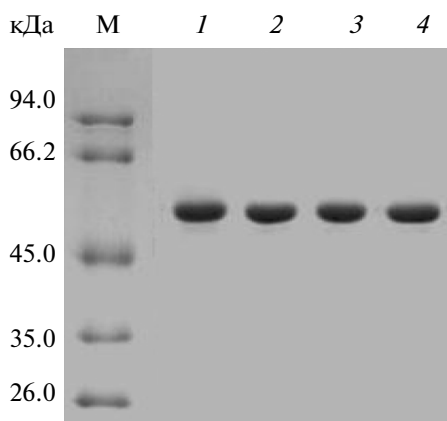


Рис. 2. Электрофорез очищенных β -глюкозидаз дикого типа и мутантов в ПААГ с Na-ДДС. М – стандарты молекулярной массы; 1 – TmBglA-WT; 2 – M1-TmBglA; 3 – M2-TmBglA; 4 – M1M2-TmBglA. (За исключением стандартов, наносили по 2 мкг белка).

ственно, выше, чем для фермента дикого типа 0.44. Значения K_M (мМ) для M2-TmBglA – 0.54 незначительно выше. Значения $k_{кат}$ (c^{-1}) для M2-TmBglA и M1M2-TmBglA – 94.3 и 18.7 соответственно, что ниже, чем для фермента дикого типа (164.6), в то же время значение $k_{кат}$ для M1-TmBglA осталось без изменений. Аналогично, значения K_M (мМ) для M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA в реакции с салицином составили 18.0, 18.3 и 18.2 соответственно, что было выше, чем для фермента дикого типа (12.4), при этом значения $k_{кат}$, полученные для M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA в реакции с салицином, составили 24.6, 34.4 и 2.33 c^{-1} соответственно, что значительно ниже по сравнению со значением для фермента дикого типа (167.7). Значения $k_{кат}/K_M$ ($c^{-1} мМ^{-1}$), полученные для M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA в реакции с пНФГ и салицином, были 141.5

и 1.35; 1.83 и 173.1; 17.4 и 0.12 соответственно, для фермента штамма дикого типа 366.3 и 13.2. Таким образом, у белков мутантов было обнаружено снижение эффективности катализа, что проявлялось в большей степени при использовании в качестве субстрата салицина, по сравнению с искусственным субстратом.

Зависимость активности мутантной β -глюкозидазы и дикого типа от температуры и pH. Зависимость активности мутантных ферментов и дикого типа от pH показаны на рис. 3 (а, в). Для фермента дикого типа и для мутанта M1-TmBglA pH-оптимум наблюдали в интервале pH 5.0–6.5 и 5.5–6.5 соответственно. Оптимальное значение pH для M2-TmBglA и M1M2-TmBglA – 6.2. Обнаружено сужение интервала pH, при котором фермент проявлял наибольшую активность, при кислых pH для мутантов M1-TmBglA и M2-TmBglA. Для мутанта M1M2-TmBglA было характерно сужение оптимального значения pH в области значений как низких, так и более высоких pH. Аналогично, было обнаружено, что M1-TmBglA обладал наибольшей стабильностью в диапазоне pH 4.2–8.3. Стабильность M1-TmBglA была выше, чем у фермента дикого типа и M2-TmBglA. В диапазоне pH 5.0–8.3 M1M2-TmBglA обладал более высокой стабильностью, чем ферменты дикого типа и M2-TmBglA. Однако уменьшение значения pH ниже 5.0 приводило к резкому снижению стабильности.

Значение оптимальной температуры и термостабильность мутантов по сравнению с этими же характеристиками фермента дикого типа показана на рис. 3 (б и г). Фермент дикого типа, M1-TmBglA и M2-TmBglA обладали максимальной активностью при 90, 85 и 80°C соответственно. Эти ферменты также были стабильны до 85°C, за исключением фермента M2-TmBglA, который полностью инактивировался при 85°C. Температурной оптимум M1M2-TmBglA – 60°C, мутантный фермент был стабилен при температурах ниже 60°C и даже при

Таблица 2. Кинетические параметры β -глюкозидаз дикого типа и мутантов*

Субстрат	Фермент	K_M , мМ	$V_{макс}$, Ед мг ⁻¹	$k_{кат}$, c^{-1}	$k_{кат}/K_M$, $c^{-1} мМ^{-1}$
пНФГ	TmBglA	0.44 ± 0.01	205.8 ± 1.0	164.6 ± 2.5	366.3 ± 0.6
	M1-TmBglA	1.14 ± 0.04	205.8 ± 2.5	164.6 ± 2.5	141.5 ± 2.9
	M2-TmBglA	0.54 ± 0.01	117.8 ± 3.1	94.3 ± 0.8	173.1 ± 1.7
	M1M2-TmBglA	1.06 ± 0.04	23.3 ± 0.4	18.7 ± 0.3	17.4 ± 0.3
Салицин	TmBglA	12.4 ± 0.3	209.6 ± 0.8	167.7 ± 0.6	13.2 ± 0.4
	M1-TmBglA	18.0 ± 0.3	30.7 ± 0.4	24.6 ± 0.3	1.34 ± 0.02
	M2-TmBglA	18.3 ± 0.3	42.9 ± 0.1	34.4 ± 0.1	1.83 ± 0.02
	M1M2-TmBglA	18.2 ± 0.4	2.97 ± 0.1	2.33 ± 0.04	0.12 ± 0.00

* Кинетические параметры определяли в пределах концентраций 2.0–20 мМ для салицина и 0.2–2.0 мМ для пНФГ. Представлены средние значения 3 экспериментов ± стандартное отклонение.

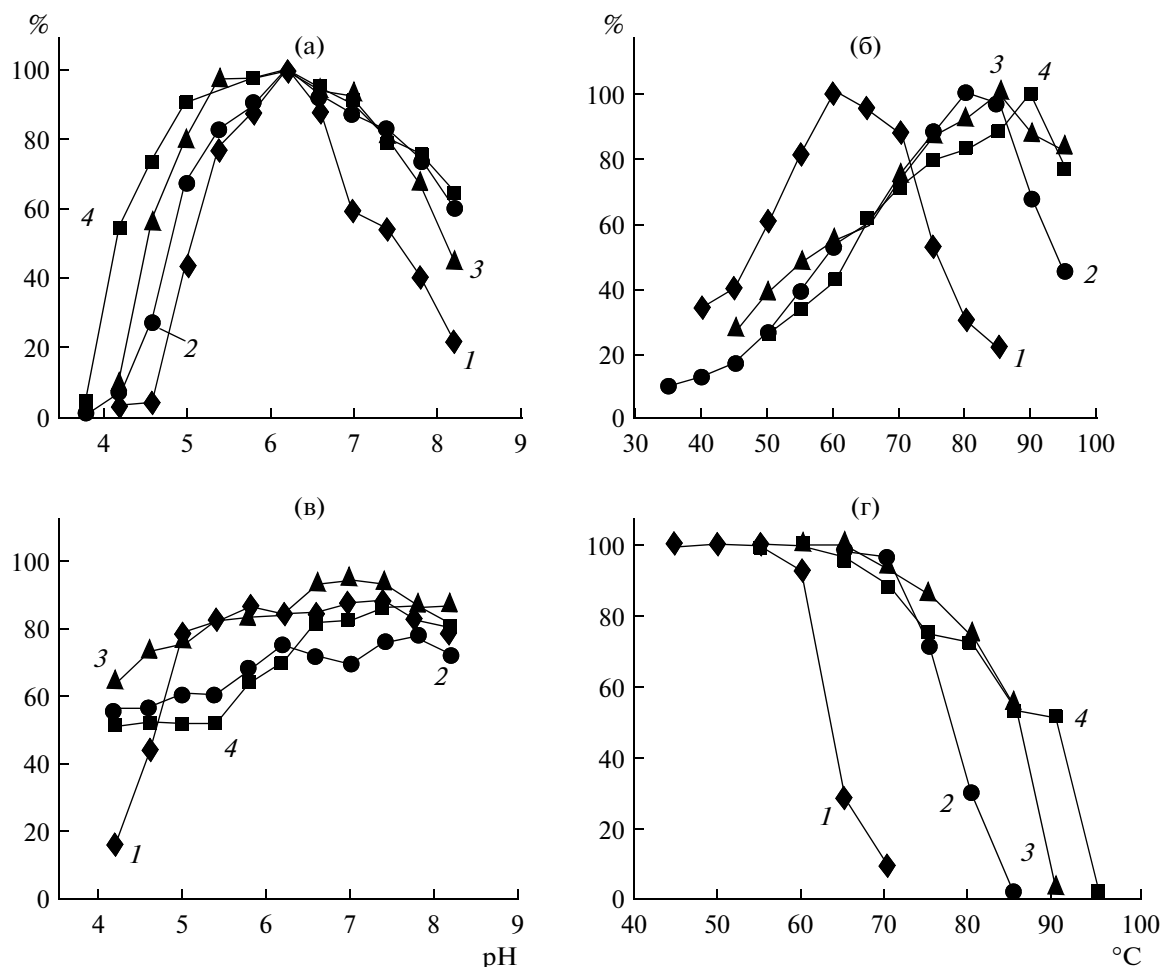


Рис. 3. Зависимость активности мутантной β -глюкозидазы M1-TmBglA (1), M2-TmBglA (2), M1M2-TmBglA (3) и дикого типа (4) от pH (а), температуры (б), pH-стабильность (в) и термостабильность (г). Представлено среднее значение 3 экспериментов, стандартное отклонение <2%.

65°C его активность снижалась на 20% от максимальной.

Гидролиз изофлавоновых гликозидов. Результаты исследования гидролиза изофлавоноидных гликозидов ферментами дикого типа и мутантно-го представлены на рис. 4. Полученные гидролизаты анализировали методом ТСХ. Два наиболее интенсивных пятна, соответствующие даидзеину и генистеину, через 40 мин реакции с TmBglA были практически полностью расщеплены. При проведении реакции с M1-TmBglA и M2-TmBglA на ТСХ обнаружено присутствие остатков этих веществ. Количество даидзеина и генистеина, оставшихся после проведения реакции гидролиза в присутствии M1M2-TmBglA, показано в рис. 4 (а, б). После 60 мин инкубации гидролиз даидзеина в присутствии M1-TmBglA и M2-TmBglA и генистеина в присутствии M1-TmBglA был завершен. Однако в реакционной смеси с генистеином и M2-TmBglA некоторое количество субстрата оставалось непрогидролизированным. При проведении реакций

гидролиза с даидзеином и генистеином в присутствии M1M2-TmBglA количество субстрата не изменялось (рис. 4 в, г). Результаты показали, что эффективность гидролиза изофлавоновых гликозидов под действием M1-TmBglA и M2-TmBglA снижена, в большей степени в реакции с генистеином в качестве субстрата в присутствии M2-TmBglA.

Аминокислотные остатки, расположенные в связывающем агликон сайте, были заменены на неконсервативные остатки, встречающиеся в семействе 1 гликозид-гидролаз (GH1) других организмов. Как показано на рис. 1, в молекуле белка TmBglA были осуществлены замены аминокислотных остатков V170, A171, V173, G174, H180 на соответствующие остатки из фермента ZmGH1 кукурузы: F, T, F, S и F соответственно. Аминокислотные остатки L400, A407 и E408 F461 были заменены на соответствующие аминокислотные остатки GmGH1 фермента сои, а именно F, F и A. Влияние этих остатков на специфичность связы-

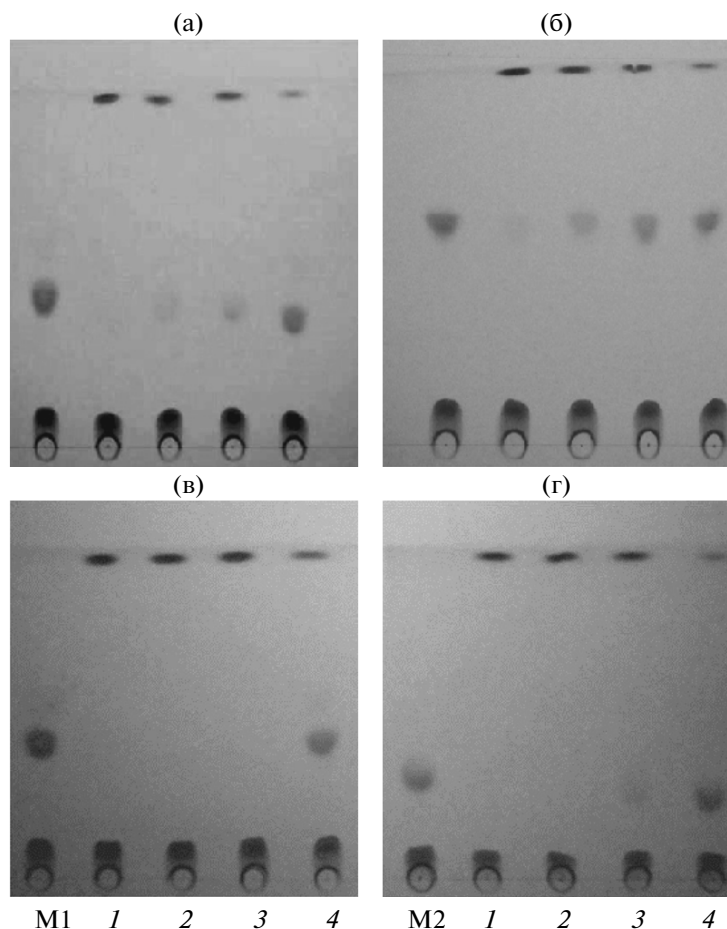


Рис. 4. ТСХ-анализ продуктов гидролиза изофлавоновых гликозидов даидзеина (а, в) и генистеина (б, г) в присутствии β -глюкозидаз мутантного и дикого типа в течение 40 мин (а, б) и 1 ч (в, г) при 65°C. M1 – даидзеин (стандарт), M2 – генистеин (стандарт), 1 – TmBglA, 2 – M1-TmBglA, 3 – M2-TmBglA; 4 – M1M2-TmBglA.

вания агликона в настоящее время не известно. Чтобы выявить роль аминокислотных остатков, расположенных в агликонсвязывающем кармане TmBglA, были созданы 3 мутанта (M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA). Все мутантные ферменты обладали каталитической активностью, что свидетельствует о том, что оригинальные остатки, расположенные в непосредственной близости от мотивов TLNER и ITENG (V170, A171, V173, G174, H180, L400, A407 и E408) не были необходимы для экспрессии β -глюкозидазы. Показано, что введенные мутации привели к сдвигам в температурном оптимуме ферментных белков, а также к уменьшению термостабильности и гидролитической активности по отношению к пНФГ и салицину.

Три измененных β -глюкозидазы обладали более низкой оптимальной температурой и термической стабильностью, чем фермент дикого типа, за исключением M1-TmBglA, стабильность которого практически не отличалась от стабильности нативного фермента. Особенно резкое снижение

оптимальной температуры и термической стабильностью было обнаружено у M1M2-TmBglA, что выявляет комбинированное воздействие M1-TmBglA и M2-TmBglA. На основании полученных результатов можно предположить, что мутации аминокислотных остатков, расположенных в областях, прилежащих мотивам TLNER и ITENG (V170, A171, V173, G174, H180, L400, A407 и E408), вызывают изменение структурной организации белка и, соответственно, оказывают влияние на зависимость активности ферментов от температуры. Можно предположить, что аминокислотные остатки, ответственные за термостабильность β -глюкозидазы A из *T. matitima*, распределены по всей аминокислотной последовательности, а не локализованы в определенных точках, что подтверждается также ранее опубликованными данными [22, 23].

Полученные результаты дают основание также предположить, что значения пределов pH проявления активности определяются значениями pK_a двух каталитических остатков. В нашем исследо-

вании сравнение рН-оптимумов фермента дикого типа TmBglA и M1-TmBglA и M2-TmBglA показали, что кривая рН-оптимума сузилась в кислой области, в то время как кривая зависимости от рН двойного мутанта имела узкий оптимум при 6.2 (рис. 3). Возможно, что замена H180F в M1-TmBglA и E408A в M2-TmBglA оказывали влияние на значение pK_a нуклеофильного глутамата (каталитические остатки в TmBglA: E166 и E351), его заряд или изменение в микроокружении фермента. Для β -глюкозидазы из *Agrobacterium tumefaciens* также был обнаружен сдвиг оптимального значения рН с уменьшением pK_a доноров протонов [24].

Более подробно изучена ферментативная кинетика (K_m , V_{max} , $k_{кат}/K_m$) β -глюкозидазы А дикого типа и мутантов в реакции гидролиза природного субстрата гликозида салицина и искусственного субстрата пНФГ (табл. 2). Показано, что для M1-TmBglA и M2-TmBglA эффективность катализа снизилась, причем уменьшение активности было значительнее при использовании в качестве субстрата салицина, чем для пНФГ. Значение $k_{кат}$ для M1-TmBglA в реакции с салицином было снижено на 85%, в то время как в реакции гидролиза пНФГ незначительно, что свидетельствует о важной роли V170, A171, V173, G174 и H180 в связывании агликона. Обнаружено, что для мутанта M2-TmBglA K_m при использовании в качестве субстрата салицина увеличивалась в 1.5 раза, в то время как значение K_m для пНФГ не изменялось, что предполагает важность остатков L400, A407 и E408 для узнавания агликона. Эти результаты согласуются с полученными ранее, в которых исследовалась специфичность цитозольной β -глюкозидазы человека к агликонам [25].

Исследование гидролиза изофлавоновых гликозидов дало интересные результаты. M1-TmBglA и M2-TmBglA снижали степень преобразования изофлавоновых гликозидов в агликоны, о чем свидетельствует снижение значения $k_{кат}/K_m$ для пНФГ и салицина, снижение каталитической эффективности в реакции с генистеином было значительнее в присутствии M2-TmBglA, по сравнению с M1-TmBglA. Эти результаты показывают, что аминокислотные остатки L400, A407 и E408 в сайте связывания агликона в TmBglA предпочтительнее, чем V170, A171, V173, G174, H180 и предпочтительнее чем аминокислотные остатки, расположенные в непосредственной близости от мотива TLNER. Вероятно, что эти аминокислотные остатки могут быть необходимы для катализа и связывания изофлавоновых гликозидов сои.

Таким образом, для того чтобы исследовать механизм связывания агликона в TmBglA с помощью мутаций были произведены замены аминокислотных остатков. Все мутантные ферменты продемонстрировали снижение каталитической

активности (рассчитанное значение селективности связывания $k_{кат}/K_m$) как в реакции с салицином так и в реакции с искусственным субстратом пНФГ. Это позволяет предположить, что определяющим для связывания субстрата и гидролиза TmBglA является конфигурация сайта связывания агликона. Более слабый гидролиз генистеина и даидзеина в присутствии M2-TmBglA, по сравнению с M1-TmBglA, указывает на то, что в TmBglA остатки L400, A407 и E408 являются более важными, чем V170, A171, V173, G174 и H180, и могут быть необходимыми для связывания соевого изофлавонового гликозида и катализа.

В дальнейшем предполагается использовать мутагенез по трем позициям L400, A407 и E408 в TmBglA для получения более эффективного гидролиза изофлавоновых гликозидов из сои.

Работа выполнена при поддержке проекта ВК2010545 Национального научного фонда провинции Цзянсу Китая.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adlcreutz H. // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2002. V. 83. № 1–5. P. 113–118.
2. Omoni A.O., Aluko R.E. // Nutr. Rev. 2005. V. 63. P. 272–283.
3. Ishimi Y., Miyaura C., Ohmura M., Onoe Y., Sato T., Uchiyama Y., Ito M., Wang X., Suda T., Ikegami S. // Endocrinology. 1999. V. 140. № 4. P. 1893–1900.
4. Izumi T., Piskula M.K., Osawa S., Obata A., Tobe K., Saito M., Kataoka S., Kubota Y., Kikuchi M. // J. Nutr. 2000. V. 130. № 7. P. 1695–1699.
5. Kawakami Y., Tsurugasaki W., Nakamura S., Osada K. // J. Nutr. Biochem. 2005. V. 16. № 4. P. 205–212.
6. Kim Y.S., Yeom S.J., Oh D.K. // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 59. № 21 P. 11812–11818.
7. Kim B.N., Yeom S.J., Kim Y.S., Oh D.K. // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. № 1. P. 125–129.
8. Yeom S.J., Kim B.N., Kim Y.S., Oh D.K. // J. Agric. Food Chem. 2012. V. 60. № 6. P. 1535–1541.
9. Song X.F., Xue Y.M., Wang Q.L., Wu X.X. // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 9. № 5. P. 1954–1961.
10. Xue Y.M., Yu J.J., Song X.F. // J. Ind. Microbiol. Biot. 2009. V. 36. № 11. P. 1401–1408.
11. Suzuk H., Takahashi S., Watanabe R., Fukushima Y., Fujita N., Noguchi A., Yokoyama R., Nishitani K., Nishino T., Nakayama T. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 40. P. 30251–30259.
12. Chuankhayan P., Rimlumduan T., Svasti J., Cairns J. // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. P. 2407–2412.
13. Oh J.H., Sun J.W., Kim J.Y., Lee I. // Food Sci. Biotechnol. 2008. V. 17. № 5. P. 1021–1024.
14. Yang S.Q., Wang L.J., Yan Q.J., Jiang Z.Q., Li L.T. // Food Chem. 2009. V. 115. № 4. P. 1247–1252.
15. Zechel D.L., Boraston A.B., Gloster T., Boraston C.M., Macdonald J.M., Tilbrook D.M.G., Stick R.V., Davies G. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125 P. 14313–14323.

16. Henrissat B., Bairoch A. // *Biochem J.* 1996. V. 316. P. 695–696.
17. Keresztessy Z., Brown K., Dunn M.A., Hughes M.A. // *Biochem. J.* 2001. V. 353. P. 199–205.
18. Kaper T., Heusden H.H.V., Loo B.V., Vasella A., Oost J.V.D., Willem M.D.V. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. P. 4147–4155.
19. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
20. Miller G. // *Analyt. Chem.* 1959. V. 31. P. 426–428.
21. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1967. V. 72. P. 248–254.
22. Goyal K., Kim B.J., Kim J.D., Kim Y.K., Kitaoka M., Hayashi K. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2002. V. 407. P. 125–134.
23. Lebbink J.H.G., Kaper T., Bron P., John O., Willem M.V. // *Biochemistry.* 2000. V. 39. P. 3656–3665.
24. Li Y., Kitaoka M., Hayashi K. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004. V. 68. № 5. P. 1113–1118.
25. Berrin J.G., Czjzek M., Kroon P.A., Mclauchlan W.R., Puigserver A., Williamson G.J.N. // *Biochem. J.* 2003. V. 373. P. 41–48.

Residues Affecting Hydrolysis of Soy Isoflavone Glycosides, Stability and Catalytic Properties of *Thermotoga maritime* β -glucosidase¹

Y. Xue^a, X. Song^b, H. Sun^b, and Z. Cao^c

^a Department of Food Science and Nutrition, GinLing College, Nanjing Normal University, Nanjing, PR China 210097

^b College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, PR China 210023

^c Urology Surgery, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, PR China 210006

e-mail: caozhigang11@sina.com; xueyemin@njnu.edu.cn

Received October 15, 2012

Abstract—The thermostable β -glucosidase A (TmBglA) from *Thermotoga maritime* is a promising biocatalyst for production of isoflavone aglycones. Use of enzymes with high specificity for soy isoflavone conjugates is however essential for efficient hydrolysis. The effect of the amino acids located in the aglycone binding pocket with non-conserved residues between specificity groups in family 1 glycoside hydrolase (GH1) was studied using wild-type TmBglA and 3 exchange mutants (M1-TmBglA, M2-TmBglA, M1M2-TmBglA). Three mutants were expressed in *Escherichia coli*, purified and characterized. They had shifts in both optimum temperature and thermal stability, and their narrowing pH-activity curve caused by removing the ionized side chain in mutation. All mutants demonstrated the decreased catalytic efficiency more effectively revealed with natural glycoside, salicin, than with artificial substrate, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, suggesting that these amino acids are the key residues to determine aglycone specificity. A lower hydrolysis of genistin and daidzin for M2-TmBglA than M1-TmBglA indicated that L400, A407 and E408 being preferable to V170, A171, V173, G174 and H180 residues of Tm-BglA could be essential for soy isoflavone glycoside binding and catalysis.

УДК 615.779.9

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА СОЕДИНЕНИЙ С АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ НОВОГО ПОЧВЕННОГО ИЗОЛЯТА *Streptomyces rimosus* МТСС 10792

© 2013 г. Н. Сингх*, В. Рай*, С. Трипати**

*Лаборатория биохимии и микробиологии школы естественных наук университета г. Шукла, Райпур,
Пт. Равишанкар 492010, Индия

**Кафедра технологии ферментации Центрального научно-исследовательского института лекарств,
Лакхнау, 226 001, Индия
e-mail: nevi0007@gmail.com

Поступила в редакцию 29.10.2012 г.

Идентифицирован новый штамм *Streptomyces* sp., выделенный из почвы штата Чхаттисгарх (Индия), имеющий широкий спектр антибактериальной и противогрибковой активности. На основании исследования физиолого-биохимических свойств и последовательности 16S рРНК выделенный активный штамм был отнесен к *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* (10792 МТСС). Антимикробная активность соединений, выделенных из *S. rimosus*, изучена по отношению к резистентным к антибиотикам патогенным бактериям по методу Бауэра и Кирби. Активные метаболиты экстрагировали из культуральной жидкости *n*-бутанолом и проводили очистку методом хроматографии на силикагеле и ВЭЖХ. Охарактеризованы физико-химические свойства одного из выделенных соединений: цвет, температура плавления, растворимость, исследован элементный анализ, проведены химические реакции, на наличие химических групп, проанализированы данные масс-спектрометрии (ESI-МС), ИК- и, УФ-спектроскопии, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР. Очищенное противомикробное соединение, синтезируемое *S. rimosus* МТСС 10792, в концентрации 25 мкг/мл обладало противотуберкулезной активностью по отношению к *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* H37R, а также антимикробной активностью в отношении всех протестированных бактериальных и грибных патогенов.

DOI: 10.7868/S0555109913050115

Резистентность большого количества патогенных бактерий и грибов к биологически активным вторичным метаболитам, используемым в качестве лекарственных средств, ставит перед исследователями задачи поиска новых противогрибковых и антибактериальных веществ, необходимых для борьбы с этими патогенами. Нитчатые почвенные бактерии, принадлежащие к роду *Streptomyces*, продуцируют большое количество естественных продуктов, обладающих биологической активностью, широко применяемых в качестве лекарственных средств и агрохимикатов. Из этих бактерий получают около 75% коммерческих и терапевтически важных антибиотиков [1]. При отборе культур с антимикробной активностью из образцов почвы, собранных в центральном штате Индии Чхаттисгарх, был выделен штамм *Streptomyces rimosus*. Этот штамм широко известен тем, что именно он секретирует окситетрациклин и другие антибиотики, производные тетрациклина. В 1950 г. А.С. Финлей и корпорация “Пфайзер” объявили об открытии аналогичного антибиотика, полученного также из *S. rimosus*, который был назван тетрациклин (переименован в окситетрациклин позднее) [2]. Окситетрациклин и его про-

изводные являются антибиотиками широкого спектра действия, ингибируют синтез белка у бактерий путем связывания с 30S-субъединицей рибосом. Производные окситетрациклина образуются с помощью хорошо развитой генетической системы *S. rimosus* [3, 4]. Кроме окситетрациклина были обнаружены новые соединения – стрептопирролы, полученные из *S. rimosus* с белком гистидинкиназой, которые обладали антимикробной активностью [5]. О выделении и очистке противогрибковых соединений из *S. rimosus* MY02 сообщалось в работе [6]. Исследование природных изолятов может дать большой материал для обнаружения и синтеза новых химических соединений, поэтому исследователи направляют свое внимание на изучение необычных и ранее не исследованных экосистем, для выявления новых фармацевтических объектов [7, 8].

Цель работы – выделение и исследование химических свойств антимикробных соединений, продуцируемых новыми изолятами *S. rimosus* МТСС 10792.

МЕТОДИКА

Организм-продуцент. Биологически активный изолят, названный Y8, был выделен из образцов почвы в заповеднике штата Чхаттисгарх (Индия). Культуру выделенного изолята поддерживали в пробирках на скошенной агаризованной среде ISP-2, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт – 4.0, солодовый экстракт – 10.0, глюкоза – 4.0, CaCO₃ – 2.0 и агар – 20.0. Морфологические и физиологические свойства штамма были изучены в рамках международного проекта *Streptomyces* (ISP) [9]. Культура таксономически определена на основании гомологии 16S рРНК и сравнения с микробной коллекцией типовых культур (МТСС), Чандигарх, Индия, и отнесена к *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* МТСС 10792.

Штаммы тест-культур, использованные для оценки антимикробной активности. Для выявления антимикробной активности исследуемого соединения *S. rimosus* МТСС 10792 были использованы следующие микроорганизмы: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *Bacillus subtilis* (МТСС 1789), *Bacillus pumilus* (МТСС 1607), *Bacillus megaterium* (МТСС 1684), *Bacillus cereus* (МТСС 1305), *B. cereus* (АТСС 10876), *Staphylococcus aureus* (МТСС 96), *S. aureus* (МТСС 737), *Staphylococcus epidermidis* (МТСС 435), *Salmonella typhi* (МТСС 531), *Proteus vulgaris* (МТСС 1771), *Klebsiella pneumoniae* (МТСС 2405), *Escherichia coli* (МТСС 1667), *E. coli* (МТСС 739), *E. coli* (МТСС 1687), *E. coli* (АТСС 35218) *Candida albicans* (МТСС 1637), *C. albicans* (МТСС 184), *C. albicans* (МТСС 183), *Candida tropicalis* (МТСС 3017), *Aspergillus niger* (МТСС 872), *Aspergillus fumigatus* (МТСС 2544), *Alternaria alternata* (МТСС 1779), *Penicillium citrinum* (МТСС 1751), *Saccharomyces cerevisiae* (МТСС 170), *Tricophyton rubrum* (МТСС 296). Бактериальные культуры выращивали при 37°C на агаризованной среде, содержащей (г/л): пептон – 5.0, мясной экстракт – 3.0, NaCl – 5.0, агар – 20.0. Культуры грибов выращивали при 28°C на декстрозном агаре Сабуро, содержащем (г/л): пептон – 10.0, глюкоза – 40.0, агар – 20.0 [8]. Все культуры хранили при 4°C и поддерживали, регулярными посевами.

Выращивание *S. rimosus* МТСС 10792 для получения антимикробных препаратов. Активный штамм Y8 засеивали в 250 мл колбы Эрленмейера с 50 мл питательной среды, содержащей глюкозу, дрожжевой и солодовый экстракт. Культуру выращивали при 28°C и 180 об./мин на роторном шейкере. Через 3 дня 2% инокулята переносили в конические колбы, объемом 1.0 л, содержащие 200 мл глюкозно-соевой среды, следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0, соевый экстракт – 10.0, NaCl – 10.0, CaCO₃ – 2.0. Культуру инкубировали в тех же условиях в течение еще 3 сут и на втором этапе использовали в качестве инокулята для фермен-

тации в 3 л реакторе, содержащем 1.5 л глюкозно-соевой среды. рН среды доводили до 7.5, скорость аэрации составила 1 об./об. мин. Образование пены подавляли с помощью стерильной силиконовой добавки (“Himedia”, Индия).

Выделение и очистка. Полученную в реакторе жидкую культуру фильтровали через фильтровальную бумагу (ватман № 1), затем фильтрат центрифугировали при 10000 g 20 мин. Прозрачный фильтрат исследовали на наличие антимикробной активности с различными штаммами микроорганизмов.

Экстракцию антимикробных соединений проводили *n*-бутанолом в соотношении 1 : 1 (об./об.). Органическую фазу выпаривали в вакууме на роторном испарителе при температуре 30°C. Очистку антимикробных агентов проводили с использованием колонки с силикагелем (3.2 × 62 см). Колонку предварительно оставляли на ночь для того, чтобы силикагель был полностью уравновешен гексаном. Для адсорбции на поверхность колонки с силикагелем наносили 10 г фильтрата. Элюцию проводили градиентом гексана и этилацетата (10–100%) с увеличением содержания этилацетата, затем следовала элюция этилацетатом и метанолом (10–50%), после чего использовался 100% метанол. Было отобрано шестнадцать фракций (по 2.5 мл каждая), в которых была протестирована антимикробная активность. Активные фракции объединяли, концентрировали и подвергали дальнейшей очистке (около 2.83 г) на второй кремниевой колонке с использованием системы растворителей этилацетат: метанол (2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0 и 100% метанол). Частично очищенный активный метаболит (300 мг) был дополнительно очищен с помощью ВЭЖХ, La Chrom, L-7400 (“Мерк”, Германия) в обращенно-фазовой колонке с диоксидом кремния (С-18) с использованием системы вода–ацетонитрил (80 : 20), элюцию проводили со скоростью 0.5 мл/мин. Выход веществ с колонки оценивали спектрофотометрически при длине волны 254 нм.

Физико-химические свойства антимикробных соединений. Спектр в ультрафиолетовой области (200–500 нм) получали в метаноле, регистрировали на спектрофотометре PerkinElmer Lambda-25 UV (“PerkinElmer”, США), инфракрасный (ИК) спектр на спектрометре FT-IR-PerkinElmer RX-1 (США) в области 200–4000 см⁻¹ с использованием методики с гранулированным КВг [15]. Масс-спектр получали на масс-спектрометре Micromass Quattro II (США). Для полного определения структуры были получены также ¹H- и ¹³C-спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) соединения в дейтерированной воде (D₂O), которые регистрировали на спектрометре Varian Inova Instrument (США) с частотой 300 МГц. Элементный

анализ был проведен с использованием прибора Carlo Erba 1106 CHNO /S (Великобритания). Температура плавления была определена с использованием WRS-1B цифрового аппарата плавления (“Zhengzhou Voke Instrument EquipmentCo”, Китай). Активные соединения, полученные при выращивании *S. rimosus* МТСС 10792, были определены в соответствии с рекомендованными международными стандартами [10–14].

Химические свойства антимикробных соединений. Были проведены следующие качественные реакции: Молиша, Фелинга, Сакагучи, Эрлиха, Миллона, Майера, реакция с нингидрином, нитропруссидом, реакция с сульфатом свинца и хлоридом железа [15].

Биологическая активность. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) очищенного антимикробного соединения рассчитывали, используя метод серийных разведений в соответствии с рекомендациями Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (2000 г.). Антимикробную активность оценивали с использованием микропланшетов с аламаровым синим (МАВА) [23].

Суспензии *M. tuberculosis* H37Ra и *M. tuberculosis* H37Rv готовили в концентрации $\sim 10^5$ кл./мл, после чего по 100 мкл вносили в каждую лунку планшета, где смешивали с исследуемым соединением, полученным из *S. rimosus* МТСС 10792 (концентрация 10 мкг/мл среды Мидлбрук 7Н9 [23]), чтобы конечный объем был равен 200 мкл. После 6 сут инкубации в лунки планшета добавляли 20 мкл красителя аламаровый синий, после чего анализировали результаты. Изменение цвета от голубого до розового было показателем роста *M. tuberculosis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм-продуцент. Получен новый изолят *S. rimosus* Y8 из почвы заповедника Чхаттисгарх (Индия). Выделенный штамм обладал антимикробной активностью в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Исследование антимикробной активности показало следующие результаты: антигрибная активность составила 35 мм для *Sachromyces cereviseae* (МТСС 170), 32 мм для *Tricophyton rubrum* (МТСС 296), *Penicillium citrinum* (МТСС 1751), *Candida albicans* (МТСС 184), 28 мм для *Candida tropicalis* (МТСС 3017), 27 мм *C. albicans* (МТСС 1637), 19 мм для *Alternaria alternate* (МТСС 1779), 12 мм *Aspergillus fumigatus* (МТСС 2544), *Candida albicans* (МТСС 183), 10 мм *Aspergillus niger* (МТСС 872). Антибактериальная активность составила: 39 мм для *Staphylococcus aureus* (МТСС 96), 30 мм для *S. aureus*

(МТСС 737), 33 мм для *Salmonella typhi* (МТСС 531), 31 мм для *Bacillus cereus* (МТСС 1305), 26 мм для *B. cereus* (АТСС 10876), 29 мм для the *Bacillus subtilis* (МТСС 1789), *Bacillus megaterium* (МТСС 1684), 24 мм для *Proteus vulgaris* (МТСС 1771) и *Klebsiella pneumoniae* (МТСС 2405), 23 мм для *Staphylococcus epidermis* (МТСС 435) и *Bacillus pumilus* (МТСС 1607), 28 мм для *Escherichia coli* (АТСС 35218), 20 мм для *E. coli* (МТСС 739), 18 мм для *E. coli* (МТСС 1687), 13 мм для *E. coli* (МТСС 1667).

На среде ISP-2 штамм Y8 хорошо рос, образуя отдельные колонии. Цвет вегетативного мицелия – светло-желтый, цвет воздушного мицелия – грязно-белый. Изучение культурально-морфологических и физиологические свойств штамма Y8 показало, что исследуемый штамм близок к роду *Streptomyces*. Основываясь на данных гомологии 16S рРНК, штамм был отнесен к *Streptomyces rimosus* supsp. *rimosus* и ему был присвоен № 10792 МТСС. Проведено исследование фрагментов последовательности 16S рРНК штамма *S. rimosus*, обозначенного как Y8, методом анализа Basic Local Alignment Search (BLAST) с использованием базы данных NCBI. Соотнесение последовательностей ДНК позволило построить филогенетическое дерево методом “объединения соседей” с использованием MEGA 4.0.2 – биологически-ориентированных программ для эволюционного анализа ДНК и белковых последовательностей [16]. Результаты показали, что штамм Y8 был идентичен *Streptomyces rimosus* supsp. *rimosus* JCM4667 (№ в генбанке AB045883/2799), так как сходство последовательностей 16S рРНК этих двух бактерий составило 99.52%.

Ферментация, выделение и очистка. Оптимизацию условий выращивания проводили в лабораторном ферментере. За образованием антимикробного соединения и ростом биомассы следили в течение 14 сут (данные не представлены). Образование антибиотика детектировалось в культуральной жидкости после 12 ч. Концентрация антибиотика была максимальной (47 мг/л) в стационарной фазе после 96 ч инкубации. Максимальный выход антимикробных метаболитов наблюдали в поздней логарифмической фазе роста, т.е. синтез и выделение в среду происходили параллельно с ростом культуры. Было отмечено, что накопление других антибиотиков, таких как сефаломин С и клавулановая кислота в определенных средах, также наблюдалось параллельно с ростом микроорганизмов [17].

После окончания процесса ферментации культуральную жидкость фильтровали, центрифугировали при 10000–12000 g 15 мин. Осветленный фильтрат, содержащий активный метаболит, доводили до pH 7.0 и экстрагировали антимикробные вещества *n*-бутанолом соотношении 1 : 1 (об./об.). Органическую фазу выпаривали при комнатной

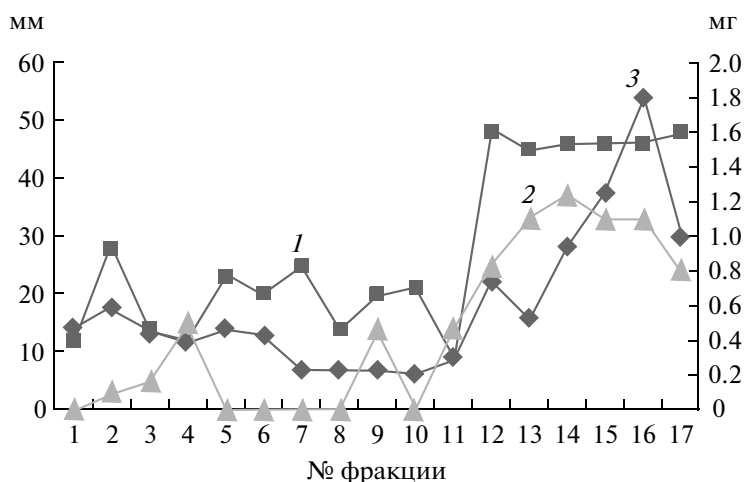


Рис. 1. Очистка содинений с антимикробной активностью из культуральной жидкости *S. rimosus* MTCC 10792 на колонке с силикагелем. 1 – *B. subtilis*; 2 – *C. albicans*; 3 – выделенное соединение (мг). Соотношение растворителей при элюции (№ фракции): 1 – 100% гексана, 2 – 10% этилацетат : гексан, 3 – 20% этилацетат : гексан, 4 – 30% этилацетат : гексан, 5 – 40% этилацетат : гексан, 6 – 50% этилацетат : гексан, 7 – 60% этилацетат : гексан, 8 – 70% этилацетат : гексан, 9 – 80% этилацетат : гексан, 10 – 90% этилацетат : гексан, 11 – 100% этилацетата, 12 – 10% метанол : этилацетат, 13 – 20% метанол : этилацетат, 14 – 30% метанол : этилацетат, 15 – 40% метанол : этилацетат, 16 – 50% метанол : этилацетат, 17 – 100% метанола.

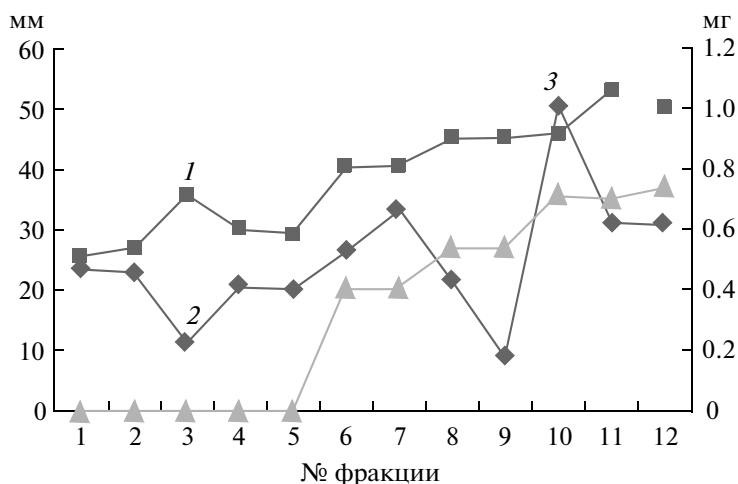


Рис. 2. Повторная хроматография активного метаболита *S. rimosus* MTCC 10792 на колонке с силикагелем. 1 – *B. subtilis*; 2 – *C. albicans*; 3 – выделенное соединение (мг). Соотношение растворителей при элюции (№ фракции): 1 – 100% этилацетата, 2 – 2.5% метанол : этилацетат, 3 – 5% метанол : этилацетат, 4 – 7.5% метанол : этилацетат, 5 – 10% метанол : этилацетат, 6 – 15% метанол : этилацетатацетат, 7 – 20% метанол : этилацетат, 8 – 25% метанол : этилацетат, 9 – 30% метанол : этилацетат; 10 – 40% метанол : этилацетат; 11 – 50% метанол : этилацетат, 12 – 100% метанола).

температуре и пониженном давлении на роторном испарителе. В результате был получен порошок темно-желтого цвета. Фракции, собранные после хроматографии на силикагеле в градиенте растворителя 10, 20, 30, 40, 50 метанол: этилацетат и 100%-ного метанола (об./об.) обладали антибактериальной активностью в отношении *B. subtilis* с зоной ингибирования от 45 до 48 мм. Эти фракции также показали противогрибковую активность в отношении *C. albicans* с зоной ингибирования от 24 до 37 мм (рис. 1). Наиболее активные фракции

были нанесены на вторую колонку с силикагелем. В ходе очистки было установлено, что наиболее активные фракции, обладающие значительной антибактериальной активностью, это 3–12, фракции с противогрибковой активностью – это фракции с 8 по 12 (рис. 2). Полученные после повторной очистки на силикагеле фракции, имеющие самые высокие показатели антибактериальной и противогрибковой активности объединяли (~2.83 г) и подвергали дополнительной очистке с использованием полупрепаративной ВЭЖХ в

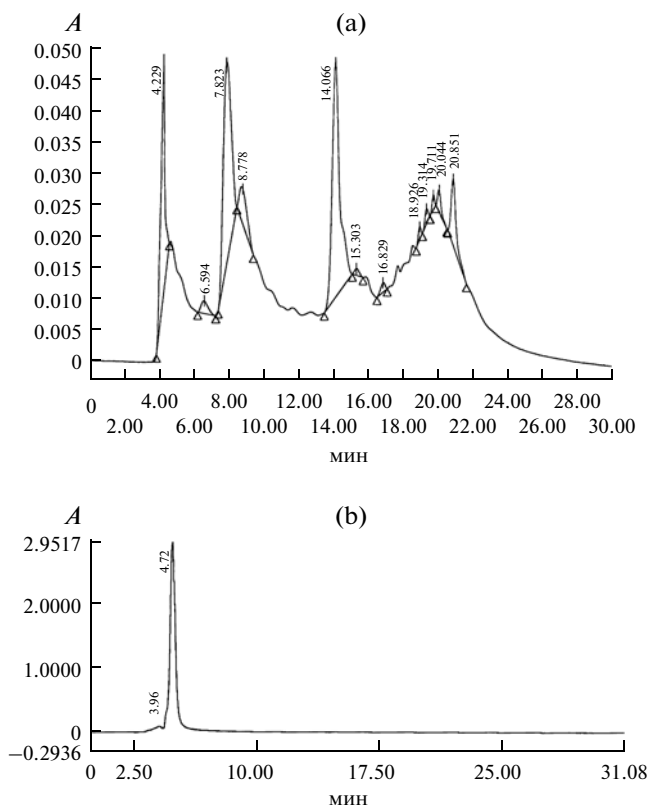


Рис. 3. ВЭЖХ частично очищенного активного метаболита из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792 после повторной хроматографии на колонке с силикагелем (а) и фракции 4.229 (б).

системе растворителей вода–ацетонитрил (80 : 20) с использованием С-18 колонки с обращенной фазой. Во фракциях определяли поглощение при 254 нм. По результатам очистки ВЭЖХ были собраны три основных пика с временами удерживания 4.229, 7.823 и 14.060 (рис. 3). Фракции собирали и тестировали на антимикробную активность. Пик, показавший время удерживания 4.229, обладал антибактериальной активностью, пик с временем удерживания 14.060 обладал противогрибковым действием. Три пика были дополнительно очищены с помощью ВЭЖХ, окончательно очищенный продукт с антибактериальной активностью имел время удерживания 4.7 мин при использовании системы растворителей вода–ацетонитрил (80 : 20) при 254 нм, с использованием С-18 колонки с обращенной фазой (рис. 3).

УФ-спектроскопия. УФ-спектр соединения с антимикробной активностью, выделенного из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792 (рис. 4), указывает на наличие в нем карбонильных групп и ароматических колец с максимумом поглощения при $\epsilon_{\text{макс}}$ (MeOH) 363 и 266 нм, что согласуется с результатами полученными другими авторами [18–20].

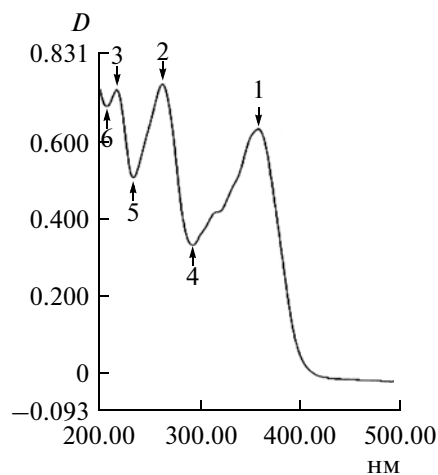


Рис. 4. УФ-спектр выделенного антибиотика. Пики 1 и 2 с максимумом поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$) при 363 нм и 266 нм соответствуют карбонильной группе и ароматическому кольцу, пик 3 вблизи 220 нм – пептидной группе, пик 4 с ($\lambda_{\text{макс}}$) 293 нм – карбонильной группе; пик 5 и 6 ($\lambda_{\text{макс}}$) 230 нм и 208 нм – амидной группе.

Масс-спектроскопия. Масс-спектр соединения с антимикробной активностью, выделенного из *S. rimosus* МТСС 10792, позволил определить молекулярную массу очищенного соединения, которая составляла 461.00 (рис. 5а). Это значение очень близко к молекулярной массе окситетрациклина (460.43) и указывает на то, что выделенное соединение принадлежит к группе окситетрациклина [20].

Элементный анализ. В результате элементного анализа соединения с антимикробной активностью, выделенного из культуральной среды *S. rimosus* МТСС 10792, были получены следующие значения для С = 57.39; Н = 4.98 и N = 6.15, что близко к значениям С = 57.20; Н = 5.21 и N = 6.08 (табл. 1) соответствующим эмпирической формуле $C_{22}H_{24}N_2O_9$ окситетрациклина.

Инфракрасная спектроскопия. ИК-спектр чистого соединения был получен с использованием гранул КВг [5]. В спектре присутствовали следующие пики (см^{-1}): 3351 (NH полоса, соответствующая колебаниям первичного амина), 3806 (ОН полоса, соответствующая циклогексану), 3780 (СО–NH полоса – колебаниям амида или амидной карбонильной группы), 1627 (C=O), 1454 (C=C полоса соответствовала колебаниям Ar–H), 1358 (C–N полоса – колебания третичного амина или диметил-амин), 1235 (C–O полоса, соответствовала колебаниям вторичного спирта), 1175 (C–O полоса, колебаниям высшего спирта), 945 (C=C полоса, колебаниям алкена/C–H алкенов), 771 (ароматические C–H или ненасыщенным ароматические C–H) соответственно (рис. 5б) [21, 22].

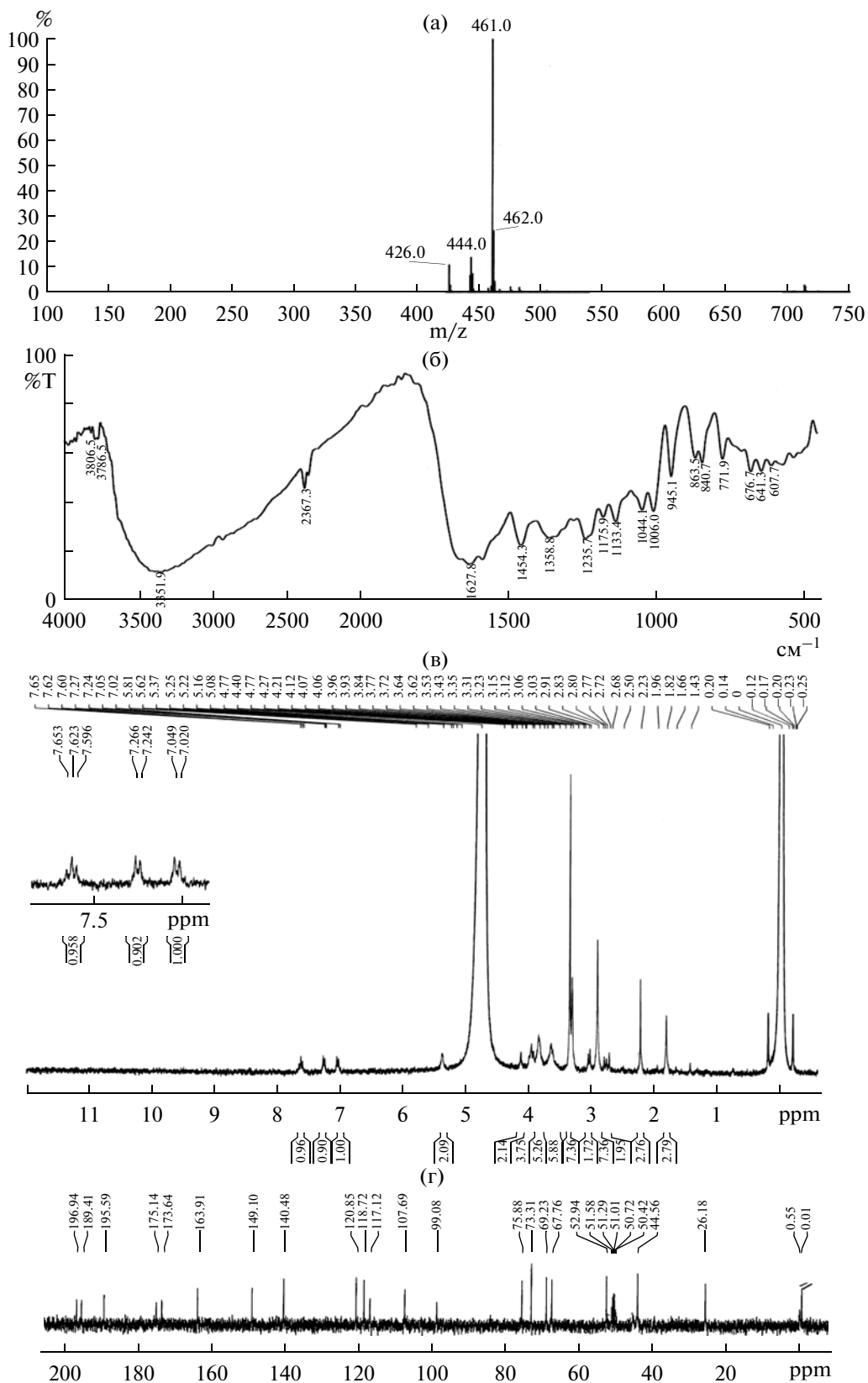


Рис. 5. Масс-спектр (а), ИК- (б), ^1H -ЯМР- (в) и ^{13}C -ЯМР-(г) спектры антимикробного соединения, выделенного из культуральной жидкости *S. rimosus* MTCC 10792.

Таблица 1. Сравнение соединения с антимикробной активностью, выделенного из культуральной среды *S. rimosus* МТСС 10792, с антибиотиком окситетрациклином

Свойства	Выделенное антимикробное соединение	Окситетрациклин
Температура плавления	185	183–185
Молекулярная масса	461	460.4
Химический анализ:		
С	57.2	57.39
Н	5.21	4.98
N	6.08	6.15
Формула	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉
Активен по отношению	Грам + и Грам-бактерии	Грам + и Грам-бактерии

Таблица 2. Химические тесты, проведенные для антимикробного соединения из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792

Химический тест	Результат	Комментарии
Реакция Молиша	Грам +	Наличие сахара
Реакция с нитропруссидом	Грам +	Присутствие аминов
Реакции с хлоридом железа	Грам –	Отсутствие ди-кетонов или енольной группы
Реакция Фелинга	Грам +	Присутствие свободных альдегидов и/или кетонов сахаров
Реакция Сакагучи	Грам –	Отсутствие Arg
Реакция с сульфатом свинца	Грам –	Отсутствие аминокислот, содержащих серу
Мейер реакции	Грам +	Присутствие нитро-группы
Реакция Эрлиха	Грам –	Отсутствие индольной группы
Реакция Милона	Грам –	Отсутствие тирозина
Реакция с нингидрином	Грам +	Присутствие свободной-NH ₂ группы
Реакция Толлена	Грам +	Отсутствие ароматического амина

¹H-ЯМР (D₂O обмен) δ. ¹H-ЯМР-спектр антимикробного соединения, выделенного из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792, показан на рис. 5в. На полученном спектре ¹H-ЯМР можно видеть следующие различные пики: 7.009–7.58 (m, 3H, CH от Ar–H), 2.25–5.00 (m, 4H, CH алифатического кольца) и 1.60–3.06 (s, 9H, CH от CH₃).

¹³C-ЯМР (D₂O обмен) δ. ¹³C ЯМР-спектр представлен на рис. 5г. На спектре представлены различные пики: 195.5–196.9 (>C=O или карбонил алифатического кольца); 175.15 (H₂N > C=O или карбонил амид); 163.9–189 (C=C или 1-этилен); 75.8–99.0 (1-этилен) или 75.8–189 (этилен или C=C алифатические соединений), 107–149 (Ar–H или фенил); 44.5–73.3 (циклогексан кольцо), 26.1–69.23 (–CH₃).

Физико-химические свойства антимикробного соединения. Антимикробное соединение из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792 было выделено в виде бледно-желтого порошка с температурой плавления 185°C с амфотерными свой-

ствами. Соединение легко растворялось в метаноле, соляной кислоте, этаноле, воде, *n*-бутаноле, ацетоне, этиловом спирте, бензоле и изопропиловом спирте, но не растворялось в петролейном эфире, гексане и хлороформе.

Химические свойства антимикробного соединения. Выделенное соединение дало положительные результаты в следующих тестовых реакциях: Молиша, в реакции с нитропруссидом, с раствором Фелинга, реакции Майяра, в тесте с нингидрином, в реакции серебряного зеркала. Результаты тестовых реакций с хлоридом железа, тестом Сакагучи, реакции с сульфатом свинца, реакции Эрлиха и реакция Миллона были отрицательными (табл. 2).

Биологическая активность выделенного соединения. Выделенное из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792 соединение обладало активностью против широкого спектра микроорганизмов, обладающих множественной резистентностью к лекарственным средствам, штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также противотуберкулезной активностью.

Таблица 3. Минимальная ингибирующая концентрация антимикробного соединения, выделенного из культуральной жидкости *S. rimosus* МТСС 10792, и окситетрациклина

Исследуемый организм	Выделенное соединение, мкг/мл	Окситетрациклин, мкг/мл
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	25.00	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25.00	—
<i>Bacillus subtilis</i> (МТСС 1789)	6.25	6.25
<i>Bacillus pumilus</i> (МТСС 1607)	6.25	6.25
<i>Bacillus megaterium</i> (МТСС 1684)	12.50	6.25
<i>Bacillus cereus</i> (МТСС 1305)	12.50	6.25
<i>Bacillus cereus</i> (АТСС 10876)	12.50	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i> (МТСС 96)	6.25	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (МТСС 737)	6.25	6.25
<i>Staphylococcus epidermis</i> (МТСС 435)	6.25	6.25
<i>Salmonella typhi</i> (МТСС 531)	6.25	6.25
<i>Proteus vulgaris</i> (МТСС 1771)	12.50–25.00	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (МТСС 2405)	12.50–25.00	12.50
<i>Escherichia coli</i> (МТСС 1667)	6.25–12.50	12.50
<i>Escherichia coli</i> (АТСС 35218)	6.25–12.5	12.5

Выделенное соединение в концентрации 25 мкг/мл ингибировало рост *M. tuberculosis* H37Rv и *M. tuberculosis* H37Ra, что свидетельствовало о том, что выделено новое соединение, не выявленное ранее у штаммов *S. rimosus* (табл. 3).

Необходимость разработки новых антибиотиков для борьбы с бактериями, которые обладают множественной лекарственной резистентностью, представляет значительные трудности и ставит новые задачи перед биотехнологией и фармацевтической промышленностью. *S. rimosus* используется в промышленности для производства окситетрациклина. Штамм *S. rimosus* первоначально был выделен из почвы. Новый активный продуцент, идентифицированный как *S. rimosus* subsp. *rimosus* МТСС 10792 также выделен из почвы в заповеднике Чхаттисгарх (Индия) для исследования его антимикробной активности. Анализ выделенного из культуральной жидкости этого микроорганизма соединения показал, что оно принадлежит к группе окситетрациклина. Соединение обладало широким спектром антибактериальной активности как по отношению к грамположительным, так и грамотрицательным бактериям с множественной лекарственной резистентностью, а также противотуберкулезной активностью. Синтезируемое этим штаммом другое вещество, которое не было до конца очищено, показывало высо-

кую активность по отношению к грибам. В настоящее время его химическое строение изучается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orellana S., Soto C., Torala M.I. // Spectrochim. Acta. Part A. 2010. V. 75. № 1. P. 437–443.
2. Finlay A.C., Hobby G.L., Pan S.Y., Regna P.P., Routein J.B., Seeley D.B., Shull G.M., Sobin B.A., Solomons I.A., Vinson J.W., Kane J.H. // Science. 1950. V. 11. P. 85.
3. Alacevic M., Strasek-Vesligma J., Sermonti G. // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 77. P. 173–185.
4. Friend E., Warren J., Hopwood M. // J. Gen. Microbiol. 1978. V. 106. P. 201–206.
5. Trew S.J., Wrigley S.K., Pairet L., Sohal J., Shanu-Wilson P., Hayes M.A., Martin S.M., Manohar R.N., Chicarelli-Robinson M.I., Kau D.A., Byrne C.V., Wellington E.M., Moloney J.M., Howard J., Hupe D., Olson E.R. // J. Antibiot. 2009. V. 53. № 1. P. 1–11.
6. Qiu Liu, Jicheng Yu., Jianfang Y., Xiaohui Q., Changjian L., Hua J. // J. Phytopathol. 2009. V. 157. № 5. P. 306–31
7. Cragg G.M., Newman D.J., Snader K.M. // J. Nat. Prod. 1997. № 1. V. 60. P. 52–60.
8. Hedge V.R., Puar M.S., Dai P., Pu H., Patel M., Anthes J.C., Richard C., Terracciano J., Das P.R., Gullo V. // J. Antibiotics. 2010. V. 54. № 2. P. 125–135.

9. *Shirling E.B., Gottlieb D.* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1966. V. 16. P. 313–340.
10. *Berdy J.* // Adv. Appl. Microbiol. 1974. V. 14. P. 309–406.
11. *Berdy J.* // Proc. Biochem. 1980. V. 15. P. 28–35.
12. *Berdy J.* CRC Handbook of Antibiotic Compounds. Florida 1. Boca Raton: CRC Press, 1980.
13. *Berdy J.* CRC Handbook of Antibiotic Compounds. Florida 2. Boca Raton: CRC Press, 1980.
14. *Umezawa H.* // Jpn. J. Antibiot. Suppl. 1977. V. 30. P. 138–163.
15. *Atta H.M.* // Am.-Eurasian J. Sci. Res. 2010. V. 5. № 1. P. 39–49.
16. *Sahin N., Ugar A.* // Turk. J. Biol. 2003. V. 27. P. 73–78.
17. *Saitou N., Nei M.* // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 4. № 4. P. 406–25.
18. *Ueno R., Uno K., Aoki T.* // J. Chromatogr. 1994. V. 573. P. 333–335.
19. *Tokol J., Mastisova E.* // J. Chromatogr. A. 1994. V. 669. P. 75–80.
20. *Thomas M.H.* // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989. V. 72. № 4. P. 564–567.
21. *Sharma Y.R., Chand S.* Elementary Organic Spectroscopy: Principles and Chemical Applications. New Delhi: S. Chand and Co. Ltd. 2010.
22. *Silverstein R.M., Webster F.X.* Spectrometric Identification of Organic Compounds, Canada: John Wiley, 1998. P. 132–144.
23. *Collins L., Franzblau S.G.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1997. V. 41. № 5. P. 1004–1009.

Purification and Chemical Characterization of Antimicrobial Compounds from a New Soil Isolate *Streptomyces rimosus* MTCC 10792¹

N. Singh^a, V. Rai^a and C. K. M. Tripathi^b

^a Biochemistry and Microbiology Laboratory, School of Studies in Life Sciences
Pt. Ravishankar Shukla University, Raipur, 492010, India

^b Fermentation Technology Division, Central Drug Research Institute, CSIR, Chattar Manzil Palace, PO Box 173,
Lucknow, 226 001, India

e-mail: nevi0007@gmail.com

Received October 29, 2012

Abstract—A new isolate of *Streptomyces* sp. from soil of state Chhattisgarh (India) having broad spectrum antibacterial and antifungal activity was obtained. The active strain was identified as *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* with accession number MTCC 10792 based on physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence homology studies. Antimicrobial compound produced by *S. rimosus* was tested against the drug resistance pathogens by the Bauer and Kirby method. The crude active metabolite was extracted using solvent *n*-butanol and purified by silica column chromatography and HPLC method. The physico-chemical characteristics of the one purified compound viz. color, melting point, solubility, elemental analysis, ESIMS, IR, UV, ¹HNMR, ¹³CNMR and chemical reactions have been investigated. Purified antimicrobial compound produced by *S. rimosus* MTCC 10792 at concentration 25 µg/ml showed antitubercular activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra as well as broad activity against all tested bacterial and fungal pathogens.

УДК 547.913

ДЕЙСТВИЕ МАСЕЛ КОРИЦЫ И ЛАВАНДЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *FtsZ Staphylococcus aureus* ATCC 29213

© 2013 г. А. Герман*, Ж. Боченек**, А. П. Герман**

*Академия косметики и здравоохранения, 00-252 Варшава, Польша

**Институт физиологии животных и питания им. Келановского, Польская академия наук, лаборатория молекулярной биологии, 05-110 Яблоня, Польша

e-mail: anna.herman @ wszkipz.pl

Поступила в редакцию 25.10.2012 г.

Показано влияние масел лаванды и корицы на экспрессию гена *FtsZ* у штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Эти масла частично ингибировали транскрипцию *FtsZ*, что приводило к нарушению клеточного деления на уровне формирования септы. Механизм действия масел аналогичен механизму действия лекарственных препаратов, применяемых в терапии стафилококковых инфекций. Представленные результаты могут быть основой дальнейших более детальных исследований влияния эфирных масел корицы и лаванды на синтез белков *FtsZ* на посттранскрипционном уровне и других стадиях клеточного деления как у *S. aureus*, так и других патогенных бактерий.

DOI: 10.7868/S0555109913050048

Рост устойчивости бактерий к действию антибиотиков делает чрезвычайно актуальным поиск других веществ для антибактериальной терапии. Противомикробные средства синтетического или природного происхождения, ингибирующие рост бактерий, – альтернативный метод антимикробной химиотерапии. Антимикробная активность эфирных масел и их компонентов, в том числе их способность подавлять рост бактерий, хорошо изучена [1]. Биологические свойства эфирных масел и их антимикробную активность приписывали различным соединениям, входящим в его состав, таким как флавоноиды, терпеноиды и фенилпропаноиды [2]. Действие этих веществ основано на денатурации белков мембран, вызывающей разрушение внешних мембранных структур. Как следствие инактивируются ферменты, участвующие в синтезе структурных компонентов бактериальных клеток, происходит дестабилизация систем переноса протонов и электронов, а также нарушение активного транспорта. В дальнейшем происходит коагуляция содержимого клетки, нарушение барьера, ингибирование синтеза ДНК, РНК, белков и полисахаридов бактериальной клетки, что приводит к нарушению обмена веществ и деления [3].

Белок *FtsZ*, формирующий Z-кольцо, является консервативным бактериальным цитоскелетным белком, который играет важную роль в инициации процесса деления клеток и поэтому может служить хорошей мишенью при разработке антибактериальных средств [4]. *FtsZ* – бактериальная ГТФ-зависимая гуанозинтрифостфатаза. При делении *FtsZ* включает и другие белки кле-

точного деления в процесс синтеза перегородки, необходимой для отделения дочерней клетки [5]. Потеря или ингибирование функции *FtsZ* приводит к нарушению синтеза клеточной стенки, к формированию вытянутых цепей клеток, делает их механически нестабильными и приводит к их разрушению [4]. Антимикробные агенты, имеющие сродство к *FtsZ*, подавляют экспрессию этого белка и перспективны для разработки новых лекарственных средств.

Цель работы – выяснение действия масел лаванды и корицы, двух антимикробных агентов естественного происхождения, на экспрессию гена *FtsZ* у штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

МЕТОДИКА

Подбор концентрации масел лаванды и корицы и времени инкубации для исследования экспрессии генов. Штамм *S. aureus* ATCC 29213 активировали с помощью двукратного пересева и выращивания на триптиказно-соевом агаре (ТСА, “BioMerieux”, Франция) при 37°C 48 ч. Несколько колоний ночной культуры суспендировали в LB среде (“Sigma”, США) с таким расчетом, чтобы плотность полученной суспензии клеток достигала 4.0 по шкале прозрачности МакФарланда ($\sim 1.2 \times 10^9$ КОЕ/мл).

Пробирки с культурой делили на 7 экспериментальных групп: контрольная (необработанная культура), культуры с 2.5, 0.25 и 0.025%-ными (об./об.) концентрациями масел *Cinnamomum zeylanicum* или *Lavandula officinalis*, полученными из (“Avicenna-Oil”, Польша), в каждой по 3 повторности. Для анализа количества жизнеспособных

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

№ в GenBank	Ген	Размер ампликона, п.о.	Прямой/обратный	Последовательность 5' → 3'
EU914258.1	<i>FtsZ</i> , температурозависимый мутант <i>Z</i> (<i>FtsZ</i>)	120	прямой	AAAGCTGCAGAGGAATCTCG
			обратный	TTTAGCAACGACTGGTGCTG
D83357.1	16S rРНК 16S рибосомальная РНК	136	прямой	GGGTCATTGGAAACTGGAAA
			обратный	CGCACATCAGCGTCAGTTAC
NC_002952.2	<i>gyr A</i> , субъединица ДНК-гиразы	126	прямой	CGTGAAGCGGTTGTAAATGA
			обратный	TTCTTCAACACGGTCCATGA
NC_002952.2	<i>gyr B</i> , субъединица ДНК-гиразы	138	прямой	GGTGGCGACTTTGATCTAGC
			обратный	GGTGGCGACTTTGATCTAGC
EF680394	<i>tfu</i> , фактор элонгации трансляции	138	прямой	CTGTAATCGCTGGTTCAGCA
			обратный	CTGGCATCATGAATGGTTTG
JQ740586	<i>tip</i> , триозофосфат-изомераза	125	прямой	ACGAAGAGCGTGAAAGTGGT
			обратный	GATTGCCAGATTGGTTCAT

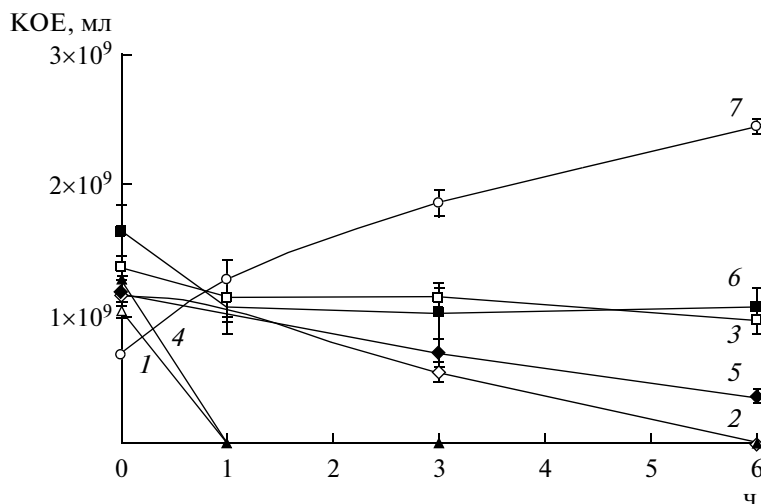
клеток отбирали пробы по 0.1 мл через 0, 1, 3 и 6 ч после начала инкубации, с момента добавления масла лаванды или корицы к исследуемой культуре. Разведенные аликвоты наносили на поверхность стерильных чашек с агаризованной средой LB и инкубировали 24 ч при 37°C. Кривые роста бактерий построены на основании подсчета среднего значения КОЕ/мл для трех повторностей и стандартного отклонения. Стандартное отклонение при расчете жизнеспособности бактерий не превышало 0.3 КОЕ.

Определение относительной экспрессии гена *FtsZ* в культуре *S. aureus*. Для исследования действия масел лаванды и корицы была выбрана концентрация 0.025% (об./об.) и длительность инкубации 3 ч, поскольку в таких условиях рост *S. aureus* эффективно подавлялся без быстрой гибели клеток. Через 3 ч отбирали аликвоты по 1.0 мл культуры, содержащей эфирные масла/ физиологический раствор (в 5 повторностях) и центрифугировали при 6000 g 3 мин. Бактериальный осадок ресуспендировали в 100 мкл ТЕ-буфера (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH 8.0; “Sigma”, США), содержащего 2 мг/мл лизоцима (“Sigma”, США), после чего полученную смесь инкубировали при 37°C 5 мин. Затем выделяли РНК в соответствии со стандартным протоколом производителя NucleoSpin® RNA II (“Macherey-Nagel GmbH and Co”, Германия) с применением ферментативного расщепления геномной ДНК. Количество и чистоту полученной РНК оценивали количественно по оптической плотности при 260 и 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Целостность РНК проверяли методом гель-электрофореза в 1%-ной агарозе.

Синтез кДНК проводили с использованием компонентов DyNAmo™ SYBR® Green 2-Step qRT-PCR kit (“Finnzymes”, Финляндия) в соответствии с инструкцией изготовителя.

ПЦР проводили в режиме реального времени (РТ-ПЦР) с использованием компонентов того же комплекта олигонуклеотидных праймеров хроматографической чистоты, синтезированных в “Genomed” (Польша). Праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения Primer 3 Whitehead Institute for Biomedical Research (США). В тех случаях, когда исследуемые последовательности генов не были найдены в базе данных GenBank, праймеры создавали для консервативных участков гена, которые были сконструированы на основании множественного выравнивания последовательностей для других штаммов *S. aureus* с использованием программного обеспечения BLAST. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Реакции проводили на Rotor-Gene 6000 (“Qiagen”, Германия) с использованием следующего протокола: 95°C в течение 15 мин для инициации горячего старта ДНК-полимеразы, затем 30 циклов при 94°C 5 с для денатурации, затем 56°C 20 с для отжига и 72°C 15 с для наращивания. После проведения циклов для подтверждения специфичности амплификации проводили анализ кривых плавления с непрерывным измерением флуоресценции. Все данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Rotor Gene 6000 v.1.7 (“Qiagen”, Германия). Относительную экспрессию генов определяли с помощью программного обеспечения 2008 Corbett Research, Australia and M. Pfaffl, Technical University



Ингибирование роста *S. aureus* ATCC 29213 в присутствии различных концентраций масел *L. officinalis* (1–3) и *C. zeylanicum* (4–6). 2.5 (1), 0.25 (2), 0.025% (3) – концентрации масел лаванды; 2.5 (4), 0.25 (5), 0.025% (6) – концентрации масла корицы. Контроль – необработанная культура (7). Приведены средние значения, полученные в 3 экспериментах, и стандартное отклонение.

Munich, Germany (Австралия, Германия), используя алгоритм коррекции эффективности ПЦР, разработанный Пфафл с соавт. [6]. Чтобы компенсировать колебания в концентрациях кДНК и эффективности ПЦР в разных пробирках проводили амплификацию 16S рРНК или эндогенных генов контроля, т.е. *gyrA*, *tuf*, *tpi*, в каждом образце, результаты которой использовались для нормализации. Результаты были представлены в виде отношения экспрессии исследуемого гена к экспрессии гена сравнения. Статистическая достоверность различий между результатами оценки экспрессии генов в контроле и в пробах, инкубированных с эфирными маслами, определяли с использованием U-теста Манн-Витни (STATISTICA™, StatSoft, Польша). Результаты с $P < 0.1$ считали значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор концентрации масел лаванды, корицы и времени инкубации для исследования экспрессии генов. Масла корицы и лаванды в концентрации 2.5, 0.25 и 0.025% (об./об.) ингибировали рост *S. aureus* ATCC 29213 в зависимости от времени инкубации (рисунок). Было показано, что присутствие масла в концентрации 2.5% полностью убивало клетки микроорганизмов после 1 ч инкубации. При использовании масел корицы и лаванды в интервале концентраций от 0.25 до 0.025% наблюдали ингибирование роста микроорганизмов, начиная с 1 ч инкубации. Присутствие 0.025%-ного масла оказывало скорее бактериостатический, чем бактерицидный эффект. Благодаря мягкому, но эффективному воздействию эфирных масел на *S. aureus* ATCC 29213 в этой концентрации, эта доза была

выбрана как оптимальная для исследования экспрессии гена *FtsZ*.

Антимикробное действие масел лаванды и корицы и их основных компонентов хорошо описано и используется в фитотерапии [7, 8]. Иноу с соавт. [9] подтвердили, что основной компонент масла корицы – коричный альдегид (63.1%) – обладает более высокой антимикробной активностью по отношению к *S. aureus* FDA 209P, чем масло лаванды, содержащее линалоол (30.1%). Было показано также, что антимикробная активность масел корицы и лаванды идентична антимикробной активности их основных составляющих – коричневого альдегида и линалоола, для которых минимальные ингибирующие дозы были определены как 6.25 и 50 мг/л соответственно. Масло корицы в концентрации 0.125% обладало высокой антибактериальной активностью по отношению *S. aureus* ATCC 29213. Через 60 мин после начала инкубации в присутствии масла корицы в концентрации 0.125% (об./об.) происходило уменьшение жизнеспособности клеток на 42.86%, что согласовывалось с нашими результатами, полученными ранее [10].

Определение относительной экспрессии гена *FtsZ* в культуре *S. aureus*. Было обнаружено, что масла и корицы и лаванды в концентрации 0.025% снижали экспрессию гена *FtsZ* в культуре *S. aureus* ATCC 29213 по отношению к 16S рРНК и всем исследованным эндогенным генам: 16S рРНК, *gyrA*, *gyrB*, *tuf* и *tpi* (табл. 2). Было показано впервые, что масла лаванды и корицы способны подавлять активность *FtsZ*.

Механизм воздействия масел корицы и лаванды на *S. aureus* в настоящее время не ясен. В рабо-

те [10] было показано, что механизм действия масла корицы на *S. aureus* ATCC 29213 основан на разрушении мембранной оболочки, однако оказалось, что мембрана не является первой мишенью антибактериального действия. Первоначально клетки *S. aureus*, обработанные маслом корицы, оставались жизнеспособными, но некультивируемыми, что сопровождалось значительным снижением метаболической активности, сокращением транспорта питательных веществ, интенсивности дыхания и способности к репликации. Некультивируемое состояние является одной из стратегий выживания бактерий в ответ на стресс или одной из физиологических стадий на этапе гибели клеток. В дальнейшем масло корицы приводило к разрушению мембран и гибели *S. aureus*. Однако, это не единственный механизм воздействия эфирных масел на рост *S. aureus*. Авторами работы [11] было показано, что коричная кислота ингибирует ферменты, участвующие в поглощении глюкозы и синтезе АТФ у *S. aureus*. Домадия с соавт. [12] обнаружили, что коричный альдегид ингибирует ГТФ-зависимую полимеризацию FtsZ, связывается с этим белком, что препятствует формированию Z-цикла, уменьшает частоту Z-колец на единицу длины клетки *E. coli*. Кроме того, Квон с соавт. [13] показали, что коричный альдегид эффективно инактивировал клетки *Bacillus cereus*, а также и ингибировал деление клеток без существенного снижения их плотности, что происходит, когда белок FtsZ инактивирован. Исследовано влияние различных фенольных соединений травянистых растений, таких как эвгенол, транс-коричная кислота, 4-формил-коричной кислоты, нарингенина и кофеиновой кислоты на *E. coli* [5]. Самым эффективным ингибитором полимеризации FtsZ оказалась транс-коричная кислота, тогда как 4-формил коричная кислота была наименее эффективным ингибитором из всех исследованных соединений.

Другие примеры природных соединений, подавляющих функцию FtsZ, могут служить куркумин, виридитоксин, дихаментин, тотарол, сангвинарин, берберин, хризофаентины, а из синтетических ингибиторов, такие как 3-[(6-хлор [1,3] тиазоло [5,4-b] пиридин-2-ил) метокси]-2,6-дифторобензамид (PC190723), 5-1,3-2- PC190723 (PC190723 аналог 8j), этил-(8-((4-(диэтиламино)-1-метилбутил)амино)-2,3-дифенилпиридо(2,3-b) пиазин-6-ил) карбамат (SRI-3072), этил (6-амино-2,3-дигидро-4-фенил-1H-пиридо (4,3-b) (1,4) диазепин-8-ил)карбамат (SRI-7614) и 3-{5-[4-оксо-2-тиоксо-3-(3-трифторметилфенил)-тиазолидин-5-илиденметил]фуран-2-ил} бензойная кислота (OTBA) [4, 14]. Эти соединения оказывали действие путем ингибирования ГТФазной активности FtsZ. Они воздействовали также и на полимеризацию FtsZ, нарушая образование Z-кольца, что в свою очередь приводило к ингибированию

Таблица 2. Эффект эфирных масел *L. officinalis* и *C. zeylanicum* на экспрессию гена *FtsZ* в культуре *S. aureus* ATCC 29213

Гены сравнения или рНК	Экспрессия гена <i>FtsZ</i> , % от контроля	
	масло лаванды	масло корицы
<i>gyrA</i>	69 ± 3*	73 ± 2*
<i>gyrB</i>	65 ± 12*	70 ± 13*
<i>tuf</i>	51 ± 13*	67 ± 16*
<i>tpi</i>	54 ± 10*	52 ± 8*
16S рНК	44 ± 4*	62 ± 12*

* $P < 0.01$ – значения, которые статистически достоверно отличаются от контроля, оцениваемого в рамках Ман-Уитни U теста.

клеточного деления [4, 14]. Парадиз-Бле с соавт. [15] показали, что аналоги ГТФ – по основной структуре, состоящие из остатков гуанина, связанных с Ала боковой цепью (ГАЛ) с различными N- и C-заместителями на концах, имитируют естественный субстрат ГТФ, что делает их перспективными ингибирами ГТФазной активности FtsZ. Гуанил – из структуры ГАЛ связывается с активным центром FtsZ и блокирует доступ ГТФ, таким образом выступая в роли ингибитора FtsZ. Было показано, что среди 9 синтезированных аналогов ГТФ, 5 ингибировали рост *S. aureus* ATCC 25923, при этом 2 из них были наиболее перспективными антибактериальными агентами. Таким образом, белок FtsZ является хорошим объектом для разработки и поиска потенциальных антибиотиков и природных соединений различной химической структуры (алкалоиды, фенолы и полифенолы) [14].

Результаты исследования показали, что одним из механизмов, с помощью которого масла лаванды и корицы могут ингибировать рост *S. aureus* ATCC 29213, является подавление экспрессии гена *FtsZ* и как следствие ингибирование деления бактерий. Представленные результаты могут служить основой для дальнейших детальных исследований, которые необходимы для выяснения действия эфирных масел на синтез FtsZ на посттранскрипционном уровне и на других стадиях клеточного деления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics / Ed. D. Chattopadhyay, Kerala (India): Research Signpost, 2010.
2. Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L. // Front. Microbiol. 2012. V. 3. P. 1–24.
3. Silva N.C.C., Fernandes Júnior A. // J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis. 2010. V. 16. № 3. P. 402–413.

4. Foss M.H., Eun Y.J., Weibel D.B. // *Biochemistry*. 2011. V. 50. № 36. P. 7719–7734.
5. Rastogi N., Domadia P., Shetty S., Dasgubta D. // *Indian J. Exp. Biol.* 2008. V. 46. № 11. P. 783–787.
6. Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. P. E36.
7. Cavanagh H.M.A., Wilkinson J.M. // *Phytother. Res.* 2002. V. 16. № 4. P. 301–308.
8. Sandigawad B.M., Patil C.G. // *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 2010. V. 1. № 2. P. 434–439.
9. Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2001. V. 47. № 5. P. 565–573.
10. Bouhdid S., Abrini J., Amensour M., Zhiri A., Espuny M.J., Manresa A. // *J. Appl. Microbiol.* 2010. V. 109. № 4. P. 1139–1149.
11. Dorantes L., Colmenero R., Hernandez H., Mota L., Jaramillo M.E., Fernandez E., Solano C. // *Intern. J. Food Microbiol.* 2000. V. 57. № 1–2. P. 125–128.
12. Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. // *Biochem. Pharmacol.* 2007. V. 74. № 6. P. 831–840.
13. Kwon J.A., Yu C.B., Park H.D. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2003. V. 37. № 1. P. 61–65.
14. Schaffner-Barbero C., Martín-Fontecha M., Chacon P., Andreu J.M. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 2. P. 269–277.
15. Paradis-Bleau C., Beaumont M., Sanschagrin F., Voyer N., Levesque R.C. // *Bioorg. Med. Chem.* 2007. V. 15. № 3. P. 1330–1340.

Effect of Cinnamon and Lavender Oils on *FtsZ* Gene Expression in the *Staphylococcus aureus* ATCC 29213¹

A. Herman^a, J. Bochenek^b, and A. P. Herman^b

^a Academy of Cosmetics and Health Care Podwale 13 street, 00-252 Warsaw, Poland

^b The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Laboratory of Molecular Biology, Instytutcka 3 street, 05-110 Jablonna near Warsaw, Poland

e-mail: anna.herman@wszkipz.pl

Received October 25, 2012

Abstract—This study was designed to determine the effect of lavender and cinnamon oils on *FtsZ* gene expression in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. The cinnamon and lavender oils at least partially results from the inhibition of *FtsZ* transcription and disruption of cell division process at the level of the septum synthesis, what is similar to mechanisms of drug action used in anti-staphylococcal therapies. The presented results could be an important background for the further detailed research, which is needed to clarify the effect of essential oils on *FtsZ* synthesis at the posttranscriptional level and other stages of cell division process of *S. aureus* and other pathogenic bacteria.

УДК 576.809.5

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ АКТИВНОГО ИЛА ПИЛОТНОЙ УСТАНОВКИ АНАЭРОБНОГО ОКИСЛЕНИЯ АММОНИЯ

© 2013 г. М. Н. Козлов, М. В. Кевбрина, А. Г. Дорофеев, Е. А. Казакова, В. А. Грачёв, Д. Ю. Поляков, В. Г. Асеева, Ю. А. Николаев

ОАО “Мосводоканал”, Москва

Поступила в редакцию 12.02.2013 г.

Исследован липидный состав микробного сообщества активного ила пилотного реактора, осуществляющего анаэробное окисление аммония (процесс анаммокс) на Курьяновских очистных сооружениях (г. Москва). Основная часть жирнокислотного состава (95%) представлена традиционными жирными кислотами C_{14} – C_{18} как нормального, так и изостроения. В биомассе активного ила установлено наличие липидов, содержащих т.н. ладдерановые вещества (“лестничные” спирты и жирные кислоты), характерные для анаммокс-бактерий: C_{20} -[3]-ладдерановый и C_{20} -[5]-ладдерановый спирты, C_{18} - и C_{20} -[3]-ладдерановая и C_{18} - и C_{20} -[5]-ладдерановые кислоты. Кроме того, в нативном (негидролизованном) экстракте обнаружены простые и сложные эфиры этих веществ с остатками фосфохолина, фосфоэтанолamina, фосфоглицерина. Для некоторых соединений получены и публикуются впервые спектры электронного удара и tandemной масс-спектрометрии.

DOI: 10.7868/S0555109913050061

Бактерии – основные участники самой масштабной биотехнологии – очистки сточных вод, которая в ее современном виде, с использованием активного ила, создана 100 лет назад [1]. Развитие этой биотехнологии связано с успехами микробиологии и биохимии. Одной из недавно открытых и только внедряемых в настоящее время биотехнологий удаления азота из воды является процесс анаэробного окисления аммония – анаммокс (anaerobic ammonia oxidation), открытый в 90-х годах прошлого века [2]. В этом процессе аммоний окисляется нитритом микроорганизмами, входящими в группу Planctomycetes и обладающих рядом уникальных физиологических и морфологических признаков. Процесс анаммокс обнаружен во многих экотопах – в очистных сооружениях, в заболоченных почвах, в морях и океанах, в том числе – в арктических [2–4]. Технология на основе автотрофного удаления азота представляет собой комбинацию двух процессов: частичной нитрификации, в ходе которой половина аммония окисляется до нитрита, и анаэробного окисления аммония нитритом (собственно процесс Анаммокс). Технология анаммокс реализована на многих очистных сооружениях Европы, Азии и США. ОАО Мосводоканал в настоящее время проводит первые в России полупромышленные испытания этой технологии. Испытания прошли стадии получения накопительной культуры анаммокс-бактерий и лабораторного реактора [5.] В настоящее время функционирует пилотная установка производительностью 900 л/сут, очищаю-

щая фильтрат, получаемый от сгущения сброженного осадка [6].

Важной характеристикой любых микроорганизмов является их липидный состав. У анаммокс-бактерий обнаружены уникальные липиды – т.н. ладдерановые (лестничные) липиды (от англ. *ladder* – лестница), в составе которых имеются сконденсированные циклобутановые структуры [7].

Цель работы – исследование липидного состава активного ила биореактора, осуществляющего анаэробное окисление аммония.

МЕТОДИКА

Активный ил пилотного реактора, осуществляющего анаэробное окисление аммония в фильтрате сброженного осадка сточных вод Курьяновских очистных сооружений г. Москвы [6], обладающий высокой анаммокс-активностью, собирали отстаиванием в течение 1 ч, центрифугировали (1000 g, 5 мин) для отделения избыточного количества воды и использовали для исследования липидов.

Подготовка образцов для анализа. Липиды экстрагировали двумя способами. Способ 1. К осадку после центрифугирования (5 мл) добавляли 5 мл смеси дихлорметана и метанола в соотношении 1 : 1 [8], встряхивали 2 мин в закрытой пробирке и переносили в стеклянный центрифужный стаканчик. Нижний слой после центрифугирования (1000 g, 5 мин) собирали в чистую емкость. Процедуру экстракции той же порции

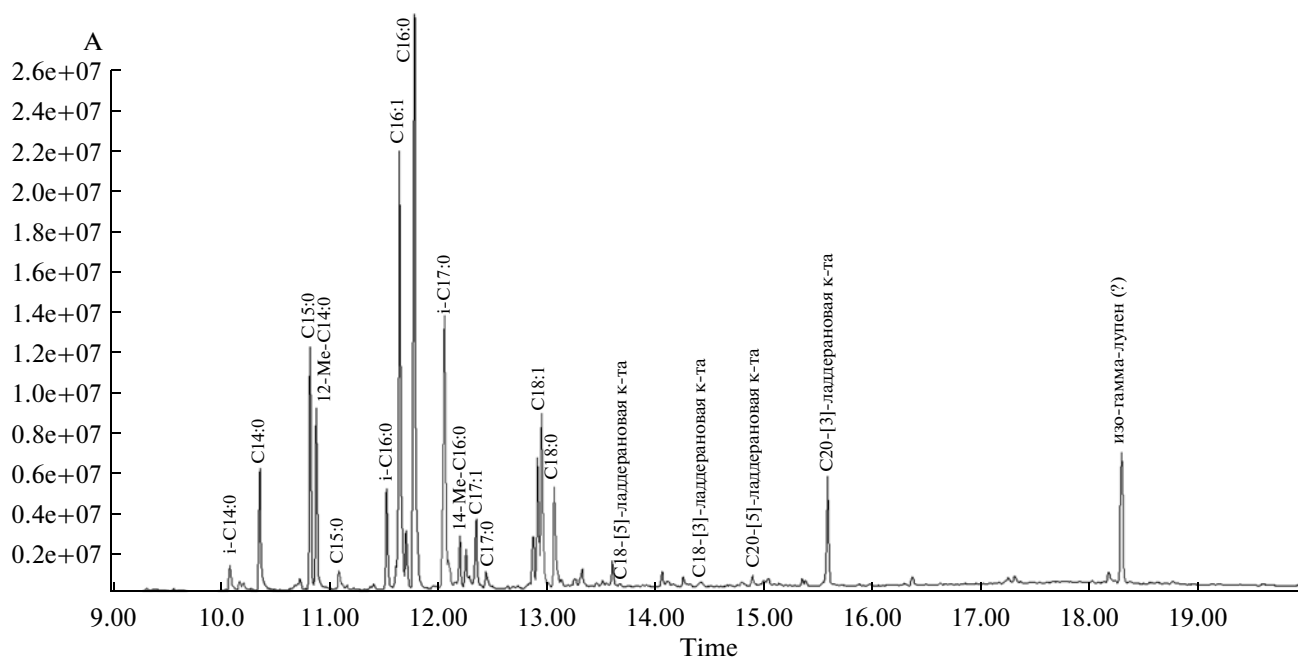


Рис. 1. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот активного ила.

осадка повторяли и объединяли две порции нижних слоев жидкости, после чего их упаривали досуха под азотом при комнатной температуре. Способ 2. К осадку после центрифугирования (5 мл) добавляли 5 мл метанола, встряхивали 2 мин в закрытой пробирке и центрифугировали (1000 g, 5 мин). Супернатант отбрасывали, осадок экстрагировали дважды 5 мл метил-*трет*-бутилового эфира (МТБЭ) при обработке ультразвуком в ультразвуковой бане Bransonic 1510 (“Branson” США) в течение 5 мин, после чего упаривали экстракт досуха под азотом при комнатной температуре.

Получение метиловых эфиров жирных кислот. К упаренному экстракту (полученному 1 или 2 способом), содержащему 1 мг вещества, добавляли 400 мкл раствора трифторида бора в метаноле (“Aldrich”, США), нагревали в закрытой емкости при 80°C в течение 1 ч. К охлажденной реакционной массе добавляли последовательно по 400 мкл воды и гексана, встряхивали в закрытой пробирке 2 мин, отстаивали в течение 5 мин, собирали верхнюю гексановую вытяжку. Процедуру повторяли. Две гексановые вытяжки объединяли.

Получение силиловых эфиров. К упаренному экстракту (полученному 1 или 2 способом), содержащему 1 мг вещества, добавляли 150 мкл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (БТМСФА) (“Supelco”, США), нагревали в закрытой емкости при 80°C в течение 30 мин. К охлажденной реакци-

онной массе добавляли 400 мкл МТБЭ, раствор использовали для анализа.

Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС). Исследование проводили на хромато-масс-спектрометре модели 6890/5975N фирмы “Agilent Technologies” (США). Хроматографическая колонка: DB-5ms фирмы “Agilent Technologies” (США) диаметром 0.25 мм, с толщиной слоя неподвижной фазы 0.25 мкм и длиной 30 м. Температура инжектора 280°C. Режим инжектора — “без деления потока”. Газ-носитель — гелий, скорость потока 40 см/с. Температурный режим программировали: изотерма 70°C в течение 1 мин, нагрев со скоростью 15°C/мин до 320°C и выдержка при данной температуре 15 мин. Температура квадруполя 150°C, ионного источника 230°C, интерфейса 280°C. Объем вводимой пробы 1 мкл. Масс-спектры разделенных веществ регистрировали в режиме электронного удара в диапазоне массовых чисел 34–900 а.е.м.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Исследование проводили на жидкостном хромато-масс-спектрометре модели Accella/LTQ Velos фирмы “Thermo Fisher Scientific” (США). Хроматографическая колонка: Hypersil Gold C18 50 × 2 мм с размером частиц сорбента 3 мкм фирмы “Thermo Fisher Scientific” (США). Разделение проводили в градиентном режиме повышения концентрации метанола (с добавлением 0.01% муравьиной кислоты) в водном растворе

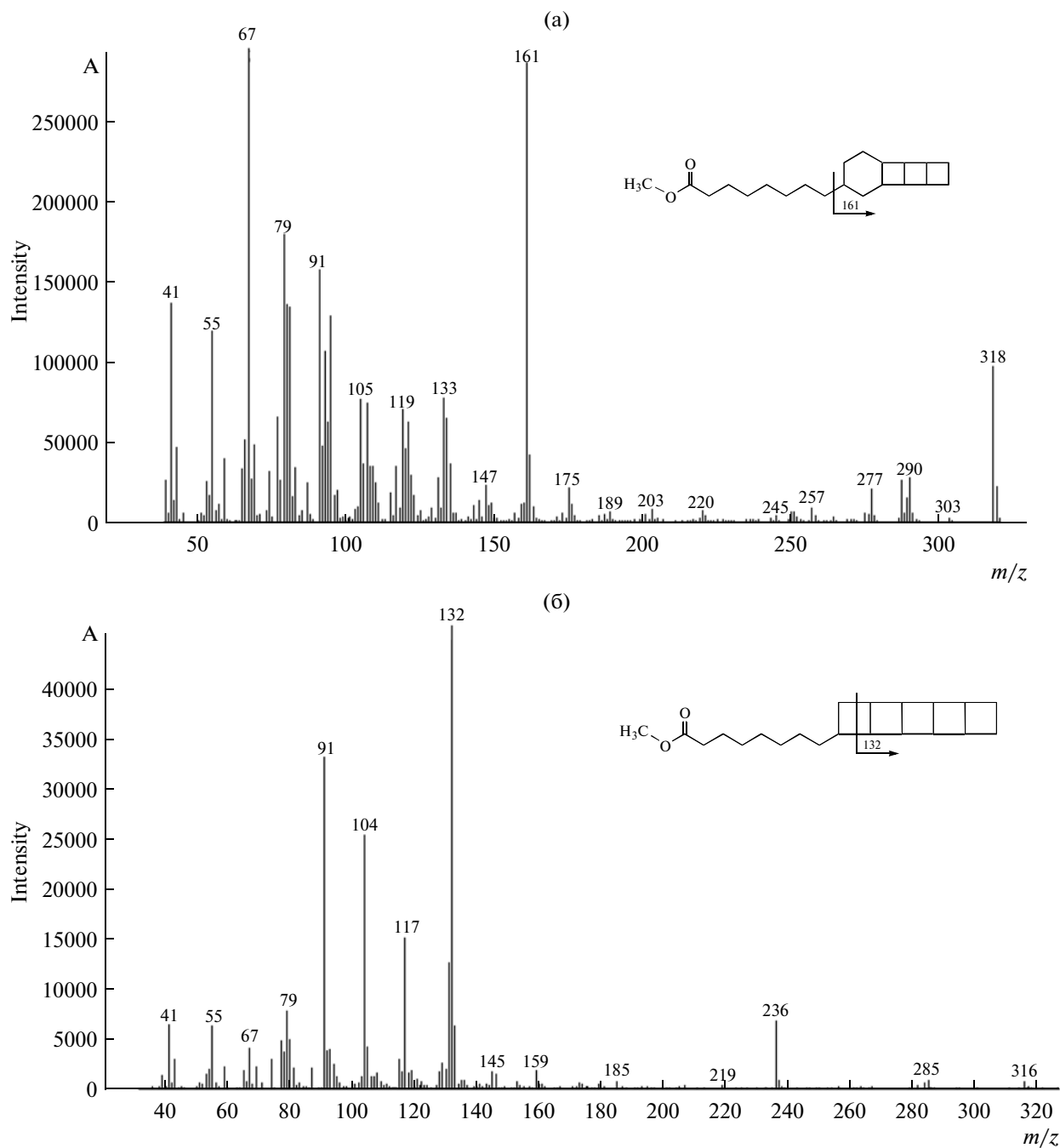


Рис. 2. Масс-спектры веществ со временами удерживания ($t_{уд}$) 15.6 мин (соответствует метилому эфиру C_{20} -[3]-ладдерановой кислоты [9]) (а) и с $t_{уд} = 14.9$ мин (соответствует метилому эфиру C_{20} -[5]-ладдерановой кислоты [9]) (б). Формулы представлены на врезке к рисункам.

формата аммония (0.005 М) и муравьиной кислоты 0.05% с 40 до 100% за 10 мин и выдержки 100%-ной концентрации метанола до 20 мин. Скорость потока 0.25 мл/мин. Источник ионизации – нагреваемый электроспрей (Н-ESI). Расход обдувающего газа – 50 усл. ед., вспомогательного газа – 5 усл. ед. Потенциал распыления 5 кВ. Температура капилляра 275°C, нагревателя –

300°C. Режим масс-селективного детектирования – “Data Dependent Scan” в диапазоне массовых чисел от 150 до 1000 а.е.м. Нормализованная энергия соударений в режиме МС/МС (танDEMная масс-спектрометрия) равна 35%, окно изоляции ионов 2.0 а.е.м., коэффициент активации $Q = 0.25$, время активации 10 мс.

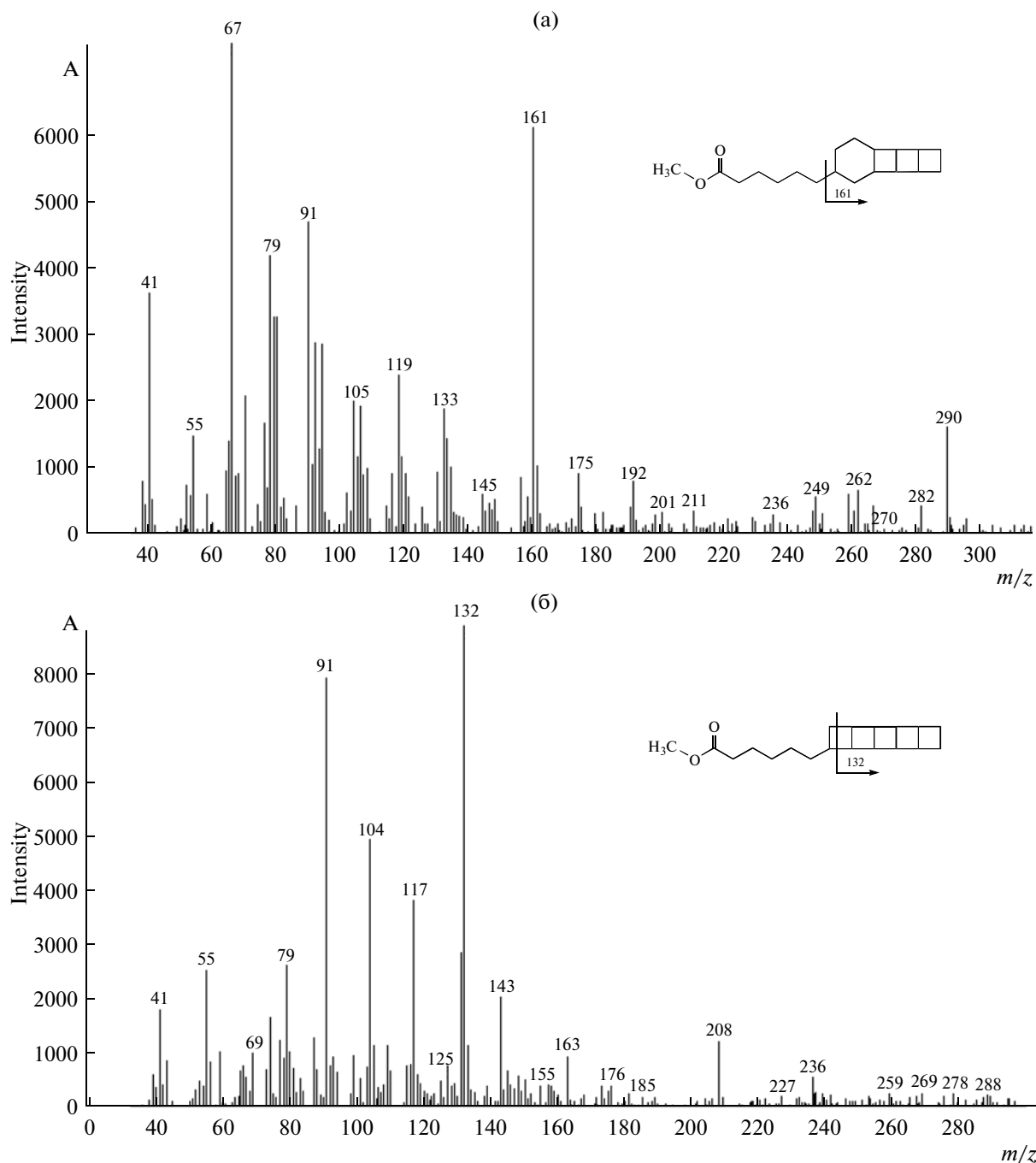


Рис. 3. Масс-спектры веществ с $t_{уд} = 14.4$ мин, метиловый эфир C_{18} -[3]-ладдерановой кислоты, (а) и с $t_{уд} = 13.68$ мин, метиловый эфир C_{18} -[5]-ладдерановой кислоты (б). Данные спектры получены впервые.

Идентификацию веществ проводили с использованием масс-спектральных библиотек NIST08, Wiley8n.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматограмма метилированного экстракта, записанная по полному ионному току и потому

отражающая соотношение традиционных и ладдерановых липидов, приведена на рис. 1. Основная часть жирнокислотного состава представлена традиционными жирными кислотами C_{14} – C_{18} как нормального, так и изостроения. На хроматограммах также присутствуют жирные кислоты рядов [3]-ладдерана и [5]-ладдерана (составляющие до 5% от общего количества липидов), спектры ко-

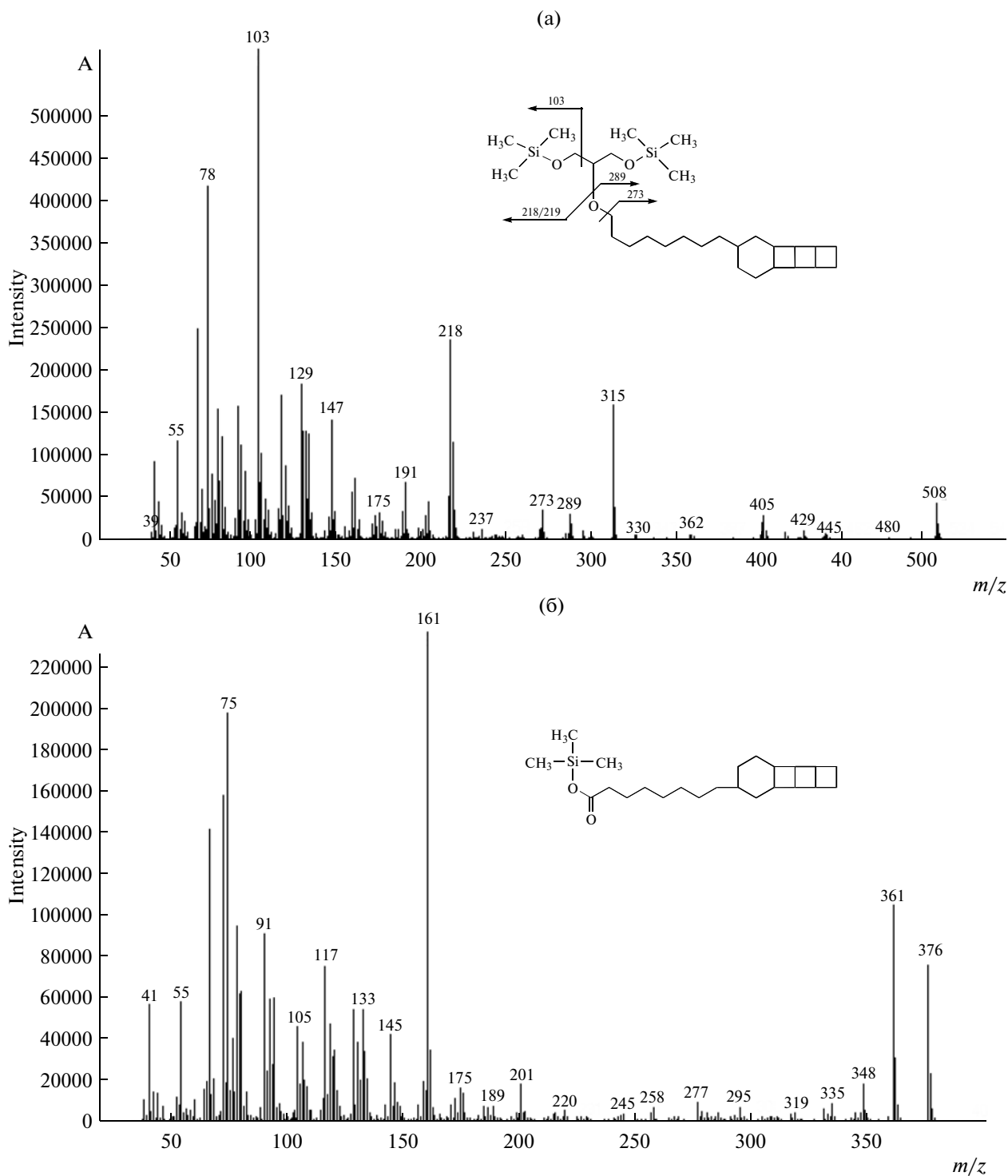


Рис. 4. Масс-спектры ТМС-производного веществ с $t_{уд} = 18.15$ мин, соответствует эфиру глицерина и C_{20} -[3]-ладдеранового спирта [9], (а) и ТМС-производного C_{20} -[3]-ладдерановой кислоты, (б).

торых приведены на рис. 2 и 3, при этом содержание [5]-ладдерановых кислот ниже, чем [3]-ладдерановых кислот.

При исследовании силильных производных обнаружены: эфир глицерина и C_{20} -[3]-ладдеранового спирта (рис. 4а) и свободная C_{20} -[3]-ладдерано-

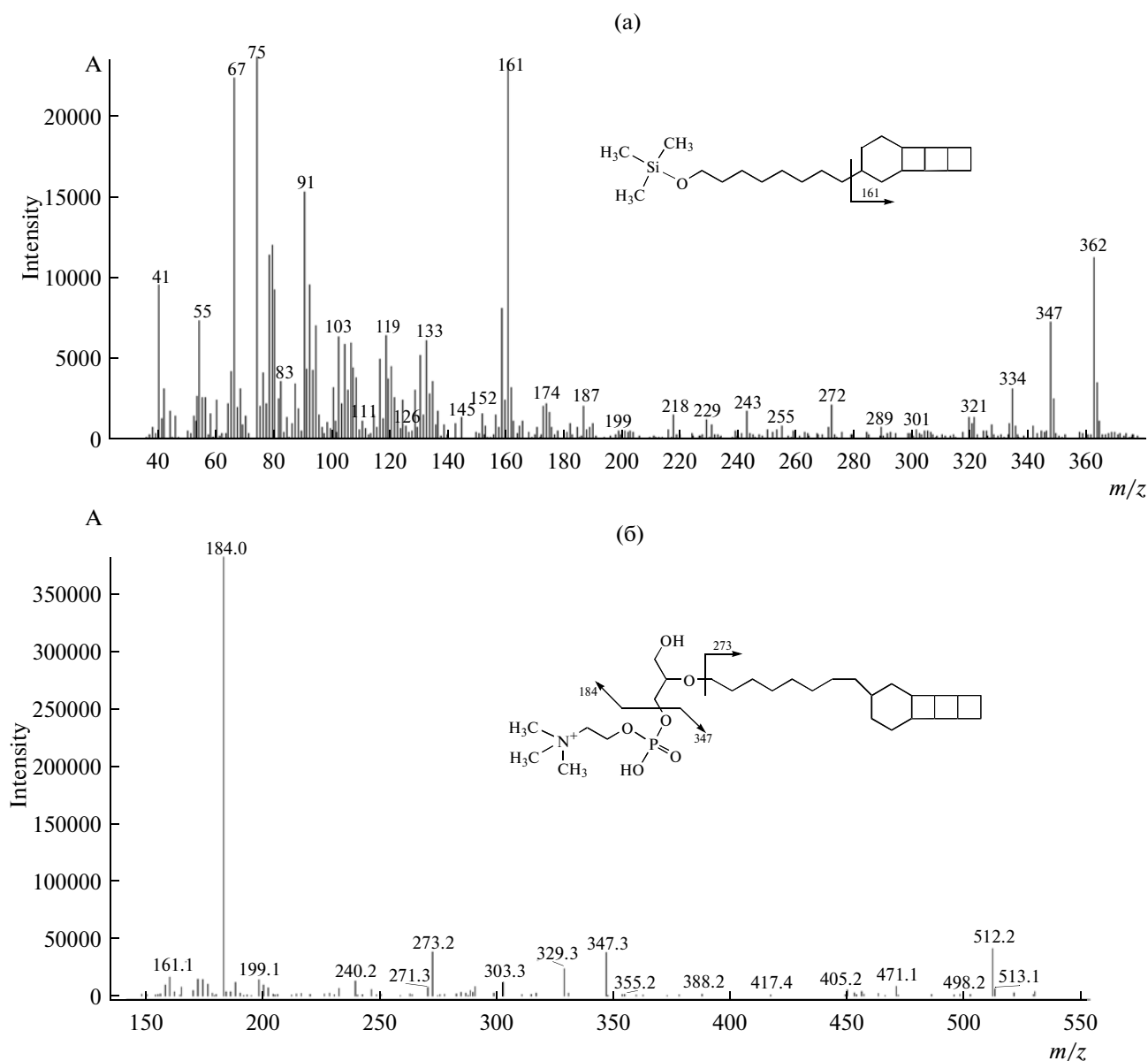


Рис. 5. Масс-спектр ТМС-производного C_{20} -[3]-ладдеранового спирта [9], (а) и спектр МС/МС глицерофосфолинового эфира C_{20} -[3]-ладдеранового спирта ($M^+ m/z = 530.3$), (б).

вая кислота (рис. 46). Последнее вещество также содержится в омыляемой фракции липидов.

Аналогичным образом были идентифицированы изомеры C_{20} -[5]-ладдерановой кислоты с молекулярной массой 374 Да и характеристичными ионами в спектре: 132, 104, 91 ($c t_{уд} = 15.5-15.6$ мин).

При анализе липидных экстрактов активного ила с использованием жидкостной хроматографии был применен метод тандемной масс-спектрометрии (МС/МС или МС², МС³ и т.д.), когда наиболее интенсивные ионы в спектре подвергаются фрагментации соударением (т.н. collision induced dissociation), при этом получившиеся дочер-

ние ионы также могут подвергаться дальнейшей фрагментации. Данный метод позволяет устанавливать наличие тех или иных относительно простых фрагментов с известной структурой в молекулах более сложной структуры.

Этим методом были обнаружены фосфолипиды на основе ладдерановых кислот и C_{20} -[3]-ладдеранового спирта (рис. 5а). На ВЭЖХ-МС хроматограммах обнаружены вещества с молекулярными ионами 382, 488, 519 и 530 а.е.м. При анализе спектров МС/МС монозамещенных глицерофосфо-[3]-ладдеранов сделан вывод, что ха-

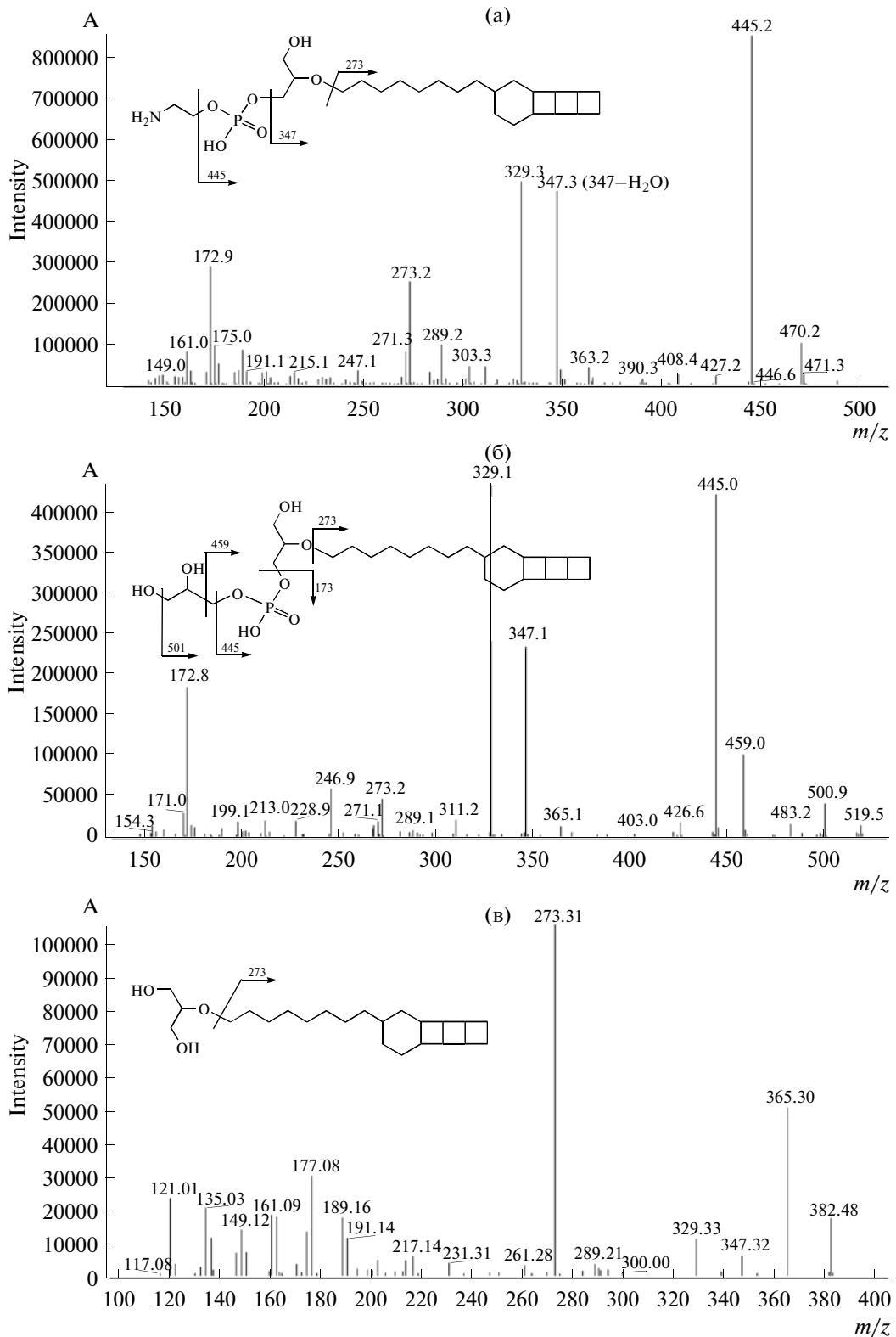


Рис. 6. Спектры МС/МС глицерофосфоэтаноламинового эфира C₂₀-[3]-ладдеранового спирта (а, [M + H]⁺ m/z = 488.3), глицерофосфоглицеринового эфира C₂₀-[3]-ладдеранового спирта (б, [M + H]⁺ m/z = 519, характерный отрыв глицерофосфата: 519–172 = 347), глицеринового эфира C₂₀-[3]-ладдеранового спирта (в, [M + NH₄]⁺ m/z = 382).

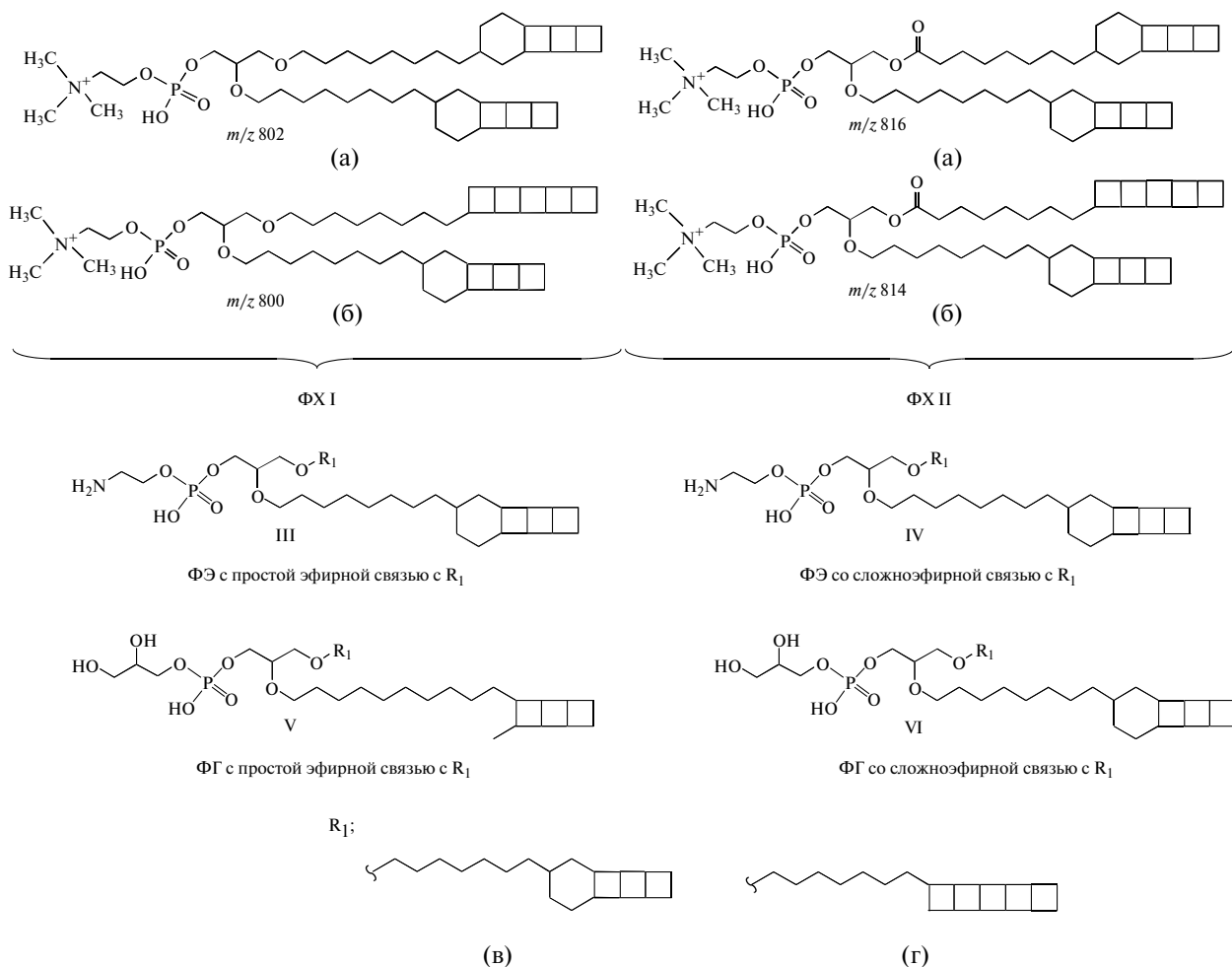


Рис. 7. Структурные формулы ладдерановых липидов фосфатидного ряда (см. таблицу) [12, 13].

рактистичными ионами для них являются ионы с m/z 273, 329 и 347 (рис. 5б).

Согласно литературным данным [10, 11], интенсивный ион m/z 184 для вещества, спектр которого представлен на рис. 5б, и МС/МС – расщепление этого иона указывает на присутствие в составе молекулы остатка фосфохолина. Потеря нейтральной частицы с массой 141 ($488 \rightarrow 347$) характерна для остатка фосфоэтаноламина. Таким образом были идентифицированы вещества с $t_{уд} = 14.73$ мин (глицерофосфохолиновый эфир C_{20} -[3]-ладдеранового спирта – рис. 5б) и с $t_{уд} = 14.15$ мин (глицеро-фосфоэтаноламинный эфир C_{20} -[3]-ладдеранового спирта – рис. 6а). При записи ВЭЖХ-МС-хроматограммы по ионам с m/z 519.3 и 382.3 идентифицированы глицерофосфоглицериновый эфир C_{20} -[3]-ладдеранового спирта (рис. 6б) и глицериновый эфир C_{20} -[3]-ладдеранового спирта (рис. 6в).

В литературе описаны ладдерановые липиды фосфатидного ряда [12, 13], которые были обнаружены методом ВЭЖХ-МС (рис. 7) в анаммокс-бактериях различных видов.

Нами были предприняты попытки поиска таких соединений с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС. Мы также учитывали возможность присутствия в экстрактах диглицеридов, не содержащих фосфатную группу, т.е. простых или сложных эфиров. На основе данных [12, 13] были определены целевые ионы с отношением m/z , характерные для фосфолипидных производных ладдеранов. В таблице представлены результаты поиска ладдерановых липидов в экстрактах активного ила биореактора анаммокс. Хроматограмма и спектр МС/МС некоторых фосфатидных производных (предположительно, фосфатидилхолин- C_{20} -[3]-ладдерана – IIа и фосфатидилхолин- C_{20} -[5]-ладдерана – IIб) приведены на рис. 8.

Таким образом, в биомассе активного ила пилотной установки анаэробного окисления аммо-

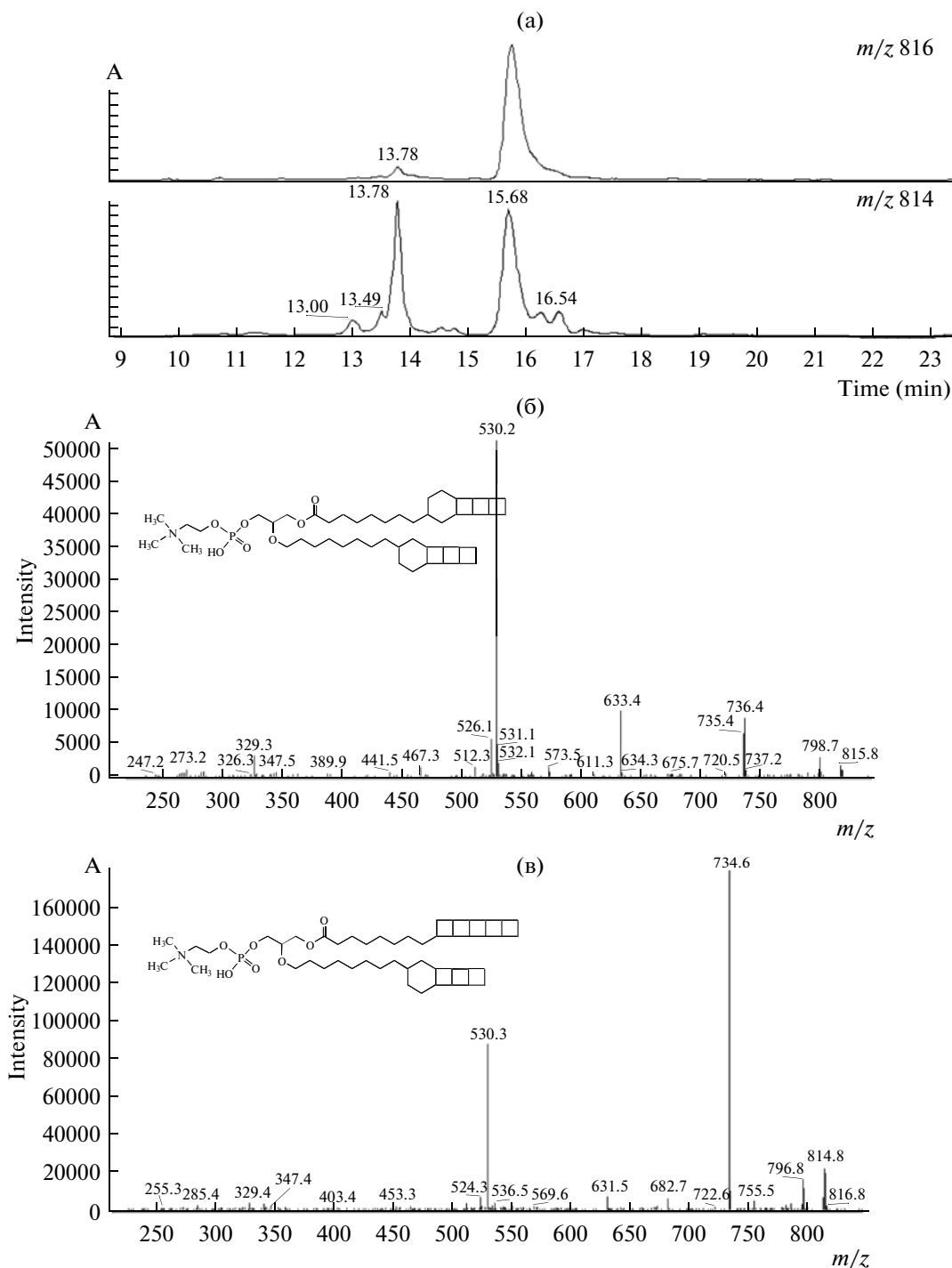


Рис. 8. Хроматограммы, записанные по характерным ионам m/z 816 и 814 (а), и спектры МС/МС веществ с молекулярными ионами m/z 816 (б) (соответствует веществу IIа) и 814 (в) (соответствует веществу IIб).

ния обнаружены липиды ладдеранового ряда, составляющие по массе до 5% всех липидов. Обнаружение ладдерановых липидов согласуется с наличием значительного количества биомассы анаммокс-бактерий. В работе впервые приведены масс-спектры электронного удара и тандемной масс-спектрометрии ряда ладдерановых ли-

пидов, их метильных и триметилсилильных производных.

Несмотря на то что содержание ладдерановых липидов было невелико, не более 5% от общего содержания липидов, с учетом того факта, что они входят в состав активного ила, который на

Химические формулы и молекулярные массы различных ладдерановых производных фосфатидной кислоты

Тип липида* (по рис. 7)	Брутто-формула радикала R ₁	Молекулярная масса, Да	Вещество обнаружено или не обнаружено**
ФХ (Ia)	C ₂₀ H ₃₃	802	+
ФХ (Iб)	C ₂₀ H ₃₁	800	+
ФХ (IIa)	C ₂₀ H ₃₁ O	816	+
ФХ (IIб)	C ₂₀ H ₂₉ O	814	+
ФЭ (IIIв)	C ₂₀ H ₃₃	759	–
ФЭ (IIIг)	C ₂₀ H ₃₁	757	–
ФЭ (IVв)	C ₂₀ H ₃₁ O	773	+
ФЭ (IVг)	C ₂₀ H ₂₉ O	771	+
ФГ (Vв)	C ₂₀ H ₃₃	790	+
ФГ (Vг)	C ₂₀ H ₃₁	788	–
ФГ (VIв)	C ₂₀ H ₃₁ O	804	–
ФГ (VIг)	C ₂₀ H ₂₉ O	802	–
ДГ (в)	C ₂₀ H ₃₃	636	+
ДГ (г)	C ₂₀ H ₃₁	634	+
ДГ (в)	C ₂₀ H ₃₁ O	650	–
ДГ (г)	C ₂₀ H ₂₉ O	648	–

* ФХ – фосфохолин, ФЭ – фосфоэтаноламин, ФГ – фосфоглицерин, ДГ – диглицерид.

** “+” – вещество обнаружено, “–” – вещество не обнаружено в настоящей работе.

очистных сооружениях образуется в больших количествах и является отходом, можно прогнозировать возможность получения таких липидов в значимых количествах как для целей их исследования, так и практического применения. Прогнозируется возможность применения ладдерановых липидов в оптоэлектронике [14].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ardern E., Lockett W.T.* // J. Soc. Chem. Ind. 1914. V. 33. № 10. P. 523–539.
2. *Kuenen J.G.* // Microbiology. 2008. V. 6. № 4. P. 320–326.
3. *Jetten M.S.M., Strous M., van de Pas-Schoonen K.T., Schalk J., van Dongen U.G.J.M., Van De Graaf A.A., Logemann S., Muyzer G., van Loosdrecht M.C.M., Kuenen J.G.* // FEMS Microbiology Reviews. 1999. № 2. V. 22. P. 421–437.
4. *Humbert S., Tarnawski S., Fromin N., Mallet M.-P., Aragno M., Zopfi J.* // ISME J. 2010. V. 4. № 2. P. 450–454.
5. *Николаев Ю.А., Данилович Д.А., Козлов М.Н., Мойжес О.В., Дедыш С.Н., Казакова Е.А., Грачёв В.А., Дорофеев А.Г., Асеева В.Г.* // Вода: химия и экология. 2009. № 12. С. 10–15.
6. *Данилович Д.А., Козлов М.Н., Мойжес О.В., Николаев Ю.А., Казакова Е.А.* // Водоснабжение и санитарная техника. 2010. № 4. С. 49–54.
7. *Sinninghe Damsté J.S., Strous M., Rijpstra W.I.C., Hopmans E.C., Geenevasen J.A.J., Van Duin A.C.T., Van Niftrik L.A., Jetten M.S.M.* // Nature. 2002. V. 419. № 5. P. 708–712.
8. *Hopmans E.C., Kienhuis M.V.M., Rattray J.E., Jaeschke A., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S.* // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. V. 20. № 14. P. 2099–2103.
9. *Sinninghe Damsté J.S., Rijpstra W.I.C., Geenevasen J.A.J., Strous M., Jetten M.S.M.* // FEBS J. 2005. V. 272. № 16. P. 4270–4283.
10. *Welti R.* // The Arabidopsis Book. Rockville: MD. Amer. Soc. Plant Biol. 2010. doi: 10.1199/tab.0133, www.aspb.org/publications/arabidopsis.
11. *Little J.L., Wempe M.F., Buchanan C.M.* // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2006. V. 833. № 2. P. 219–230.
12. *Boumann H.A., Hopmans E.C., van de Leemput I., Op den Camp H.J.M., van de Vossenberg J., Strous M., Jetten M.S.M., Sinninghe Damsté J.S., Schouten S.* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 258. № 2. P. 297–304.
13. *Lanekoff I.* Analysis of Phospholipids in Cellular Membranes with LC and Imaging Mass Spectrometry // Thesis Doc. Philos. Department of Chemistry, University of Gothenburg, Göteborg, Sweden, 2011.
14. *Shivaraman N., Shivaraman G.* // Curr. Sci. 2003. V. 84. № 12. P. 1507–1508.

Lipid Composition of Activated Sludge in a Pilot Plant for Anaerobic Ammonium Oxidation

M. N. Kozlov, M. V. Kevbrina, A. G. Dorofeev, E. A. Kazakova, V. A. Grachev, D. Yu. Polyakov, V. G. Aseeva, and Yu. A. Nikolaev

OAO Mosvodokanal, Moscow, Russia

Received February 12, 2013

Abstract—The lipid composition of the microbial community inhabiting activated sludge in a pilot reactor for the anaerobic oxidation of ammonium (anammox) at the Kur'yanovo Treatment Plant (Moscow) has been studied. The fatty acid composition is mostly based on common fatty acids C₁₄–C₁₈ (95%) with both normal and isomeric structures. The biomass of activated sludge was found to contain lipids with the so-called ladderane substances (ladder alcohols and fatty acids) that are common for anammox bacteria: C₂₀-[3]-ladderane and C₂₀-[5]-ladderane alcohols and C₁₈- and C₂₀-[3]-ladderane and C₁₈- and C₂₀-[5]-ladderane acids. In addition, the native extract contained both simple and compound ethers of the above-mentioned substances with residues of phosphocholine, phosphoethanolamine, and phosphoglycerine. The spectra of the electron impact and tandem mass spectrometry of certain substances have been obtained and published for the first time.

УДК 579.852.083.18

СЕЛЕКЦИЯ СООБЩЕСТВА АЦИДОХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ВЫСОКОЙ СКОРОСТЬЮ БИООКИСЛЕНИЯ ФЛОТОКОНЦЕНТРАТА ПИРРОТИНСОДЕРЖАЩЕЙ СУЛЬФИДНОЙ РУДЫ

© 2013 г. Т. Ф. Кондратьева*, Т. А. Пивоварова*, А. Г. Булаев*, П. В. Мошанецкий*,
И. А. Цаплина*, Н. В. Григорьева*, А. Е. Журавлёва*, В. С. Меламуд*, А. В. Белый**

*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 117312

**ЗАО “Полюс”, Красноярский край, 663280

e-mail: kondr@inmi.ru

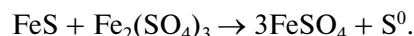
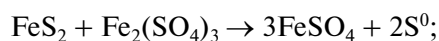
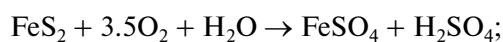
Поступила в редакцию 12.02.2013 г.

Селекционировано сообщество микроорганизмов с высокой скоростью окисления флотоконцентрата пирротинсодержащей сульфидной руды, в составе которого в качестве доминирующих культур были идентифицированы *Acidithiobacillus caldus* ОП-1 и *Ferroplasma acidiphilum* ОП-2. Отмечено также присутствие культур *Acidithiobacillus ferrooxidans* ОП-3, *Leptospirillum ferriphilum* ОП-4 и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* ОП-5. Результаты анализа твердых остатков процесса показали большую степень окисления элементарной серы и извлечения золота (90.5%) при поддержании исходного значения pH в реакторе I на уровне 1.8–2.0, чем на уровне 1.6–1.8 (86.3%).

DOI: 10.7868/S055510991305005X

Биоокисление флотоконцентратов золотомышьяковых сульфидных руд сообществами ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов является важнейшей стадией в биогидрометаллургических технологиях извлечения золота. Понимание закономерностей их формирования, знание оптимальных условий для роста и энергетического метаболизма важно не только для пополнения знаний об этой уникальной физиологической группе микроорганизмов, но и для интенсификации и повышения эффективности бактериально-химических процессов.

Главным недостатком современных биогидрометаллургических технологий извлечения золота из флотоконцентратов золотомышьяковых руд является недоокисление сульфидных минералов и элементарной серы, что приводит к потерям золота и высоким расходам цианида натрия при извлечении Au. Накопление в твердой фазе в процессе биоокисления большого количества S⁰ связано с высоким содержанием пирита или пирротина в ряде флотоконцентратов упорных золотомышьяковых сульфидных руд. Оба минерала окисляются трехвалентным железом — продуктом биоокисления микроорганизмами двухвалентного железа — с образованием элементарной серы:



Кислоторастворимые сульфидные минералы, такие, как пирротин, окисляются по полисульфидному механизму, кислотонерастворимый пирит окисляется по тиосульфатному пути [1, 2].

Сравнительный анализ видового и штаммового разнообразия сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из природных экосистем, и их мониторинг в реакторах биогидрометаллургических технологий позволяет выявить основные факторы среды, влияющие на эволюционные процессы в генетически гетерогенных природных популяциях микроорганизмов и формирующие разные микробные сообщества. Это минералогический и элементный состав субстрата окисления, температура, значение pH, наличие органических веществ [3].

Ранее из пробы флотоконцентрата упорной золотомышьяковой сульфидной руды с высоким содержанием пирротина было выделено аборигенное сообщество ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов и создано экспериментальное сообщество микроорганизмов [4]. В его состав наряду с микроорганизмами аборигенного сообщества были включены штаммы микроорганизмов: *Sulfobacillus olympiadicus* OL-6; *S. thermosulfidooxidans* HT-3, OL-7, Ser, P, M; *Leptospirillum ferriphilum*, выделенные из золотомышьяковых руд Попутнинского и Олимпиадинского месторождений; *Ferroplasma acidiphilum* Kuch, выделенный из концентрата ру-

ды Кючусского месторождения; *Acidithiobacillus thiooxidans* N (Армения); *A. caldus*, выделенный из накопительной культуры при 35°C из пробы пиритно-арсенопиритного золотомышьякового концентрата, а также сообщество микроорганизмов, выделенное из руды Попутнинского месторождения.

Была изучена скорость окисления двумя сообществами микроорганизмов разных форм серы (элементарной серы, тиосульфата и тетрагидротелурида) в качестве единственных источников энергии, образующихся в процессе окисления пирита и пирротина [4]. Несмотря на более высокую скорость окисления форм серы в качестве единственных источников энергии экспериментальным сообществом микроорганизмов, аборигенное сообщество с большей скоростью окисляло формы серы в флотоконцентрате пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной золотомышьяковой сульфидной руды.

В режиме периодического культивирования была проведена работа по оптимизации условий роста и биоокисления флотоконцентрата золотомышьяковой сульфидной руды с высоким содержанием пирротина сообществом микроорганизмов, включающим как представителей аборигенной микрофлоры, так и экспериментально созданного сообщества [5]. Было показано, что оптимальными условиями являются: ведение процесса при поддержании pH на уровне 1.6–1.7 при 34–35°C в присутствии в среде 0.02% дрожжевого экстракта.

Актуальной проблемой совершенствования биогидрометаллургической технологии извлечения золота из флотоконцентратов упорных сульфидных руд является повышение скорости окисления элементарной серы.

Цель работы – селекция сообщества ацидохемолитотрофных микроорганизмов с высокой скоростью окисления сульфидных минералов и элементарной серы, образующейся в процессе окисления пирротинсодержащего флотоконцентрата в режиме полунепрерывного культивирования в лабораторных реакторах в разных диапазонах pH.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Объектами исследования служили: флотоконцентрат упорной золотомышьяковой сульфидной руды с высоким содержанием пирротина (30–35%), в состав которого входило (%): Fe_{общ.} – 25.4, Fe_{сульф.} – 20.37, As_{общ.} – 8.45, As_{сульф.} – 6.69, S_{общ.} – 18.33, S_{сульф.} – 17.84, S⁰ – 0.8, и сообщество ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, селекционированное в процессе оптимизации условий роста и окисления флотоконцентрата в периодическом режиме культивирования [5]. В составе сообщества присутствовали культуры, выделенные из пробы флотоконцентрата, и штаммы культур ацидо-

фильных хемолитотрофных микроорганизмов из музея лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов ИНМИ РАН.

Условия экспериментов в лабораторных реакторах. Процесс полунепрерывного культивирования сообщества микроорганизмов проводили в линии из трех лабораторных реакторов объемом 2.5 л с 600 мл пульпы с 16.6%-ной плотностью флотоконцентрата при 34°C и скорости вращения вала турбинной мешалки 500 об./мин. В качестве жидкой фазы был использован солевой состав среды 9K [6] без внесения соли железа. Термостатирование осуществляли при помощи U-образного теплообменника, соединенного с термостатом Elmi TW2.02 (Латвия). Интенсивность подачи воздуха составляла 5 : 1 об./об. среды в 1 мин. Дважды в сут проводили массообмен по 75 и 125 мл пульпы. Весь объем пульпы замещался за 9 сут при скорости протока 0.0046 ч⁻¹.

Аналитические методы. Величины pH и Eh измеряли с помощью pH-метра-милливольтметра pH-150МА (Беларусь); значения Eh выражали относительно нормального водородного электрода. Концентрацию ионов Fe³⁺ и Fe²⁺ в жидкой фазе пульпы определяли методом комплексометрического титрования [7], суммарную концентрацию ионов As³⁺ и As⁵⁺ – методом йодометрического титрования [8]. Численность клеток микроорганизмов определяли прямым подсчетом в микроскопе CX-41 (“Olympus”, Япония) с фазовым контрастом. Содержание сульфидных элементов в продуктах переработки золотосодержащих концентратов (твердые остатки) определяли после отмывки твердой фазы 5%-ным раствором HCl в течение 24 ч при 30°C флуоресцентным рентгенометрическим методом [9]. Содержание золота в твердых остатках определяли пробирным анализом. Степень извлечения золота – сорбционным цианированием осадков. Цианирование проводили в следующих условиях: плотность пульпы – 30%, pH 10.2–10.5, 1.0 г/л цианида натрия (70% времени), продувание воздухом 25 л/ч, 8% сорбента (carbon Norit 3515), 20°C в течение 48 ч. Уровень адсорбции золота на сорбенте 99–100%.

Методы изучения видового состава сообщества микроорганизмов. Выделение ДНК из биомассы бактерий проводили согласно методу [10].

Концентрация полученного препарата ДНК составляла 30–50 мкг/мл. РНК в полученном препарате присутствовала в следовых количествах (менее 1%, согласно данным электрофоретического анализа) [10].

Для проведения полимеразной цепной реакции, клонирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК и дальнейшего секвенирования клональных вставок бактериального происхождения были использованы универсальные праймеры [11].

Таблица 1. Окисление флотоконцентрата отселекционированным сообществом микроорганизмов при исходном рН 1.6–1.8

Сутки (время)	Реактор	рН	Eh, мВ	Fe ³⁺ /Fe ²⁺ , г/л	Общий As, г/л	Число кл./мл × 10 ⁹
1 (8.00)	I	1.60	622	6.72/13.13	2.24	1.68
	II	1.55	642	14.98/10.9	6.36	1.90
	III	1.48	660	17.75/9.8	9.80	1.60
1 (17.00)	I	1.64	620	5.18/14.56	2.90	1.37
	II	1.49	647	14.0/8.9	6.0	1.80
	III	1.40	662	18.06/9.8	7.70	1.77
2 (8.00)	I	1.64	612	4.6/11.55	2.24	1.56
	II	1.54	649	17.36/12.8	6.96	1.60
	III	1.46	661	17.9/10.64	9.26	1.20
2 (17.00)	I	1.77	606	3.36/13.02	2.30	1.52
	II	1.46	650	16.24/13.1	5.61	2.18
	III	1.35	663	18.26/12.3	7.48	1.20
3 (8.00)	I	1.80	605	4.06/9.1	3.46	1.90
	II	1.41	639	8.0/8.7	5.61	2.0
	III	1.21	667	16.1/10.0	8.41	1.30

Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования архейного компонента использовали оригинальную праймерную систему [12].

Объем амплификационной смеси в обоих случаях составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1 × буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl, рН 8.8, 2 мМ MgCl₂); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq (“Диалат ЛТД”, Россия).

Температурно-временной профиль ПЦР при проведении ПЦР на ДНК-амплификаторе Gradient MasterCycler (“Eppendorf”, Германия) был следующим: первый цикл – 94°C, 9 мин; 55°C, 1 мин; 72°C, 2 мин; последующие 30 циклов: 94°C, 1 мин; 55°C, 1 мин; 72°C, 2 мин; завершающий цикл: – 72°C, 7 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-ном геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Выделение продуктов ПЦР из легкоплавкой агарозы и их очистку проводили с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (“Promega”, США) согласно рекомендациям производителя. Продукты амплификации клонировали с использованием набора реактивов pGEM-T System (“Promega”, США) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование проводили по методу Сэнгера с соавт. [13] с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (“Applied Biosystems, Inc.”, США) на

автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (“Applied Biosystems, Inc.”) согласно инструкциям производителя. При этом для секвенирования использовали как внешние, так и внутренние праймеры, и чтение проводили в двух направлениях.

Первичный анализ сходства полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с помощью сервера BLASTa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Последовательности выравнивали с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTALW [14]. Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические параметры жидкой фазы пульпы в процессе биоокисления флотоконцентрата сообществом микроорганизмов при исходном значении рН 1.6–1.8. Опыты проводили при исходном значении рН 1.6–1.8. В табл. 1 включены данные за 3 сут после полного замещения объема пульпы, в течение которых отбирали пробы на цианирование. В таблице приводятся данные, соответствующие физико-химическим параметрам за 9 и 15 ч окисления, т.е. до введения новой порции пульпы.

Как видно из данных табл. 1, при исследуемых условиях процесса установились стабильные физи-

Таблица 2. Окисление флотоконцентрата отселекционированным сообществом микроорганизмов при исходном рН 1.8–2.0

Сутки (время)	Реактор	рН	Eh, мВ	Fe ³⁺ /Fe ²⁺ , г/л	Общий As, г/л	Число кл./мл × 10 ⁹
1 (8.00)	I	1.85	605	4.06/11.72	2.89	1.40
	II	1.55	642	11.2/10.92	6.10	1.80
	III	1.48	660	17.75/9.80	8.10	1.0
1 (17.00)	I	1.94	595	3.18/11.56	2.99	1.44
	II	1.49	647	11.34/8.90	5.98	1.80
	III	1.40	662	18.06/9.80	7.10	1.0
2 (8.00)	I	1.99	609	3.36/11.76	2.99	1.44
	II	1.54	649	17.36/12.8	5.96	1.80
	III	1.46	661	17.9/10.64	8.97	1.0
2 (17.00)	I	1.91	599	3.66/10.23	2.05	1.52
	II	1.68	631	13.3/11.48	5.61	2.18
	III	1.35	663	20.49/9.94	5.60	1.20
3 (8.00)	I	1.92	615	3.92/11.48	3.90	1.60
	II	1.41	639	11.64/9.52	5.99	2.10
	III	1.21	667	16.1/10.0	7.80	1.30

ко-химические параметры. Значения рН снижались от реактора I к реактору III от 0.12 до 0.24 ед. на 1 сут эксперимента, от 0.18 до 0.42 ед. — на 2 сут и на 0.59 ед. — на 3 сут. Самое высокое подкисление среды было отмечено на 3 сут. Значение Eh за время наблюдений повышалось от реактора I к реактору III на 38, 42, 49, 57 и 62 мВ, однако было относительно низким для активного процесса окисления сульфидных минералов: в реакторе III — 660–667 мВ. Это объяснялось присутствием в жидкой фазе пульпы двухвалентного железа, выщелоченного из сульфидных минералов. До конца процесса двухвалентное железо в данных условиях эксперимента окислено не было. Максимальное содержание общего железа в жидкой фазе пульпы (30.56 г/л) отмечено на 2 сут наблюдений. На 3 сут во всех реакторах показано снижение содержания общего железа за счет осаждения трехвалентного. Содержание общего мышьяка, выщелоченного из арсенопирита, возрастало от реактора I к реактору III, достигая максимального значения 9.8 г/л. Численность клеток в реакторе II несколько увеличивалась по сравнению с реактором I, достигая максимального значения 2.18×10^9 кл./мл. В реакторе III численность клеток уменьшалась в результате снижения рН и увеличения концентрации мышьяка в жидкой фазе пульпы.

Физико-химические параметры жидкой фазы пульпы в процессе биоокисления флотоконцентрата сообществом микроорганизмов при исходном значении рН 1.8–2.0. Был изучен процесс бактериально-химического окисления флотоконцентрата

при исходном значении рН 1.8–2.0. Результаты исследований представлены в табл. 2, в которую включены данные за 3 сут после полного замещения объема пульпы, в течение которых отбирали пробы на цианирование, также приводятся данные, соответствующие физико-химическим параметрам за 9 и 15 ч окисления, т.е. до введения новой порции пульпы.

Как видно из данных табл. 2, при исследуемых условиях процесса установились стабильные физико-химические параметры. Значения рН снижались от реактора I к реактору III от 0.37 до 0.54 ед. на 1 сут эксперимента, от 0.53 до 0.56 ед. — на 2 сут и на 0.71 ед. — на 3 сут. Самое интенсивное подкисление среды было отмечено в течение 3 сут. Значение Eh за время наблюдений повышалось от реактора I к реактору III, в среднем, на 58 мВ, однако было относительно низким для активного процесса окисления сульфидных минералов: в реакторе III — 660–667 мВ. До конца процесса двухвалентное железо в данных условиях эксперимента окислено не было. Максимальное содержание общего железа в жидкой фазе пульпы (30.43 г/л) отмечено на 2 сут наблюдений. На 3 сут во всех реакторах показано снижение содержания общего железа за счет осаждения трехвалентного. Содержание общего мышьяка, выщелоченного из арсенопирита, возрастало от реактора I к реактору III, достигая максимального значения 8.97 г/л. Численность клеток в реакторе II, так же, как и в процессе при исходном значении рН 1.6–1.8, несколько увеличивалась по сравнению с реактором I, достигая такой

Таблица 3. Содержание сульфидных элементов в исходном флотоконцентрате и в биокеках после окисления при разных значениях рН

Субстрат	Содержание, %							
	Fe _{сульф.}	As _{сульф.}	Sb _{общ.}	Sb _{сульф.}	S _{общ.}	S ⁰	S _{сульфатн.}	S _{сульф.}
Исходный концентрат	20.37	6.69	3.69	—	18.33	0.8	0	17.84
Биокек после окисления при рН _{исх.}								
1.6–1.8	8.6	1.81	3.25	0.35	14.76	1.46	3.49	9.81
1.8–2.0	6.45	1.30	3.41	0.54	14.67	1.29	4.17	9.21

же максимальной численности 2.18×10^9 кл./мл, и снижалась в реакторе III.

Сравнительный анализ физико-химических параметров пульпы в процессе окисления флотоконцентрата сообществом микроорганизмов при разных исходных значениях рН в первом реакторе. При значении рН в реакторе I в диапазоне 1.8–2.0 (второй вариант) его величина снижалась в реакторе III по ходу процесса в среднем на 0.54 ед., тогда как при значении рН в реакторе I в диапазоне 1.6–1.8 (первый вариант) – на 0.31 единицы. Это свидетельствовало о более активном окислении элементной серы в варианте при более высоком значении исходного рН. В первом варианте (рН 1.6–1.8) содержание общего железа в реакторе III составило в среднем 28.12 г/л, во втором варианте (рН 1.8–2.0) – 28.10 г/л. При более высоком значении рН шло более активное осаждение солей трехвалентного железа, поэтому можно предположить, что из сульфидных минералов в этих условиях процесса было выщелочено больше железа. В первом варианте в жидкой фазе реактора III содержалось 8.41 г/л общего мышьяка, тогда как во втором варианте – 7.80 г/л, что также, возможно, связано с большей скоростью соосаждения железа с мышьяком при более высоких исходных значениях рН в реакторах I.

В табл. 3 и 4 приведены результаты анализа твердых остатков (биокеки) после биоокисления флотоконцентрата при разных исходных значениях рН. В процессе окисления флотоконцентрата в реакторе I в диапазоне рН 1.8–2.0 в биокеке отмечено меньшее содержание Fe_{сульф.}, As_{сульф.} и S⁰, чем при рН в диапазоне 1.6–1.8 (табл. 3). При этом было окислено (%): Fe_{сульф.} – 76.1, As_{сульф.} – 85.3, S_{сульф.} – 61.0 и Fe_{сульф.} – 72.7, As_{сульф.} – 82.5, S_{сульф.} – 64.4 соответственно (табл. 4).

Селекционированное сообщество микроорганизмов в процессе роста и окисления энергетического субстрата в режиме полунепрерывного культивирования с большей скоростью окисляло элементную серу (содержание в твердой фазе реактора III 1.46% при рН процесса 1.6–1.8 и 1.29% при рН

процесса 1.8–2.0), чем аборигенное и экспериментальное сообщества (содержание элементной серы – 2.21 и 1.97% соответственно) [5].

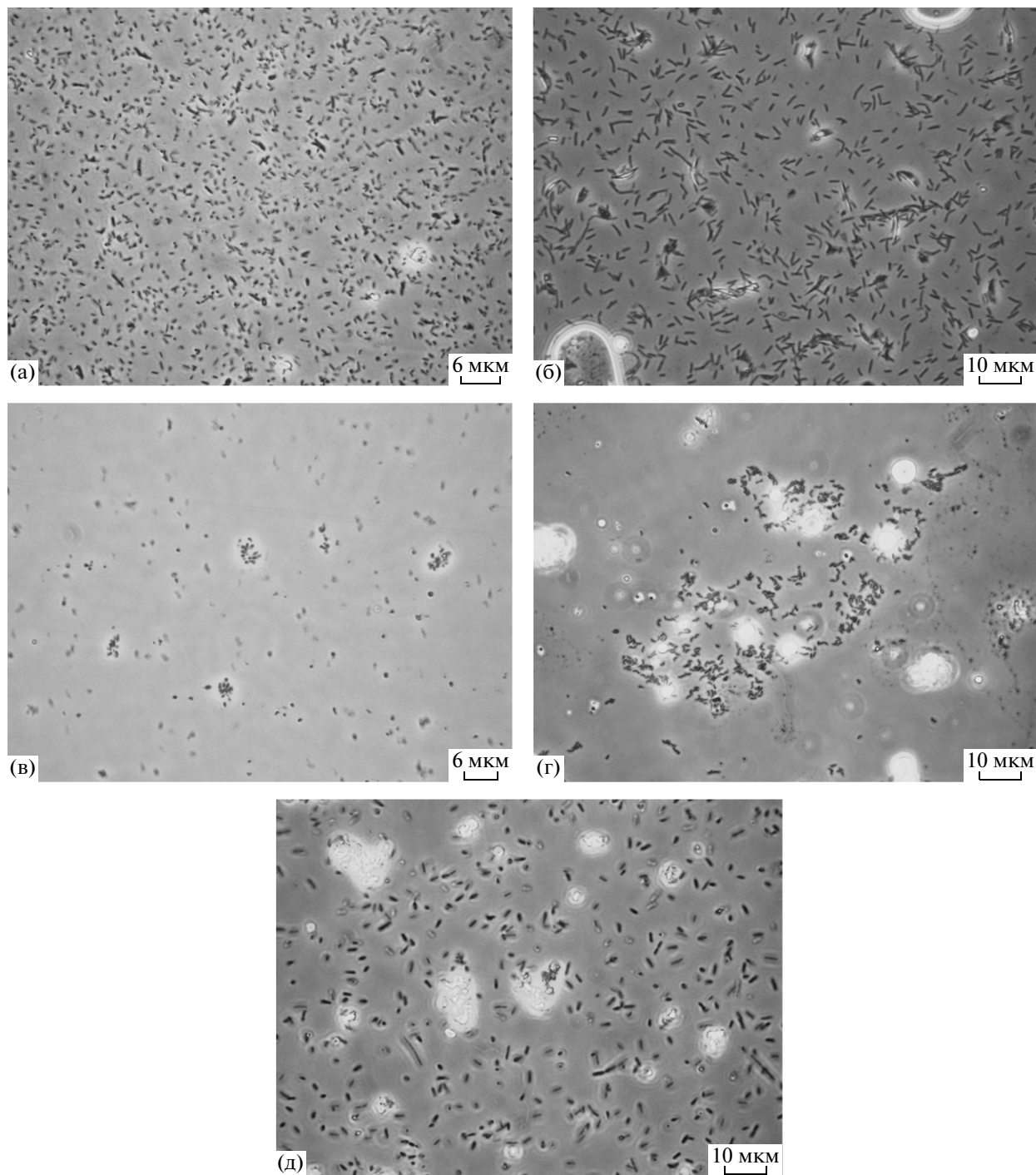
В обоих вариантах отмечено активное окисление сульфидных минералов, содержащих сурьму, причем в первом варианте, при рН 1.6–1.8, минералы сурьмы окислялись активнее, чем во втором варианте, при рН 1.8–2.0: содержание Sb_{сульф.} в биокеке реакторов III – 0.35 и 0.54% соответственно.

Пробирным анализом в исходном флотоконцентрате было определено 75 г/т золота. В результате цианирования из исходного флотоконцентрата было извлечено 62.0% свободного золота. В процессе биоокисления флотоконцентрата при рН_{исх.} 1.6–1.8 было дополнительно извлечено 24.3% золота. В процессе биоокисления флотоконцентрата при рН_{исх.} 1.8–2.0 было дополнительно извлечено 28.5% золота. Селекционированное сообщество с большей скоростью окисляло сульфидные минералы, содержащие золото, при исходном значении рН жидкой фазы пульпы 1.8–2.0, чем при рН 1.6–1.8 при прочих равных условиях.

Анализ видового состава селекционированного сообщества микроорганизмов. В жидкой фазе пульпы реакторов III в процессе окисления фло-

Таблица 4. Степень окисления сульфидных минералов и извлечение золота из биокеков после окисления флотоконцентрата при разных значениях рН

Субстрат	Степень окисления, %			Извлечение, %
	Fe _{сульф.}	As _{сульф.}	S _{сульф.}	
Исходный концентрат	—	—	—	62.0
Биокек после окисления при рН _{исх.}				
1.6–1.8	72.69	82.50	64.43	86.3
1.8–2.0	76.08	85.32	61.0	90.5



Общий вид клеток сообщества ацидохемолитотрофных микроорганизмов из жидкой фазы пульпы реактора III, сконцентрированной в 5 раз (а); культура *Acidithiobacillus caldus* ОП-1 (б); культура *Ferroplasma acidiphilum* ОП-2 (в); культура *Leptospirillum ferriphilum* ОП-4 (г); культура *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* ОП-5 (д).

токонцентрата при разных исходных значениях рН отмечены клетки микроорганизмов с морфотипами *Acidithiobacillus* spp., *Leptospirillum* spp., *Sulfobacillus* spp. и *Ferroplasma* spp. (рисунок а). Преобладали палочки с средним размером клеток (0.3×1.6) мкм; встречались более крупные

палочки со средним размером (0.5×2.4) мкм, а также округлые клетки архей и изогнутые клетки лептоспирилл.

С использованием метода выделения чистых культур микроорганизмов многократными рассевами жидкой фазы пульпы в десятикратных пре-

дельных разведениях была выделена доминирующая бактерия, обозначенная “Б”, и доминирующий археон, обозначенный “А”, и изучены их молекулярно-биологические характеристики.

Была определена практически полная последовательность (1438 нуклеотидов) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК у доминирующей в сообществе бактерии “Б”. Проведен анализ полученной последовательности путем сравнения с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank. Из полученных данных следовало, что филогенетически наиболее близкими к исследованной бактерии “Б” были виды *Acidithiobacillus caldus* штамм DX-2 (DQ470072), *A. caldus* штамм SM-1 (CP002573), *A. caldus* штамм N39-30-02 (EU499920) и *Thiobacillus caldus* (AF137369). Уровень сходства последовательностей бактерии “Б” с штаммом *A. caldus* DX-2 составил 100%, с штаммом *A. caldus* SM-1 и штаммом *A. caldus* N39-30-02 – 99.9%, с штаммом бактерий *T. caldus* – 99.6%. Уровень сходства с типовым штаммом *A. caldus* ATCC 51756 (Z29975) – 99.7%. По существующим в настоящее время представлениям [15] обнаруженный уровень сходства последовательностей гена 16S рРНК позволил отнести бактериальную культуру “Б” к виду *A. caldus* ОП-1 (рисунок б).

Была определена практически полная последовательность (1416 нуклеотидов) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК у доминирующего в сообществе археона “А”. Проведен анализ полученной последовательности путем сравнения с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank. Из полученных данных следовало, что филогенетически наиболее близкими к археону “А” были виды архей *F. acidiphilum* штамм Y (NR_028183) и *F. acidiphilum* штамм DR1 (AY222042). Уровень сходства нуклеотидной последовательности гена археона “А” и штамма *F. acidiphilum* DR1 составил 99.7%; уровень сходства с типовым штаммом *F. acidiphilum* Y – 99.5%. Обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рРНК позволил отнести культуру археона “А” к виду *F. acidiphilum* ОП-2 (рисунок в).

Согласно данным, полученным молекулярно-биологическими методами, в исходном сообществе идентифицированы только 2 доминирующих в процессе окисления флотоконцентрата микроорганизма: штамм бактерии *A. caldus*, который составил 90% от общего числа микроорганизмов, и археон *F. acidiphilum*.

Однако известно, что *A. caldus* не окисляет восстановленные формы железа, поэтому исходное сообщество микроорганизмов было проанализировано на соотношение железо- и сероокислителей культуральным методом посева жидкой фазы пульпы в предельных десятикратных разведениях

на элективные среды: Сильвермана и Лундгрена с двухвалентным железом в качестве источника энергии и на среду Алена и Брока с элементной серой [16].

Посевы проводили до десятого разведения и помещали в термостат на 35°C на 14 сут. Затем рост культур контролировали под световым микроскопом с фазово-контрастным устройством, начиная с пятого разведения. Это позволило выявить *Leptospirillum* sp. во всех реакторах в количестве 10⁵ кл./мл. Даже в последних разведениях, где есть рост бактерий, наблюдали неоднородность морфотипов микроорганизмов в сообществе: кроме *A. caldus* на среде с элементной серой и *A. ferrooxidans* на среде с железом, были обнаружены более крупные по размеру клетки сульфобацилл и архей. В исследуемом сообществе во всех реакторах преобладали *A. caldus*. Самое высокое их содержание приходилось на реактор II и составляло 77% от общего числа клеток. Число клеток *A. caldus* снижалось к реактору III до 45.24%. Численность клеток *A. ferrooxidans* была невелика и составляла 6.49% в реакторе I и снижалась к реактору III до 3.84%. В реакторе III, где накапливались продукты метаболизма и лизиса клеток, увеличивалась численность архей рода *Ferroplasma* (27.61%) и бактерий рода *Sulfobacillus* (23.31%), нуждающихся в небольших количествах органических веществ.

A. ferrooxidans ОП-3, *L. ferriphilum* ОП-4 (рисунок г) и *S. thermosulfidooxidans* ОП-5 (рисунок д) были выделены в чистую культуру, и их таксономический статус подтвержден результатами анализа 16S рРНК. Уровень сходства нуклеотидной последовательности штамма *A. ferrooxidans* ОП-3 с типовым штаммом *A. ferrooxidans* AT33020^T составил 99.9%, нуклеотидной последовательности штамма *S. thermosulfidooxidans* ОП-5 с штаммом *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269^T – 99.8%, нуклеотидной последовательности *L. ferriphilum* ОП-4 с штаммом *L. ferriphilum* ВУ – 98.9%.

Таким образом, в составе селекционированного сообщества микроорганизмов с высокой скоростью окисления сульфидных форм железа и мышьяка, а также элементной серы, образующейся в процессе окисления сульфидных минералов флотоконцентрата с высоким содержанием пирротина, входили в качестве доминирующих культур *A. caldus* ОП-1 и *F. acidiphilum* ОП-2. Отмечено присутствие в составе сообщества также культур *A. ferrooxidans* ОП-3, *L. ferriphilum* ОП-4 и *S. thermosulfidooxidans* ОП-5.

Работа выполнена при поддержке ЗАО “Полюс” и гранта РФФИ № 13-08-00046.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shippers A., Sand W.* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 1. P. 319–321.
2. *Hansford G.S., Vargas T.* // Hydrometallurgy. 2001. V. 59. № 2–3. P. 135–145.
3. *Кондратьева Т.Ф., Пивоварова Т.А., Цапина И.А., Фомченко Н.В., Журавлёва А.Е., Муравьев М.И., Меламуд В.С., Булаев А.Г.* // Микробиология. 2012. Т. 81. № 1. С. 3–28.
4. *Пивоварова Т.А., Булаев А.Г., Рошупко П.В., Белый А.В., Кондратьева Т.Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 6. С. 640–645.
5. *Цапина И.А., Журавлёва А.Е., Григорьева Н.В., Белый А.В., Пивоварова Т.А., Булаев А.Г., Меламуд В.С., Кондратьева Т.Ф.* // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 314–324.
6. *Silverman M.P., Lungren D.C.* // J. Bacteriol. 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
7. *Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю.* Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. С. 140–143.
8. *Суворовская И.А., Титов В.И., Бродская В.М., Васильев П.И., Липици Б.М., Элентур М.П.* // Технический анализ в цветной металлургии. М.: Металлургиздат, 1957. С. 182–184.
9. *Филиппова Н.А.* Фазовый анализ руд и продуктов их переработки. М.: Химия, 1975. 279 с.
10. *Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф.* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 500–508.
11. *Lane D.J.* // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. P. 115–175.
12. *Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П.* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 283–286.
13. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
14. *Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.* // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680.
15. *Stackebrandt E., Ebers J.* // Microbiology Today. 2006. P. 152–155.
16. Биогeотехнология металлов. Практ. рук. / Ред. Г.И. Каравайко, Дж. Росси, А. Агате, С. Груднев, З.А. Авакян. М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. С. 64–71.

Selection of a Community of Acidochemolithotrophic Microorganisms with a High Oxidation Rate of Pyrrhotite-Containing Sulphide Ore Flotation Concentrate

T. F. Kondrat'eva^a, T. A. Pivovarova^a, A. G. Bulaev^a, P. V. Moshchanetskii^a, I. A. Tsaplina^a, N. V. Grigor'eva^a, A. E. Zhuravleva^a, V. S. Melamud^a, and A. V. Belyi^b

^a Vinogradskii Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

^b ZAO Polyus, Krasnoyarsk krai

e-mail: kondr@inmi.ru

Received February 12, 2012

Abstract—A community of acidochemolithotrophic microorganisms with a high oxidation rate of pyrrhotite-containing sulphide ore flotation concentrate was selected. The *Acidithiobacillus caldus* OP-1 and *Ferropasma acidiphilum* OP-2 cultures were identified to be dominating members. The presence of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* OP-3, *Leptospirillum ferriphilum* OP-4, and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* OP-5 cultures in the community's composition was also mentioned. The analysis results of solid residues of the process showed a greater elemental sulfur oxidation level and gold recovery when the initial pH value in tank I was maintained at a level of 1.8–2.0 (90.5%) rather than 1.6–1.8 (86.3%).

УДК 582.28

NOVEL MUTATIONS IN β -TUBULIN GENE IN *Trichoderma harzianum* MUTANTS RESISTANT TO METHYL BENZIMIDAZOL-2-YL CARBAMATE

© 2013 M. Li^{*,**}, H. Y. Zhang^{*,***}, and B. Liang^{**}

^{*}Fundamental Science on Radioactive Geology and Exploration Technology Laboratory, East China Institute of Technology, NanChang, Jiangxi, 330013, China

^{**}Faculty of Chemistry Biology and Material Sciences, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China

^{***}College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475001, China

e-mail: limin_hit@yahoo.com.cn, muzibug@yahoo.com.cn, hypolb@ecit.cn

Received December 4, 2012

Twelve low resistant (LR) mutants of *Trichoderma harzianum* with the capability of grow fast at 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) were obtained using UV mutagenesis. MR and HR mutants which could grow fast at 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MBC, respectively, were isolated by step-up selection protocols in which UV-treated mutants were induced and mycelial sector screening was made in plates with growth medium. Subsequently, β -tubulin genes of 14 mutants were cloned to describe the molecular lesion likely to be responsible for MBC resistance. Comparison of the β -tubulin sequences of the mutant and sensitive strains of *T. harzianum* revealed 2 new MBC-binding sites differed from those in other plant pathogens. A single mutation at amino acid 168, having Phe (TTC) instead of Ser (TCC), was demonstrated for the HR mutant; a double mutation in amino acid 13 resulting in the substitution of Gly (GGC) by Val (GTG) was observed in β -tubulin gene of MR mutant. On the other hand, no substitutions were identified in the β -tubulin gene and its 5'-flanking regions in 12 LR mutants of *T. harzianum*.

DOI: 10.7868/S0555109913050085

Benomyl and methyl benzimidazol-2-yl carbamate (BBC and MBC), are benzimidazole fungicides widely used in China and worldwide on a large variety of crops to control plant pathogenic fungi [1]. However, many benzimidazole-resistant pathogenic isolates, e.g. *Penicillium* spp. [2], *Colletotrichum gloeosporioides* [3], *Botrytis cinerea* [4], have been detected in field shortly after intensive and exclusive use of these fungicides. In addition, reversion of resistant populations to fungicide sensitive ones has not been observed even after selection pressure has been removed for many years [5]. The appearance of resistance has become an important factor in limiting the efficacy and useful lifetime of fungicides developed at increasingly higher costs. Exploring new chemical fungicides and applying more fungicides in field are needed to control pathogens more efficiently. Stems form a worldwide need to adopt the practice of sustainable agriculture, using strategies that are environment-friendly, less dependent on agricultural chemicals and less damaging to soil and water resources, there has been considerable interest in the utilization of sublethal doses of chemicals with biocontrol strains which are resistant to them, and the information on this kind of integrated control is accumulating more rapidly than on other combinations of control components [6].

To implement integrated control combining biocontrol fungi with chemical fungicides, some biocontrol fungi with fungicide resistant phenotype have been

isolated gradually [7]. *Trichoderma* genus has been shown effective as biocontrol agent against a range of economically important aerial and soil-borne fungal plant pathogens [8]. Although mutations of *Trichoderma* spp. resistant to BBC and MBC have already been isolated [9], the obtaining of promising mutants with higher MBC resistant levels than field populations is important for the adoption of these agents with traditional chemical fungicides. Considered from this point, we decided to isolate promising MBC-resistant mutants of *T. harzianum* for integrated control in field with MBC using UV mutagenesis and step-up selection protocols.

Previous biochemical and genetic analyses have identified microtubules of *Saccharomyces cerevisiae* as primary benzimidazole binding target [10]. Benzimidazole functioned by inhibit the polymerization of tubulin monomers into functional microtubules, specifically on β -tubulin subunit. In addition, sequence rearrangement in 5'-flanking region of β -tubulin gene has been also observed in *Epichloe typhina* resistant strain [11]. The aim of the study was to describe molecular lesion likely to be responsible for MBC resistance in *T. harzianum*. The results would enrich the growing body of knowledge of β -tubulins connected with fungicide resistance and to find possible endogenous selectable markers for *T. harzianum*.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. The isolate *T. harzianum* was obtained from East China Institute of Technology. The growth potato dextrose agar (PDA) medium contained (g/L): potato infusion – 200, dextrose – 20, agar – 20. The strain was cultured in plates of 9 cm diameter at 25°C for 1 week. Fifteen ml distilled water with 0.005% (v/v) Tween 80 was poured onto the plate to prepare spore suspension (10^6 cells per ml). Subsequently, 1 mL of spore suspension was inoculated into 100 mL of liquied potato dextrose medium for chromosomal DNA isolation, incubated at 25°C and 200 rpm on an orbital shaker for 48 h and mycelia were harvested.

Induction of *T. harzianum* MBC-resistant mutant strains. Classical random mutagenesis and selection approach were taken to isolate *T. harzianum* MBC-resistant strains. First, spore suspension (10^6 CFU/mL) of the wild type was overlaid on PDA plates containing 5, 10, 50, 100 or 500 µg/mL MBC. The plates then were exposed to a 15W UV light sources at a distance of 30 cm for 90 sec. After UV exposure, the plates were incubated in the dark for 5–7 days at 25°C. Viable colonies were isolated and subcultured on a series PDA plates supplied with 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 or 1000 µg/mL MBC. Fungicide concentration that results in 50% mycelia growth inhibition (EC_{50}) and MBC sensitivity were calculated. Genetic stabilities were detected by triple subculturing without the fungicide, followed by retesting for MBC resistance.

Step-up selection protocol was designed to achieve higher level of drug resistance in which UV treatment fungal mutants were induced and subjected to form sectors [12]. Colonized agar plugs, 4 mm in diameter, were transferred from the margin of actively growing cultures of the sensitive and UV-induced resistant isolates, mycelium-side down, onto potato dextrose agar plates supplied with 30, 100, 500 or 1000 µg/mL MBC. The MBC concentrations used for selection were previously found to be highly inhibitory for each tested isolate. Plates were sealed with parafilm, incubated at 25°C in darkness and observed at 6 day intervals for colony diameter and sectoring. EC_{50} for growth inhibition mycelium and MBC sensitivity of *T. harzianum* were calculated. Stabilities of the fast growing mycelial sectors were tested as above.

DNA extraction. Mycelium of the sensitive and resistant isolates of *T. harzianum* were ground to powder in liquid nitrogen. About 100 mg powdered mycelium was added to 600 µL extraction buffer (200 mM Tris-HCl with 25 mM EDTA, 250 mM NaCl and 0.5% SDS, pH 8.0) containing 60 µg proteinase K (Sigma, USA). Following gentle homogenization, the sample was placed at 37°C for 30 min, centrifuged 5 min at $11.000 \times g$. The upper phase was transferred to a new tube and extracted with phenol-chloroform. The clear supernatant was precipitated with 600 µL isopropanol.

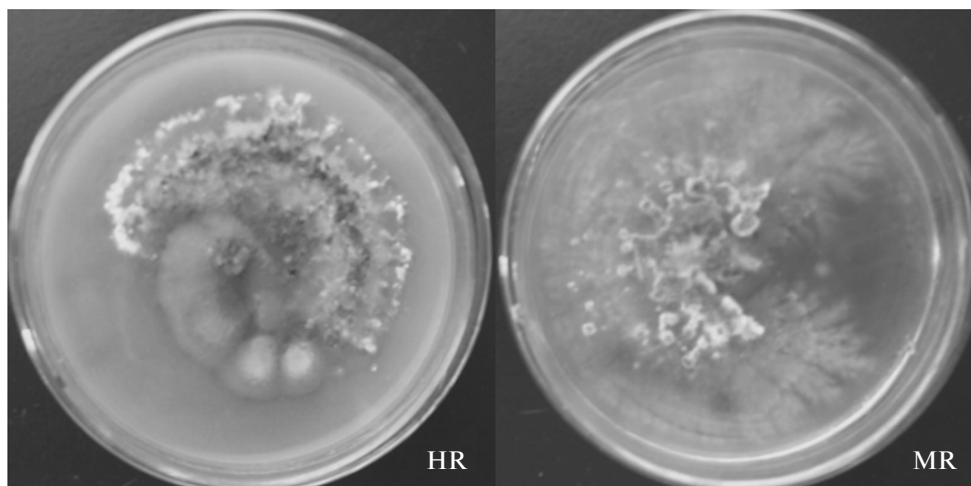
The nucleic acid pellet was washed with 70% (v/v) ethanol, air-dried, resuspended in 500 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl with 1 mM EDTA; pH 8.0) containing 10 µg RNase (Sigma, USA), incubated 30 min at 37°C, extracted with phenol-chloroform and precipitated with isopropanol as above. The final DNA pellet was washed twice with 70% (v/v) ethanol, air-dried, dissolved in nuclease-free water, and stored at –20°C until use.

Amplification of β -tubulin gene and flanking regions from MBC-resistant mutants. PCR amplifications were designed to generate β -tubulin gene coding region or its 5'-flanking region, using genomic DNA from variant resistant *T. harzianum* mutants as templates. Amplification from the sensitive fungal strain used as a control. Primers were designed based on the β -tubulin gene nucleotide sequences reported previously as follows: 5'-ATGCGTGAGATTGTGAGTTCCC-3' (forward) and 5'-TTACTCCTCCTCGTGCTCAGCA-3' (reverse) for the amplification of 1.7 kb β -tubulin gene coding region, 5'-AAGCTTCTCATCAGCAAGCTCG-3' (forward) and 5'-GATGGCTAGTGATGATGCTGGA-3' (reverse) for 1.5 kb 5'-flanking region. Amplified fragments were examined by agarose gel electrophoresis, followed by cloned and sequenced.

RESULTS AND DISCUSSION

Induction of *T. harzianum* MBC-resistant mutant strains. Four distinct resistance levels were prescribed to classify *T. harzianum* MBC-resistant isolates according to previous studies [13]: sensitive (S), could grow at 0.1 µg/mL of MBC, but was completely inhibited at 0.8 µg/mL; low resistance (LR), could grow fast at 0.8 µg/mL of MBC but completely inhibited at 10 µg/mL; moderate resistance (MR), could grow fast at 10 µg/mL of MBC and slowly at 50 µg/mL, but completely inhibited at 100 µg/mL; high resistance (HR), could grow fast at 100 µg/mL of MBC, partially inhibited at 1000 µg/mL and even could grow slowly at 1500 µg/mL.

A series PDA plates amended with 500, 100, 50, 10 or 5 µg/mL MBC were used for the selection of resistant fungal mutants. UV mutagenesis treatment was performed at 500 µg/mL of MBC and no growth was observed at this top concentration after 7 days of incubation at 25°C. In other experiments MBC concentration was 100, 50, 10 or 5 µg/mL. Twelve colonies were appeared on plates containing 5 µg/mL MBC. The survivors exhibited normal colony morphology and growth rate compared with the sensitive *T. harzianum* strain when cultured on medium without MBC. The UV-treated mutants were able to grow at 0.8 µg/mL of MBC, grew fast at a level of 5 µg/mL, but were completely inhibited at 10 µg/mL. The EC_{50} of the growth inhibition of 12 LR mutants of *T. harzianum* ranged from 3.8 to 6.4 µg/mL of MBC.



Two MBC-resistant mutant sectors (HR and MR) of mycelia growing out by step-up selection protocols in which UV-treated mutants of *T. harzianum*, were used.

UV mutagenesis is the most commonly used technique for microbial strain improvement, but our initial attempts obtained only a high frequency of occurrence of LR mutants. It is difficult to obtain the MR or HR *T. harzianum* mutants only by UV mutagenesis. Sectoring is thought being a strategy to get the target fungi reacted against the toxic effect of fungicides. It has been reported that many fungi e.g. *Fusarium graminearum* and *Alternaria brassicicola* can produce fast growing resistant sectors on agar medium containing fungicides [14, 15]. However, incorporation of fungicides to the growth medium of *Trichoderma* spp. led to sector formation very restricted. In this study, two fast growing sectors were produced by cultivating LR mutants on PDA plates supplied with 1000 or 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MBC for more than 15 days (Figure). One sector, where mycelium of *T. harzianum* could grow fast at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MBC and even be resistant to MBC at concentrations up to 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was designated as HR. The other one, with mycelium growing fast at

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MBC and slowly at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was designated as MR. The EC_{50} of the growth inhibition of two mycelial sectors were 628.7 and 38.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MBC (Table 1). Culturing the sensitive *T. harzianum* strain on MBC-containing medium, we did not observe any sector coming out. From this experiment we can conclude that after exposition to MBC in highly inhibitory concentrations, UV-treated mutants of *T. harzianum* can produce sectors more easily than the sensitive ones.

Considering that the field application concentration of MBC for control plant pathogenic fungi in China changes from 500 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, it is feasible to apply the HR isolate of *T. harzianum* concurrently in the field with MBC to reduce the number of the fungicide applications needed for pathogen. In contrast to some reports that fungal sectors treated with fungicide commonly exhibit abnormal colony type, morphotype or other phenotypic characteristics [16], the two mycelial sectors obtained in this study exhibit-

Table 1. Characteristics of resistance to MBC of the wild and mutant *T. harzianum* strains

Strain	Resistance to MBC (EC ₅₀ /MIC)* both in $\mu\text{g}/\text{mL}$	Mutation in β_2 -tubulin gene	Amino acid of the β_2 -tubulin gene	
			codon	substitution
Wild	0.4/0.8	GGC TCC	13 168	Gly Ser
MR**	38.2/100	GTG	13	Val
HR***	628.7/>1000	TTC	168	Phe

* EC₅₀ – concentration of MBC which inhibits the fungal growth to 50%, MIC – minimum inhibitory concentration of MBC which inhibits fungal growth by 100%.

** Fast growing mycelial sector, which was produced by cultivating UV mutants of *T. harzianum* on PDA plates supplied with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MBC for more than 15 days.

*** Fast growing mycelial sector, which was produced by cultivating UV mutants of *T. harzianum* on PDA plates supplied with 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MBC for more than 15 days.

Table 2. Mutations at the β -tubulins gene causing the resistance of selected filamentous fungi to benzimidazoles

Amino acid of the β -tubulin gene		Organism and reference
codon	substitution	
6	His to Leu	<i>Aspergillus nidulans</i> [18]
	His to Tyr	<i>A. nidulans</i> [18], <i>Monilinia fructicola</i> [19], <i>Septoria nodorum</i> [20], <i>Trichoderma viride</i> [21]
50	Tyr to Asn	<i>Fusarium moniliforme</i> [22]
165	Ala to Val	<i>A. nidulans</i> [23]
167	Phe to Tyr	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> [24], <i>Neurospora crassa</i> [25], <i>Penicillium expansum</i> [26], <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [27]
198	Glu to Ala	<i>Botrytis cinera</i> [28], <i>M. fructicola</i> [19], <i>Penicillium aurantiogriseum</i> [29], <i>P. expansum</i> [26], <i>Tapesia yallundae</i> [30], <i>Venturia inaequalis</i> [29]
	Glu to Asp	<i>A. nidulans</i> [18]
	Glu to Gln	<i>A. nidulans</i> [18], <i>T. yallundae</i> [30]
	Glu to Gly	<i>N. crassa</i> [31], <i>T. yallundae</i> [30]
	Glu to Lys	<i>A. nidulans</i> [18], <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> [32], <i>M. fructicola</i> [19], <i>P. aurantiogriseum</i> [29], <i>P. expansum</i> [26], <i>Sclerotinia homoeocarpa</i> [29], <i>T. yallundae</i> [30], <i>V. inaequalis</i> [29]
	Glu to Val	<i>P. expansum</i> [26]
200	Glu to Lys	<i>B. cinera</i> [33]
	Phe to Tyr	<i>P. aurantiogriseum</i> [29], <i>T. yallundae</i> [30], <i>V. inaequalis</i> [29]
240	Leu to Phe	<i>M. laxa</i> [34], <i>T. yallundae</i> [30]
241	Arg to His	<i>S. cerevisiae</i> [35]

ed the same colony morphology with the sensitive strain during growth on MBC-containing and control media. When cultivated on medium without the fungicide, the mycelial sectors could keep growth at the same rates in comparison with the sensitive strain, but reductions were observed with the elevation of MBC concentrations. All 14 resistant mutants (12 LR, MR, HR) of *T. harzianum* maintained genetic stability after triple subculturing without the fungicide, followed by retesting for MBC resistance.

Mutations responsible for MBC resistance in *T. harzianum*. Resistance to benzimidazoles in *S. cerevisiae* has been reported be correlated in most cases with point mutations in β -tubulin gene loci, leading to altered amino acid sequences at the benzimidazole-binding site [10]. This kind of resistance may result from single or multiple β -tubulin gene mutations. Moreover, mutations at different codons and even different substitutions at the same codon may result in different resistance levels to these compounds [17].

PCR amplifications were employed to generate 1.74 kb fragments by using DNA from the sensitive and 14 resistant isolates as template to verify if there exist any mutations in the β -tubulin gene responsible to the *T. harzianum* MBC resistance. Sequence comparisons of the target DNA fragments revealed a single base difference between the sensitive and the HR mu-

tant, a C to T transversion at nucleotide 844, resulting in Ser substitution for Phe at 168 amino acid, which is highly conserved among β -tubulins from other species. The MR mutant presents two consecutive mutations, having Val instead of Gly at the 13 position, thus substituting GGC codon for a GTG codon (Table 1). Previous studies have shown mutations at codon 6, 50, 165, 167, 198, 200, 240, 241 in β -tubulin gene of different fungi could cause benzimidazole resistance (Table 2). However, we have not found any report of mutations at the codons connecting with benzimidazole resistance similar to those found in this research in any field isolates or laboratory-induced mutants from filamentous fungi. Although strict amino acid differences exist in the β -tubulin gene, site-directed mutagenesis and structural analysis of the β -tubulin are also necessary to substantiate the molecular mechanism. The results would enrich the growing body of knowledge of fungal β -tubulins determining fungicide resistance.

No substitution was identified in the β -tubulin gene of all 12 LR mutants of *T. harzianum*. Considering sequence rearrangement in 5'-flanking region of β -tubulin gene observed in *Epichloe typhina* LR strain [12], we cloned the same region of *T. harzianum* LR strain extending about 1.5 kb upstream of ATG initiator codon. No variations altered the expression of the β -tubulin were revealed. It is presumed

that there could be some unrecognized mechanisms responsible for MBC resistance of fungi.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the National Science Foundation of China (Grant No. 21267001) and Youth Science Foundation of Education Department of Jiangxi Province (Grant No. GJJ11140).

REFERENCES

- Özkay, Y., Tunah, Y., Karaca, H., K. and Işıkdag, İ., *Arch. Pharm. Res.*, 2011, vol. 34, no. 9, pp. 1427–1435.
- Sholberg, P.L., Harlton, C., Haag, P., Lévesque, C.A., O’Gorman, D., and Seifert, K., *Postharvest Biol. Tec.*, 2005, vol. 36, no. 1, pp. 41–49.
- Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., and Freeman, S., *Phytopathol.*, 2006, vol. 96, no. 5, pp. 542–548.
- Zhang, C.Q., Liu, Y.H., and Zhu, G.N., *Eur. J. Plant Pathol.*, 2010, vol. 126, no. 4, pp. 509–515.
- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P., and Pratella, G.C., *Plant Pathol.*, 2003, vol. 52, no. 3, pp. 362–370.
- Adandonon, A., Aveling, T.A.S., Labuschagne, N., and Tamo, M., *Eur. J. Plant Pathol.*, 2006, vol. 115, no. 4, pp. 409–418.
- Shi, W.B. and Feng, M.G., *Biol. Control.*, 2006, vol. 39, no. 2, pp. 210–217.
- Kamala, T. and Indira, S., *Biotech.*, 2011, vol. 1, no. 4, pp. 217–225.
- Olejníková, P., Ondrušová, Z., Kryštofová, S., and Hudecová, D., *Folia Microbiol.*, 2010, vol. 55, no. 1, pp. 102–104.
- Li, J., Katiyar, S.K. and Edlind, T.D., *FEBS. Lett.*, 1996, vol. 385, pp. 7–10.
- Byrd, A.D., Schardl, C.L., Songlin, P.J., Mogen, K.L., and Siegel, M.R. *Curr. Genet.*, 1990, vol. 18, no. 4, pp. 347–354.
- Zheng, X.B. and Ko, W.H., *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 1997, vol. 38, pp. 177–182.
- Koenraadt, H., Somerville, S.C., and Jones, A.L., *Phytopathology*, 1992, vol. 82, no. 11, pp. 1348–1354.
- Chen, Y., Li, H.K., Chen, C.J., and Zhou, M.G., *Phytoparasitica*, 2008, vol. 36, no. 4, pp. 326–337.
- Dongo, A., Bataillé-Simoneau, N., Campion, C., Guillemette, T., Hamon, B., Iacomi-Vasilescu, B., *Appl. Environ. Microb.*, 2009, vol. 75, no. 1, pp. 127–134.
- Amany, H., Abo, E., and Sharaf, E.F., *OnLine J. Biol. Sci.*, 2003, vol. 3, no. 3, pp. 271–281.
- Ma, Z.H. and Michailides, T.J., *Crop. Prot.*, 2005, vol. 24, no. 1, pp. 853–863.
- Jung, M.K., Wilder, I.B., and Oakley, B.R., *Cell Motil. Cytoskel.*, 1992, vol. 22, no. 3, pp. 170–174.
- Ma, Z.H., Yoshimura, M.A., and Michailides, T.J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 12, pp. 7145–7152.
- Cooley, R.N. and Caten, C.E., *Mol. Gen. Genet.*, 1993, vol. 237, no. 1–2, pp. 58–64.
- Goldman, G.H., Temmerman, W., Jacobs, D., Contreras, R., Montagu, M.V., and Estrella, A.H., *Mol. Gen. Genet.*, 1993, vol. 240, no. 1, pp. 73–80.
- Yan, K. and Dickman, M.B., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, no. 8, pp. 3053–3056.
- Jung, M.K. and Oakley, B.R., *Cell. Motil. Cytoskel.*, 1990, vol. 17, no. 2, pp. 87–94.
- Gafur, A., Tanaka, C., Shimizu, K., Ouchi, S., and Tsuda, M., *Mycoscience*, 1998, vol. 39, no. 2, pp. 155–159.
- Orbach, M.J., Porro, E.B., and Yanofsky, C., *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, no. 7, pp. 2452–2461.
- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P., and Pratella, G.C., *Plant Pathol.*, 2003, vol. 52, no. 3, pp. 362–370.
- Li, J., Katiyar, S.K., and Edlind, T.D. *FEBS. Lett.*, 1996, vol. 385, no. 1–2, pp. 7–10.
- Luck, J.E. and M.R. Gillings, *Mycol. Res.*, 1995, vol. 99, no. 12, pp. 1483–1488.
- Koenraadt, H., Somerville, S.C., and Jones, A.L., *Phytopathol.*, 1992, vol. 82, pp. 1348–1354.
- Albertini, C., Gredt, M., and Leroux, P., *Pesticide Biochem. Physiol.*, 1999, vol. 64, no. 1, pp. 17–31.
- Fujimura, M., Kamakura, T., Inoue, S., and Yamaguchi, I., *Pesticide Biochem. Physiol.*, 1992, vol. 44, no. 3, pp. 165–167.
- Buhr, T.L. and Dickman, M.B., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, no. 11, pp. 4155–4159.
- Yarden, O. and Katan, T., *Phytopathol.*, 1993, vol. 83, no. 12, pp. 1478–1483.
- Ma, Z.H. and Michailides, T.J., *Crop. Prot.*, 2005, vol. 24, pp. 853–863.
- Thomas, J.H., Neff, N., and Botstein, D., *Genetics*, 1985, vol. 111, no. 4, pp. 715–734.

УДК 577.158.7

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРОКСИСОМАЛЬНОЙ КАТАЛАЗЫ ИЗ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *Hansenula polymorpha*

© 2013 г. Я.-С. Тянь, Х. Сюй, Дж. Сюй, Р.-Х. Пенг, К.-Х. Яо

Биотехнологический научно-исследовательский институт, главная лаборатория сельскохозяйственной генетики и селекции Академии сельскохозяйственных наук, Шанхай, 201106, Китай

e-mail: yaoquanhong_sh@yahoo.com.cn

Поступила в редакцию 24.09.2012 г.

Каталаза расщепляет H_2O_2 в клетках и снижает токсичность перекисных соединений. Ген каталазы *HpCAT1* из метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* за исключением части, кодирующей сигнальный пептид, был клонирован в экспрессирующий вектор pYM3165 и методом электропорации встроен в геном *Pichia pastoris* GS115. В результате анализа активности фермента и электрофореза в ПААГ с Na-ДДС было показано, что рекомбинантный белок (*HpCAT1*) из *H. polymorpha* экспрессировался в *P. pastoris*. Внеклеточную каталазу *P. pastoris* GS115 выделяли из супернатанта культуры, осаждали высаливанием $(NH_4)_2SO_4$ и проводили аффинную хроматографию на Ni-NTA. Исследованы основные биохимические свойства рекомбинантного белка *HpCAT1*, температурный и pH-оптимумы, термостабильность, pH-стабильность, а также чувствительность к ионам металлов и химическим веществам. При использовании H_2O_2 в качестве субстрата *HpCAT1* оптимальные значения pH и температуры были ~2.6 и 45°C, соответственно. Активность рекомбинантного белка ингибировалась в присутствии 1.0 mM Hg^{2+} и Cu^{2+} и возрастала в присутствии 1 mM Fe^{2+} .

DOI: 10.7868/S0555109913050140

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – один из самых распространенных антиоксидантных ферментов, катализирующих расщепление H_2O_2 на воду и кислород, препятствующих образованию высокотоксичных соединений ^-OH и O_2^- – побочных продукты метаболизма кислорода [1]. Активность каталазы обнаруживается почти у всех видов аэробных и анаэробных организмов. В дополнение к своей биологической функции, каталазы находят применение в фармацевтической [2], пищевой, текстильной и целлюлознобумажной промышленности, а также используются при биоремедиации окружающей среды [3–5]. Возможность биологического и промышленного использования этого фермента привлекает внимание к этому ферменту как биохимиков, так и молекулярных биологов. Были выделены и исследованы многие гены, кодирующие каталазу у животных [6], растений [7] и микроорганизмов [8]. Совсем недавно, необычные биохимические свойства, которые могут быть использованы, привлекли внимание исследователей к изучению каталазы из микроорганизмов, живущих в экстремальных условиях, например при высоких или низких температурах [9, 10], в окисляющих условиях [11, 12], при высокой концентрации солей [13, 14], радиоактивности [15] или в щелочных/кислотных средах обитания [16, 17].

Проведенные исследования показали, что мутанты термостойких метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с отсутствующей пероксисомальной каталазой (*HpCAT1*), не растут в условиях, когда метанол является единственным источником углерода и энергии [18], то есть этот белок индуцируется при выращивании *H. polymorpha* на метаноле и он необходим для метаболизма субстрата.

Впервые каталаза была выделена из внеклеточного экстракта *H. polymorpha* в 1975 г. Однако тогда были исследованы только пероксидазные свойства этого белка [19]. Полная процедура очистки нативного *HpCAT1* и его свойства были исследованы в 1991 г. в работе [20]. В 1992 г. *HpCAT1* ген был клонирован, выявлена сигнальная последовательность этого фермента [21]. Локализация каталазы в клетках была изучена в том же году [22]. Тем не менее, низкий выход при очистке гомогенного белка *HpCAT1* и его нестабильность препятствовали дальнейшему анализу фермента и применению его в промышленности [20]. Наше исследование каталазы *H. polymorpha* – первый шаг к получению гетерологичной рекомбинантной каталазы, которую можно использовать в некоторых отраслях промышленности.

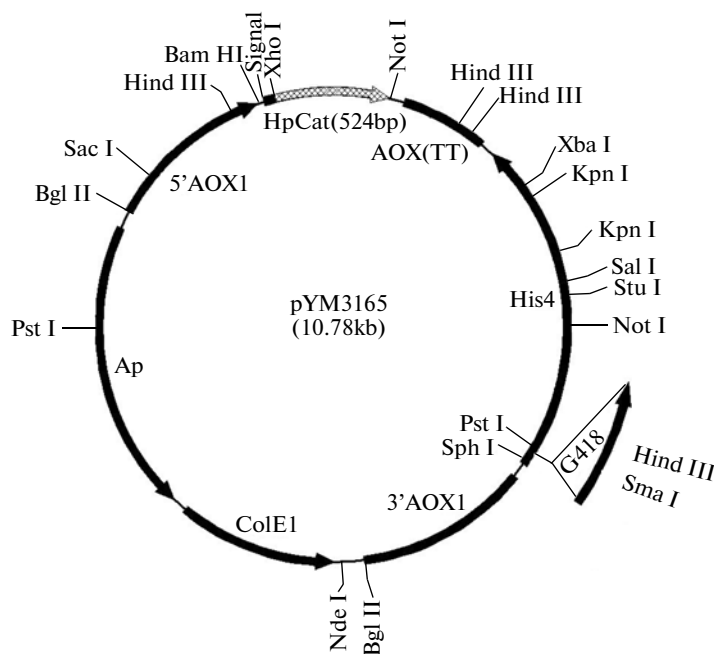


Рис. 1. Схема вектора pYM3165 для экспрессии каталазы в *P. pastoris* GS115.

Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*, способные расти в условиях, когда метанол является единственным источником углерода, могут быть использованы в качестве весьма успешной системы для экспрессии гетерогенных рекомбинантных белков [23, 24]. Открытые рамки считывания белка находятся под контролем промотора алкоголь оксидазы, и, таким образом, высокие внутриклеточные концентрации белка можно индуцировать добавлением метанола к *P. pastoris* [25, 26]. Кроме того эта гетерогенная система экспрессии позволяет проводить генетические манипуляции с геном каталазы.

В настоящее время подробных энзимологических исследований рекомбинантного белка HpCAT1 не проводилось, в отличие от хорошо изученного нативного белка HpCAT1.

Цель работы – сравнение биохимических свойств нативной и рекомбинантной каталазы из *H. polymorpha*. Ген каталазы *HpCAT1* был клонирован и лигирован в экспрессирующий вектор с высокой степенью секрецией *P. pastoris* GS115. Рекомбинантный белок был экспрессирован в форме His-tag белка.

МЕТОДИКА

Микробные штаммы, плазмиды и реагенты. Бактериальный штамм *Escherichia coli* JM109, использованный для создания вектора, получен у “Promega” (США). Штамм *H. polymorpha* с высокой каталазной активностью ATCC № 26012 хра-

нился в Центральной лаборатории Биотехнологического научно-исследовательский института (Шанхай). Вектор клонирования pGEM-T, Pfu Taq ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы T4, и рестриктазы приобретены в “TaKaLa” (Китай). Штамм *P. pastoris* GS115 (*his4*) и плаزمида pPIC9K получены на фирме “Invitrogen” (США). Кассета G418 была заказана у фирмы “Sigma” (США). Все остальные реагенты были аналитической чистоты.

ПЦР-амплификация и секвенирование гена каталазы. Используя геномную ДНК *H. polymorpha* в качестве матрицы, 2 внешних праймера (праймер 1: 5'CTCGAGAAAAGATCCAACCCACCTGTTTTCAC TAC3 и праймер 2: 5'AGCGGCCGCTTAGATCT-TGGATGGAGAAGAAGCCTTTCTCTTAA-GCT-CCTG3') были сконструированы таким образом, чтобы скопировать полный ген каталазы (GenBank номер: X56501.1) без последовательности, кодирующей сигнальный пептид. Сайты рестрикции *Xho* I and *Not* были включены в праймеры 1 и 2 соответственно. 6*His-tag – модификация была включена в С-конец каталазы. ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси с использованием *Pfu*-полимеразы при следующих условиях: начальная денатурация 5 мин при 95°C, затем 30 циклов: 30 с при 95°C, 60 с при 54°C, и 1 мин при 72°C, а затем заключительная элонгация в течение 10 мин при 72°C. Амплифицированный продукт был клонирован в вектор pGEM-T и проверен с помощью секвенирования ДНК.

Конструкция вектора, трансформация и скрининг. Экспрессионный вектор рУМ3165 был сконструирован в *P. pastoris* GS115 (рис. 1) введением гена каталазы в модифицированную плазмиду рPIC9K, в которой сайт рестрикции *Xho* I в касете G418 был удален с помощью сайт-направленного мутагенеза. Плазида рУМ3165 (2 мкг) была линейаризована расщеплением с помощью *Sal* I и затем трансформирована в компетентные клетки *P. pastoris* методом электропорации с использованием “Bio-Rad genepulser” (США) при 1750 Вт в кювете 0.2 см. Сразу после электропорации в кювету был добавлен 1.0 мл раствора ледяного 1.0 М сорбитола. Клетки высевали в чашки с селективной средой, содержащей 1.34% азотно-дрожжевой агара (YNB) без аминокислот (0.8 М сорбитол, 5% глюкозы и 2% агара). Клетки инкубировали при 28°C в течение 3 сут. Трансформанты, которые выросли на чашках были перенесены и рассеяны штрихами на чашках со средой MM (%: YNB – 1.34, биотин – 0.000004, глюкоза – 2.0, агар – 2.0) и средой MD (%: YNB – 1.34, биотин – 0.000004, метанол – 0.5, агар – 2.0). После инкубации при 28°C в течение 2 сут, были отобраны колонии, которые выросли на среде MD, но полностью отсутствовали на среде MM.

Экспрессия и выделение белка. Один из отобранных клонов инкубировали в среде VMGY, содержащей (%): дрожжевой экстракт – 1.0, пептон – 2.0, YNB – 1.34, биотин – 0.000004, глицерин – 1.0; при 28°C в течение 48 ч при постоянном встряхивании (220 об./мин). Затем клетки отделяли центрифугированием при 3000 g 3 мин, два раза промывали стерильной водой и ресуспендировали в среде, содержащей (%): дрожжевой экстракт – 1.0, пептон – 2.0, YNB – 1.34, биотин – 0.000004, метанол – 0.5 (ВММУ) и инкубировали в течение 3 сут при 28°C для биосинтеза каталазы. В супернатант (1.0 л) культуры добавляли сульфат аммония до 80% насыщения для осаждения рекомбинантного белка. Полученный осадок ресуспендировали в 15 мл среды ВММУ, приготовленной без добавления 0.5% метанола, и обессоливали на колонке с сефадексом G-15. Колонка Ni-NTA для аффинной хроматографии из комплекта HisTrap HP (“Amersham Biosciences”, США) была перед экспериментом промыта 5 мл дистиллированной воды, затем через колонку пропускали 5 мл буфера для нанесения (20 mM фосфатный буфер, 500 mM NaCl, 20 mM имидазол, pH 7.4–7.6). После этого через колонку было пропущено 5 мл буфера для промывания (20 mM фосфатный буфера, 500 mM NaCl и 500 mM имидазол, pH 7.4–7.6) и колонку уравнивали 5 мл буфера для нанесения. Раствор фермента (15 мл) наносили на колонку с помощью шприца, промывали буфером для связыва-

ния (10 мл), после чего белок смывали буфером для элюирования (4 мл) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные после элюирования фракции собирали и тестировали методом электрофореза в ПААГ с Na-ДДС.

Анализ белка и степени гликозилирования. Белки из экстракта *P. pastoris* анализировали методом электрофореза в ПААГ с Na-ДДС с использованием 12%-ного разделяющего геля в системе mini-protein гель-электрофореза (“Bio-Rad”, США). Разделенные полосы белка окрашивали 0.2%-ным раствором кумасси бриллиантовым синим R-250.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд с использованием бычьего сывороточного альбумина для построения калибровочной кривой [27]. Дегликозилирование рекомбинантной каталазы было проведено с использованием комплекта N-glycosidase F Deglycosylation Kit (“Roche”, Германия) в соответствии с инструкцией изготовителя. После проведения дегликозилирования полученную каталазу анализировали методом электрофореза в ПААГ с Na-ДДС.

Определение активности каталазы. Активность каталазы измеряли спектрофотометрически, регистрируя снижение OD₂₄₀, в результате расщепления H₂O₂ на спектрофотометре Tecan i-control (Швейцария). Коэффициент экстинкции ε для H₂O₂ при 240 нм был принят 43.6 M⁻¹ cm⁻¹. Реакционная смесь для стандартного анализа содержала 1.98 mM H₂O₂ в фосфатно-цитратном буфере МакИльвана (100 mM лимонная кислота, Na₂HPO₄, pH 2.6). Анализируемые смеси инкубировали при 30°C в течение 10 мин после инициации реакции добавлением 50 мкл очищенного фермента. За единицу активности фермента принимали количество мкмоль H₂O₂, превращенных за 1 мин.

Исследование свойств рекомбинантного белка. Влияние температуры и pH на активность фермента, термостабильность, pH-стабильность, влияние H₂O₂, а также ионов металлов и других химических веществ на активность каталазы определяли по методике, описанной ранее [30] с небольшими модификациями.

Оптимальную для проявления активности температуру исследовали в интервале 30–80°C с шагом 5°C. Исследование термостабильности было проведено путем инкубации аликвот фермента в фосфатно-цитратном буфере (pH 2.6) при 40, 50 и 60°C. Пробы фермента отбирали в разное время, активность фермента определяли в реакции с H₂O₂ по методике, описанной выше. Влияние pH на активность каталазы исследовали в фосфатно-цитратном буфере в диапазоне pH от 2.2 до 3.4. pH-ста-

Очистка секретируемой рекомбинантной каталазы *P. pastoris* GS115

Стадия очистки	Объем, мл	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг	Выход, %	Степень очистки
Супернатант	1000	255.81	102508	401	100	1.0
Осаждение (NH ₄) ₂ SO ₄	15	0.93	6108	6568	6.0	16.4
Ni-NTA аффинная хроматография	4	0.22	5343	24287	5.2	60.6

бильность фермента определяли, регистрируя расщепление H₂O₂ в буферном растворе (при pH 2.6) после предварительной инкубации исследуемой аликвоты каталазы при различных pH и 4°C в течение 24 ч.

Влияние ионов металлов. Фермент выдерживали в 50 mM ЭДТА в течение 30 мин при 4°C перед нанесением на колонку с сефадексом G-15. Фермент, элюированный с колонки, тестировали в буфере (pH 2.6), содержащем 1.98 mM H₂O₂ в присутствии или отсутствии ионов металлов (CrCl₃, MnSO₄, FeSO₄, CaCl₂, Pb(NO₃)₂, MgSO₄, HgCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, Cd(NO₃)₂, FeCl₃, CoCl₃, AlCl₃, и KCl) в концентрации 1.0 mM.

Воздействие химических веществ на фермент исследовали, используя H₂O₂ как субстрат в буфере, в состав которого входили исследуемые химические реагенты. Так, например, использовали буфер с содержанием 1.0 mM органических растворителей (95% этанол-хлороформ в соотношении 5 : 3), 0.01 mM NH₂OH, 0.01 mM NaN₃, или 0.01 mM KCN, 10% Na-ДДС или 10 mM ЭДТА. Соответствующие константы Михаэлиса-Ментен для H₂O₂ были определены методом Лайнувера-Берка. Скорость реакции измеряли в буферном растворе (pH 2.6) при 45°C в течение 10 мин с использованием диапазонов концентрации субстрата 0–0.7 mM с 6 повторностями для каждого измерения. Все эксперименты ставились в 6 повторностях, для каждого рассчитывали стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование гена каталазы и конструкция экспрессирующего вектора. Часть ДНК, соответствующая гену *HpCAT1* без части последовательности, соответствующей сигнальному пептиду, была амплифицирована с помощью ПЦР и клонирована в вектор pGEM-T. Три колонии, содержащие рекомбинантную ДНК, были выбраны случайным

образом и проведено секвенирование их ДНК. ДНК с выверенной последовательностью лигировали в реконструированный экспрессионный вектор (рис. 1), в котором сайт *Xho* I в кассете G418 был удален с помощью сайт-направленного мутагенеза после проведения рестрикции по сайтам *Xho* I и *Not* I. Последовательность сигнального пептида *HpCAT1* была клонирована в этот же вектор так, чтобы последовательность находилась под контролем промотора AOX1.

Экспрессия и очистка каталазы. После секвенирования ДНК рекомбинантный вектор был обозначен как pYM3165 и был трансформирован в штамм *P. pastoris* GS115 методом электропорации. После 3-суточного выращивания было получено около 500 клонов, из которых несколько было отобрано для индукции каталазы. Присутствие *HpCAT1* последовательности в геномной ДНК, выделенной из трансформантов *P. pastoris*, было подтверждено с помощью ПЦР. Супернатант культуры одного из клонов обладал высокой каталазной активностью. Этот клон был выбран для дальнейших исследований. Стадии очистки ре-

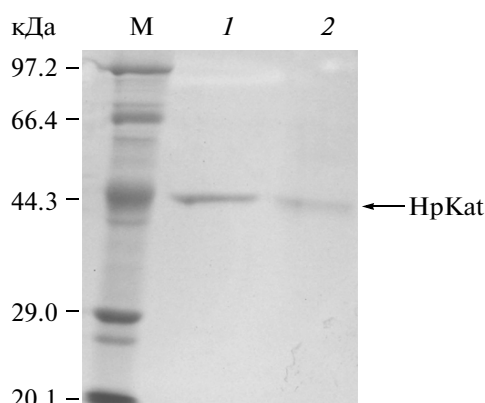


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ с Na-ДДС рекомбинантной каталазы, выделенной *P. pastoris* GS115. М – молекулярные маркеры; 1 – очищенная каталаза; 2 – дегликозилированная каталаза.

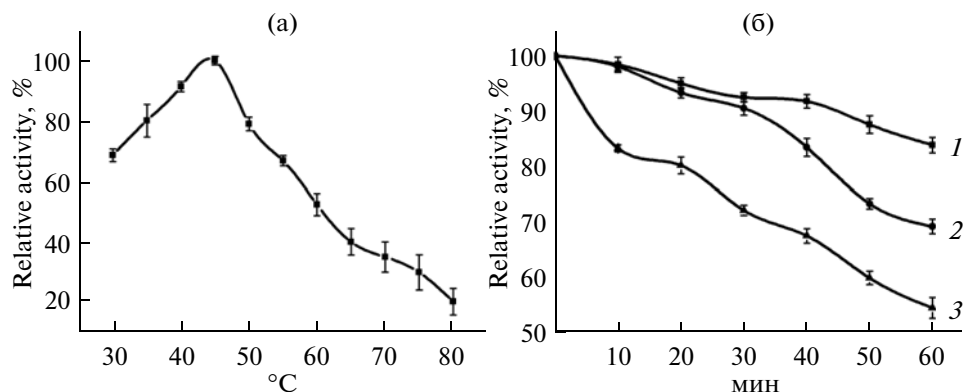


Рис. 3. Влияние температуры на активность рекомбинантной каталазы *P. pastoris* GS115. а – температурный оптимум, б – термостабильность. 1 – 40°C, 2 – 50°C, 3 – 60°C. Здесь и на рис. 4–6 значение активности представлено средними значениями 6 отдельных измерений со стандартным отклонением.

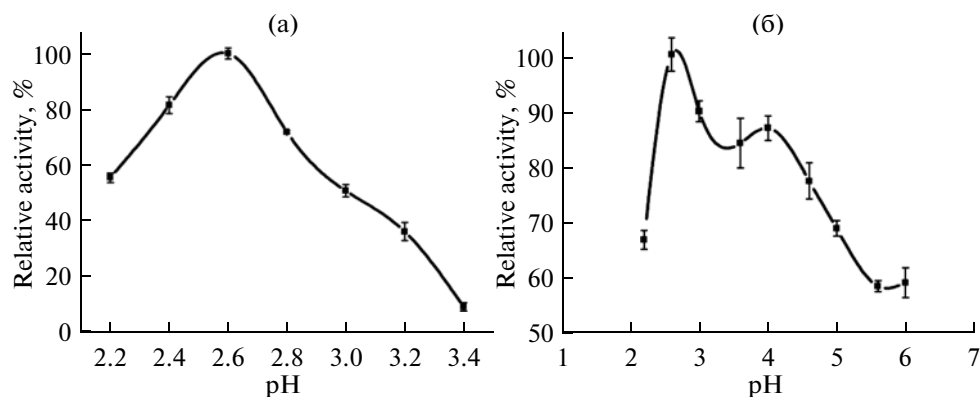


Рис. 4. Влияние pH на активность рекомбинантной каталазы *P. pastoris* GS115. а – pH-оптимум, б – pH-стабильность.

комбинантной каталазы из супернатанта культуры *P. pastoris* GS115 приведены в таблице. Рекомбинантный белок осаждали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, полученный осадок обессоливали на колонке с сефадексом G-15, после чего активные фракции наносили на колонку Ni-NTA для проведения аффинной хроматографии. Результат очистки – 60-кратная очистка препарата каталазы, выход составил 5.2%. Очищенный фермент обладал высокой удельной активностью около 25000 ед./мг при использовании H_2O_2 в качестве субстрата. Молекулярная масса негликозилированной каталазы HrcAT1 была определена с помощью ПААГ с Na-ДДС, окрашивание проводили кумасси бриллиантовом синим R-250. Молекулярная масса каталазы составила ~46 кДа. После обработки фермента эндогликозидазой Н в геле (рис. 2, вторая дорожка) была обнаружена полоса, соответствующая белку меньшего размера (45 кДа), что позволяет отнести HrcAT1 к гликопротеинам с 3.7% гликозилирова-

ния. Согласно анализу сервера NetNGlyc 1.0 каталаза имеет 1 N-гликозилированный сайт в последовательности (позиция Asn95). Этот расчет подтвердился, однако степень гликозилирования HrcAT1 оказалась незначительной.

Термочувствительность и термостабильность рекомбинантной каталазы. Были исследованы биохимические свойства очищенной каталазы. Активность каталазы была максимальной при 45°C (рис. 3а), фермент, нагретый до температуры 40°C сохранял в течение 1 ч ~90% своей активности. При повышении температуры до 60°C сохранялось более 50% активности фермента (рис. 3б).

Влияние pH на активность и стабильности рекомбинантной каталазы. Зависимость активности каталазы от pH была изучена в широком диапазоне pH от 2.2 до 10.2 (данные не представлены). Остаточная активность наблюдалась в узком диапазоне pH от 2.2 до 3.4 (рис. 4а) и не обнаруживалась при pH выше 4.0. После инкубации фермен-

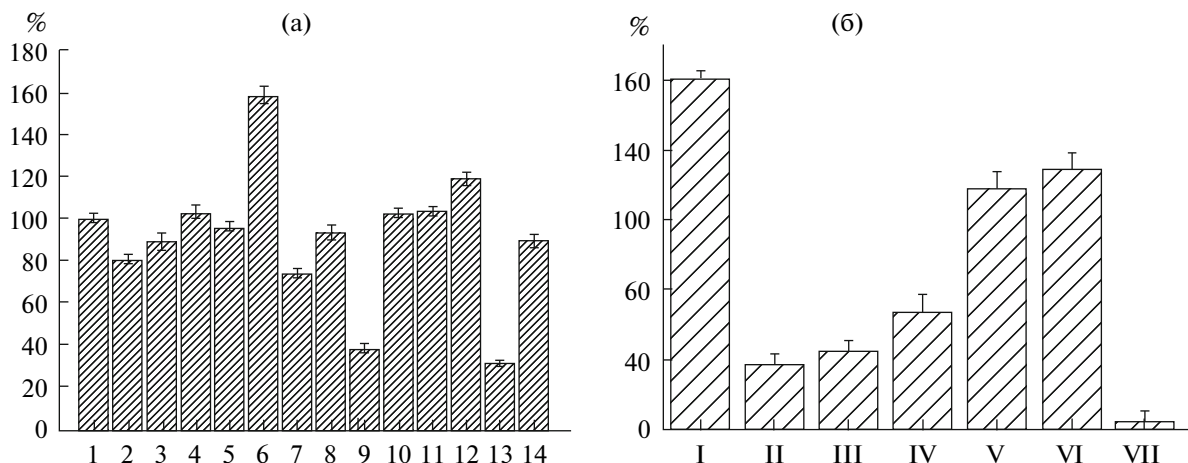


Рис. 5. Действие ионов металлов (а) и других веществ (б) на активность каталазы *P. pastoris* GS115. 1 – контроль, 2 – Cd^{2+} , 3 – Cr^{2+} , 4 – Ca^{2+} , 5 – Zn^{2+} , 6 – Fe^{2+} , 7 – Fe^{3+} , 8 – Mg^{2+} , 9 – Hg^{2+} , 10 – Al^{3+} , 11 – Mn^{2+} , 12 – Pb^{2+} , 13 – Cu^{2+} , 14 – K^{+} , I – контроль; II – EDTA; III – 10% Na-ДДС; IV – органические растворители, V – NH_2OH ; VI – NaN_3 , VII – KCN.

та в буферном растворе при различных рН в диапазоне от 2.2 до 10.2 при 4°С в течение 24 ч наблюдалась его значительная инактивация в щелочной среде и даже после инкубации фермента при рН 6.0 сохранялось только 60% активности (рис. 4б).

Влияние ионов металлов и химических веществ на активность рекомбинантной каталазы. Присутствие 1.0 мМ Hg^{2+} и Cu^{2+} в значительной степени ингибировало каталитическую активность рекомбинантной каталазы на 62 и 64% соответственно. Интересно, что активность фермента увеличивалась на ~60% в растворе 1 мМ Fe^{2+} (рис. 5а). Воздействие ЭДТА (50 мМ) и 10%-ного Na-ДДС приводило к снижению активности фермента на 81 и 78% соответственно. Воздействие 0.01 мМ NH_2OH или 0.1 мМ NaN_3 ингибировало активность фермента на 25 и 27% соответственно, однако наиболее сильное ингибирование наблюдалось в присутствии 0.01 мМ KCN, вызывающего падение активности фермента до 2% (рис. 5б). Как известно, многие белки теряют активность в присутствии органических растворителей. Выделенную каталазу инкубировали с органическими растворителями в соотношении каталаза-95%–этанол–хлороформ 10 : 5 : 3 (об./об.). При воздействии органических растворителей активность фермента уменьшалась на 65% (рис. 5б).

Влияние концентрации H_2O_2 на кинетику и активность рекомбинантной каталазы. Выделенная каталаза при использовании H_2O_2 в качестве субстрата была крайне нестабильной. При достижении концентрации H_2O_2 20 мМ наблюда-

лась инактивация фермента (рис. 6). Зависимость скорости расщепления H_2O_2 НрСАТ1 от концентрации субстрата при рН 2.6 и 45°С подчинялась кинетике Михаэлиса-Ментен. График, построенный в обратных координатах, позволил определить, что значение кажущейся K_M 0.95 мМ, а $V_{\text{макс}}$ ~25 000 ед./мг белка.

В настоящее время проведен ряд исследований каталазы из *H. polymorpha* [20–22, 28–30]. НрСАТ1 впервые была выделена из отделенного от клеток экстракта *H. polymorpha* с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе [30]. В присутствии H_2O_2 фермент был способен окислять метанол, формальдегид и формиат. В 1991 г. было показано что НрСАТ1 участвует в метаболизме метанола, однако его присутствие необязательно

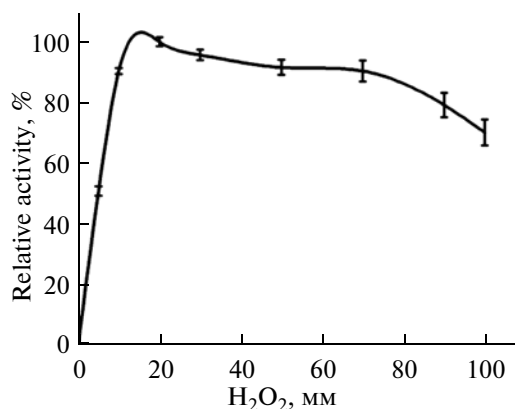


Рис. 6. Влияние концентрации H_2O_2 на активность каталазы *P. pastoris* GS115.

для метаболизма углеродных субстратов с большим количеством углеродных атомов [28]. Была выделена нативная каталаза из *H. polymorpha*, исследованы некоторые ее свойства [20]. Последовательность ДНК *HpCAT1* впервые клонировали и секвенировали в 1992 г. [21, 22]. В 1998 г. было показано, что мутант *H. polymorpha*, не имеющий пероксисомальной каталазы, не способен расти на метаноле в качестве единственного источника углерода и энергии [29]. Этот результат показал, что *HpCAT1* играет ключевую роль в метаболизме *H. polymorpha*.

Проведенное ранее выделение нативной *HpCAT1* показало, что очистка этого белка требует строгого соблюдения определенных условий, поскольку нестабильность фермента ограничивала дальнейший анализ его биохимических свойств [20]. Рекombинантный белок *HpCAT1*, выделенный из *P. pastoris* GS115, был значительно стабильнее и количество белка было достаточным для исследования его свойств. Настоящая работа — это первая публикация, посвященная ферментативным свойствам рекombинантного секретиремого белка *HpCAT1*. Обнаружено несколько уникальных особенностей рекombинантного фермента.

В присутствии H_2O_2 в качестве субстрата активность нативного белка *HpCAT1* тестировали при низких температурах из-за его нестабильности. Рекombинантный белок *HpCAT1* был более стабильным, имел температурный оптимум $45^\circ C$, был относительно стабильным при высокой температуре, после инкубации при $60^\circ C$ в течение 1 ч сохранялось более 50% активности. Для каталаз из других видов температурный оптимум обычно наблюдается в интервале $40–60^\circ C$ [10]. Было показано, что активность каталазы термофиллов может в значительной степени зависеть от температуры и при этом фермент может обладать значительной термостабильностью. Температурный оптимум фермента из гипертермофильных архей *Archaeoglobus fulgidus* достигал $70^\circ C$ [30]. Стабильность каталаз, в особенности термостабильность, авторы работы [31] объясняют определенной структурой фермента. Нативный белок *HpCAT1* имел pH-оптимум в широком диапазоне pH 5.8–8.5, в то время как рекombинантная каталаза имела высокую активность в узком интервале pH 2.2–3.0. Приведенные результаты согласуются с данными, полученными для фототрофных бактерий *Rhodospseudomonas capsulata*, имеющих также более узкий диапазон оптимальных значений pH для действия фермента 6.0–6.5 [32]. Однако, узкий pH-оптимум и низкая pH-стабильность рекombинантного белка *HpCAT1* препятствуют его промышленному внедрению. Такие свойства не

характерны для монофункциональных каталаз, которые как правило имеют широкий оптимум pH и термостабильности [14, 33]. Тем не менее, свойства фермента могут быть улучшены *in vitro*, если использовать стратегию направленной эволюции, предусматривающей перестановки в ДНК. Такой подход был ранее использован в нашей лаборатории для увеличения термостабильности β -глюкуронидазы [34]. Интересно, что рекombинантная каталаза из *H. polymorpha* обладала значительной термостабильностью, однако ее активность в значительной степени зависела от температуры. Причины этого явления могут быть связаны с необходимостью выживания *H. polymorpha* в окружающей среде. В дальнейшем особенности фермента необходимо исследовать с проведением структурно-функционального анализа *HpCAT1*.

Результаты влияния ионов металлов на активность рекombинантного *HpCAT1* из *H. polymorpha* показали, что 1.0 mM Hg^{2+} и Cu^{2+} ингибировали активность белка, в то время как в присутствии 1.0 mM Fe^{2+} активность белка увеличивалась. Для каталазы из *Pseudomonas aeruginosa* было показано, что ионы Fe^{3+} , а не Fe^{2+} значительно увеличивали экспрессию и повышали активность [35]. Влияние KCN на активность рекombинантной каталазы было таким же, как и на нативную каталазу, влияние NaN_3 на активность рекombинантной каталазы было значительно слабее по сравнению с влиянием на активность нативного фермента [20]. Рекombинантная каталаза *H. polymorpha* была более устойчива к действию NaN_3 , по сравнению с нативным ферментом.

Полученный рекombинантный фермент был более чувствителен к воздействию H_2O_2 , по сравнению с исходным белком [20]. Ферменты из бактерий *Micrococcus luteus* и *Vibrio rumoiensis* проявляли максимальную стабильность в присутствии H_2O_2 в концентрациях 80 mM и 70 mM [10] соответственно, а каталазы из *Escherichia coli* и *Rhodobacter capsulata* были способны к расщеплению 2.0 mM H_2O_2 в течение 20–30 мин с сохранением при этом только 50% своей активности [32]. Хотя рекombинантный белок *HpCAT1* из *H. polymorpha* не является самым чувствительным к H_2O_2 , тем не менее это свойство может быть серьезным препятствием для его промышленного внедрения и в значительной степени ограничивает диапазон применения фермента. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения механизмов такой чувствительности к субстрату H_2O_2 .

В заключение следует отметить, что мы провели клонирование и экспрессию *HpCAT1* с использованием экспрессирующей системы *P. pastoris* GS115. Рекombинантная каталаза термостой-

ких дрожжей *H. polymorpha* была более стабильна и обладала лучшими термодинамическими свойствами по сравнению с нативной каталазой. Кроме того, процедура очистки белка была проще и удельная активность рекомбинантной каталазы (24 287 ед./мг) была выше, чем у нативного фермента (215.6 ед./мг). Несмотря на некоторые нежелательные особенности рекомбинантной каталазы, такие как узкий оптимум рН, низкая рН-стабильность и высокая чувствительность к H_2O_2 , они могут быть улучшены путем генетических манипуляций, так как каталаза из *H. polymorpha* — эффективный фермент, который, по-видимому, определяет способность организма к выживанию. Фермент несомненно представляет интерес для фармацевтической промышленности и других отраслей.

Работа выполнена при поддержке фонда “Ключевые проекты Шанхайского городского комитета сельского хозяйства” (№ 2009-6-4, № 2011-1-8) и Международного фонда научно-технического сотрудничества (2010DFA62320, 11230705900); Государственного фонда естественных наук (31071486) Китая.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chelikani P., Ramana T., Radhakrishnan T.M. // *Ind. J. Clin. Biochem.* 2005. V. 20. № 2. P. 131–135.
- Puig Muset P., Laporte J., Martin J., Valdecasas F.G. // *Med. Clin. (Barc).* 1962. V. 38. P. 199–212.
- Wang R.F., Wennerstrom D., Cao W.W., Khan A.A., Cerniglia C.E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 10. P. 4300–4304.
- Gross J., Scherz B., Wyss S., Kunzel W., Maiwald H.J., Hartwig A., Polster H. // *Kinderarztl. Prax.* 1977. V. 45. № 4. P. 168–175.
- Niebel A., Heungens K., Barthels N., Inze D., Van Montagu M., Gheysen G. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1995. V. 8. № 3. P. 371–378.
- Shi X.L., Feng M.Q., Shi J., Shi Z.H., Zhong J., Zhou P. // *Protein Expr. Purif.* 2007. V. 54. № 1. P. 24–29.
- Lin K.H., Huang H.C., Lin C.Y. // *Plant Cell Rep.* 2010. V. 29. № 6. P. 575–593.
- Potapovich M.V., Eryomin A.N., Artzukevich I.M., Chernikevich I.P., Metelitz D.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2001. V. 66. № 6. P. 646–657.
- Yumoto I.I., Iwata H., Sawabe T., Ueno K., Ichise N., Matsuyama H., Okuyama H., Kawasaki K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. № 1. P. 67–72.
- Yumoto I., Ichihashi D., Iwata H., Istokovics A., Ichise N., Matsuyama H. et al. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 7. P. 1903–1909.
- An H., Zhou H., Huang Y., Wang G., Luan C., Mou J. et al. // *Mol. Biotechnol.* 2010. V. 45. № 2. P. 155–160.
- Nakayama M., Nakajima-Kambe T., Katayama H., Higuchi K., Kawasaki Y., Fuji R. // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 106. № 6. P. 554–558.
- Brown-Peterson N.J., Salin M.L. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. № 13. P. 4197–4202.
- Brown-Peterson N.J., Salin M.L. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 2. P. 378–384.
- Kobayashi I., Tamura T., Sghaier H., Narumi I., Yamaguchi S., Umeda K., Inagaki K. // *J. Biosci. Bioeng.* 2006. V. 101. № 4. P. 315–321.
- Hicks D.B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1229. № 3. P. 347–355.
- Yumoto I., Fukumori Y., Yamanaka T. // *J. Biochem.* 1990. V. 108. № 4. P. 583–587.
- Nakagawa T., Yoshida K., Takeuchi A., Ito T., Fujimura S., Matsufuji Y. et al. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010. V. 74. № 8. P. 1733–1735.
- van Dijken J.P., Otto R., Harder W. // *Arch. Microbiol.* 1975. V. 106. № 3. P. 221–226.
- Sysoev O.V., Gruzman M.B., Ivanov E.V., Trotsenko Y.A. // *Biochemistry (Moscow)*. 1991. V. 56. № 10. P. 1313–1316.
- Didion T., Roggenkamp R. // *FEBS Lett.* 1992. V. 303. № 2–3. P. 113–116.
- Keizer I., Roggenkamp R., Harder W., Veenhuis M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. V. 72. № 1. P. 7–11.
- Macaulay-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. // *Yeast.* 2005. V. 22. № 4. P. 249–270.
- Daly R., Hearn M.T. // *J. Mol. Recognit.* 2005. V. 18. № 2. P. 119–138.
- Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., Li X., Fan H.Q., Guo M.J., Zhang S.L. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2004. V. 37. № 3. P. 282–291.
- Gellissen G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 54. № 6. P. 741–750.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
- Aminova L.R., Kyslikova E., Volfova O., Trotsenko Y.A. // *Folia Microbiol. (Praha)*. 1991. V. 36. № 2. P. 158–163.
- Verduyn C., Giuseppin M.L., Scheffers W.A., van Dijken J.P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V. 54. № 8. P. 2086–2090.
- Kengen S.W., Bikker F.J., Hagen W.R., de Vos W.M., van der Oost J. // *Extremophiles*. 2001. V. 5. № 5. P. 323–332.
- Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. // *Cell Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. № 2. P. 192–208.
- Nadler V., Goldberg I., Hochman A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 882. № 2. P. 234–241.
- Kim H., Lee J.S., Hah Y.C., Roe J.H. // *Microbiology*. 1994. V. 140. № 12. P. 3391–3397.
- Xiong A.S., Peng R.H., Cheng Z.M., Li Y., Liu J.G., Zhuang J. et al. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2007. V. 20. № 7. P. 319–325.
- Frederick J.R., Elkins J.G., Bollinger N., Hassett D.J., McDermott T.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 3. P. 1375–1379.

Heterologous Extracellular Expression and Initial Characterization of the Peroxisomal Catalase from the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha* in *Pichia pastoris*¹

Y.-S. Tian, H. Xu, J. Xu, R.-H. Peng, and Q.-H. Yao

Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Biotechnological Research Institute,
Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

e-mail: yaoquanhong_sh@yahoo.com.cn

Received September 24, 2012

Abstract—Catalase is well known to eliminate H₂O₂ in cells and reduces the toxicity of peroxide compounds. A catalase gene *HpCat1* of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* without the part coding the native signal peptide was cloned into expression vector pYM3165 and then integrated into genome of *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The result of the enzyme activity assay and SDS-PAGE demonstrated that the recombinant protein (HpCAT1) of *H. polymorpha* was extracellularly expressed in *P. pastoris*. The expressed catalase was recovered from the culture supernatant of *P. pastoris* GS115 and purified by (NH₄)₂SO₄ fractionation and Ni-NTA affinity chromatography. The main biochemical properties of the recombinant protein HpCAT1, such as thermostability and thermostability, pH optimum and pH stability, as well as the effect of metal ions and chemicals, were characterized. With H₂O₂ as the substrate, HpCAT1 displayed pH and temperature optima of ~2.6 and 45°C, respectively. The recombinant HpCAT1 activity was inhibited by 1 mM Hg²⁺ and Cu²⁺, but was highly enhanced by 1.0 mM Fe²⁺.

УДК 577.152.34.042

СЕКРЕЦИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ТРЕМЯ ФИТОПАТОГЕННЫМИ МИКРООГАНИЗМАМИ

© 2013 г. Н. Н. Кудрявцева, А. В. Софьин, Т. А. Ревина, Е. Л. Гвоздева,
Е. В. Иевлева, Т. А. Валужева

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва 119071,

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 20.02.2013 г.

Изучены сериновые протеиназы, продуцируемые тремя фитопатогенными микроорганизмами, принадлежащими к различным семействам грибов и поражающими растения картофеля. Показано, что оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и грибы *Rhizoctonia solani* и *Fusarium culmorum* секретируют сериновые протеиназы. Анализ субстратной специфичности и чувствительности к действию синтетических и белковых ингибиторов позволил отнести их к трипсино- и субтилизиноподобным ферментам. Соотношение трипсиноподобных и субтилизиноподобных протеиназ зависело от состава культуральной среды, особенно от формы азотного питания. Филогенетический анализ показал, что, в отличие от базидиомицета *R. solani*, аскомицет *F. culmorum* и оомицет *P. infestans* продуцируют сходные по составу экзопротеиназы, несмотря на то что они являются более дальними родственниками. Это указывает на то, что секреция сериновых протеиназ различными фитопатогенными микроорганизмами зависит не только от условий окружающей среды, но и их филогенетического положения. Полученные данные позволяют предположить, что экзопротеиназы фитопатогенных грибов играют различную роль в патогенезе. С одной стороны, они могут способствовать адаптации гриба при увеличении диапазона растений-хозяев, а с другой — выполнять различные функции при его выживании в экологических местах обитания вне растения-хозяина.

DOI: 10.7868/S0555109913050073

Фитопатогенные грибы и оомицеты являются возбудителями многих самых разрушительных болезней растений, которые приводят каждый год к очень значительным потерям урожая во всем мире. В настоящее время описано примерно 100000 видов грибов и оомицетов, но только очень малая часть из них является патогенной [1]. Тем не менее филогенетические исследования показали, что болезнетворные патогены не обязательно тесно связаны друг с другом. На самом деле они распространены во всех таксономических группах грибов, часто показывая тесную эволюционную связь с непатогенными видами [2]. Весьма вероятно, что фитопатогенность изменялась много раз в течение эволюции грибов и оомицетов [2]. В последние годы проводятся интенсивные исследования генов, ответственных за патогенность микроорганизма и его внедрение в растение [3], которые отсутствуют у сапрофитов. Так, гены, которые необходимы для успешного завершения жизненного цикла патогенов, но не обязательны для роста сапрофитов, рассматриваются как патогенные факторы [3].

Было показано, что, несмотря на различное происхождение и разные положения на филогенетическом дереве истинных грибов и оомицетов [4], они секретируют ряд белков, известных как эффекторы, которые важны для инфицирования

растения-хозяина [2]. Эти белки могут блокировать защитную систему растения и повреждать его клеточные стенки, обеспечивая вторжение патогена. Они включают в себя ряд секретируемых протеиназ, транскрипционные факторы и компоненты каскада передачи сигналов. Экзопротеиназы, продуцируемые мицелием грибов, могут осуществлять как снабжение патогена питанием, так и играть специфическую роль в клеточном метаболизме. Гены, кодирующие протеиназы и пептидазы, обнаружены в геномах ряда фитопатогенов. Они могут определять патогенность или вирулентность микроорганизма [3].

Все известные протеиназы в соответствии с природой функциональных групп в активном центре распределены на шесть основных классов: сериновые, цистеиновые, треониновые, аспаргатные, глутаматные и металлопептидазы. Экстрацеллюлярные протеолитические ферменты грибов представлены в основном сериновыми пептидазами, которые включают семейство химотрипсина (S1) и субтилизина (S8) [5]. Семейство S1 включает химотрипсины из подсемейства S1A, которые распространены в основном у животных и реже в грибах, и трипсины, большинство из которых найдены у грибов. В ряде исследований было показано, что для патогенов растений характерна секреция трипсиноподобных ферментов, в то время как сапро-

фиты продуцируют преимущественно субтилизиноподобные ферменты [6–8]. В последствии только у фитопатогенных грибов были обнаружены гены, кодирующие трипсиноподобные протеиназы [9, 10].

Цель работы – сравнительный анализ сериновых протеиназ, продуцируемых мицелием трех патогенных микроорганизмов, которые вызывают заболевания картофеля: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Rhizoctonia solani* Kuhn и *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc.

МЕТОДИКА

В работе использовали оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и грибы *Rhizoctonia solani* Kuhn (AG-3) 153 и *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., которые были любезно предоставлены Национальным практическим центром по картофелеводству и овощеводству Национальной Академии Наук Республики Беларусь. Культуры выращивали на овсяно-агаровой среде с добавлением термостабильных белков картофеля в течение 11–14 сут при комнатной температуре (21°C). Среди ряда культуральных сред были выбраны те, в которых наблюдался максимальный рост микроорганизмов, секретирующих протеолитические ферменты. Выбраны следующие среды: **среда I** содержала на 100 мл KH_2PO_4 (0.15 г), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.025 г), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 мг), тиамин (1 мг), рибофлавин (1 мг) и термостабильные белки из клубней картофеля; **среда II** представляла собой среду I, в которую был добавлен дрожжевой экстракт (1 г).

Микроорганизмы выращивали в колбах Эрленмейера (500 мл), в которые вносили по 150 мл культуральной среды. В среду вводили 15 мл суспензии каждой культуры. *P. infestans* было 2×10^5 зооспор/мл, *F. culmorum* – 2×10^5 макроконидий/мл и *R. solani* – 15 мл мицелия. После 12 сут роста мицелий собирали на фильтровальную бумагу ватман № 41, промывали небольшим количеством теплой дистиллированной воды, нагревали в течение ночи в духовом шкафу при температуре около 90°C, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. После более длительного периода сушки не наблюдали дополнительной потери веса. Фильтрат, полученный после сбора мицелия, использовали для анализа секретируемых ферментов.

Белки из фильтрата после 12 сут роста микроорганизмов осаждали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80% насыщения). Осадок отделяли центрифугированием при 10000 г в течение 30 мин при 4°C, растворяли в минимальном количестве дистиллированной воды, обессоливали гель-хроматографией на Сефадексе G-25 и лиофильно высушивали.

Протеолитическую активность ферментов определяли по методу Кунитца [11], используя в каче-

стве субстратов казеин (1%-ный раствор), гемоглобин (0.5%-ный раствор), а также азоказеин (0.5%-ный раствор) [12]. Время гидролиза азоказеина составляло 30 мин, а казеина и гемоглобина – 1 ч. Активность цистеиновых протеиназ оценивали после инкубации в присутствии 25 мМ L-цистеина и 1 мМ ЭДТА в течение 10 мин в соответствии с модифицированным методом Куница. За одну единицу протеолитической активности (Е) принимали то количество фермента, которое приводит к увеличению оптической плотности на 0.1 при 366 нм (для азоказеина) и 280 нм (для казеина и гемоглобина) в течение 1 мин.

Амидазную активность ферментов определяли по методу Эрлангера и соавт. [13] с использованием синтетических *n*-нитроанилидов: $\text{N}\alpha$ -бензоил-L-аргинина (**БАПА**), N-сукцинил-глицил-глицил-L-фенилаланина (**СукГГФПА**), N-карбобензоксид-L-аланил-L-аланил-L-лейцина (**КбзААЛПА**), лейцина (**ЛПА**) и ацетил-L-аланил-L-аланил-L-аланина (**АцАААПА**). Концентрация субстрата составляла 0.5 мМ. За одну единицу амидазной активности (АЕ) принимали количество фермента, которое расщепляло 1 нмоль субстрата в 1 мин.

Для проведения ингибиторного анализа были использованы следующие ингибиторы протеолитических ферментов: йодацетамид (**ИАА**, 1 мМ), хлорметилкетон тозил-L-лизина (**ХМКТЛ**, 1 мМ), хлорметилкетон тозил-L-фенилаланина (**ХМКТФ**, 1 мМ), диизопротилфторфосфат (**ДИПФФ**, 1 мМ); ЭДТА (4.0 мМ), дитиотриэтол (**ДТТ**, 1 мМ), фенилаланинметансульфонилфторид (**ПМСФ**, 1 мМ), *n*-хлормеркурийбензоат (**ПХМБ**, 0.2 мМ).

Электрофорез в 20%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na (ДДС-ПААГ) и β -меркаптоэтанола проводили по методу Лэммли [14]. Гели окрашивали 0.1%-ным раствором Кумасси R-250 в 20%-ном этаноле, содержащем 5% формальдегида.

ДДС-ПААГ-электрофорез проводили также в присутствии сополимеризованного субстрата (0.1%-ная желатина) по методу Хеуссен и Даудл [15]. На дорожку наносили 0.010–0.015 мг белков, выделенных из культуральной жидкости. После электрофоретического разделения белков гель инкубировали в 2.5%-ном растворе тритона X-100 в течение 2 ч при интенсивном перемешивании для удаления ДДС-Na и восстановления активности ферментов. Реакцию гидролиза желатинины разделенными фракциями осуществляли, инкубируя гель в 0.1 М глицин-HCl буфере, pH 8.3, в течение ночи при комнатной температуре. Затем гель окрашивали 0.1%-ным раствором амидочерного в течение 1 ч и избыток красителя отмывали смесью этанол–уксусная кислота–вода (3 : 1 : 6). Компоненты, обладающие протеолитической активностью, выявлялись как бесцветные зоны на голубом фоне окрашенной желатинины.

Содержание белка определяли по модифицированному методу Брэдфорд, используя в качестве стандарта БСА [16].

Все эксперименты и анализы проводились, по крайней мере, в трех повторностях, и результаты представлены в виде средних значений, полученных с указанием стандартного отклонения.

В работе использовали казеин (НПО “Биолар”, Латвия), азоказеин, гемоглобин, синтетические субстраты и ингибиторы (“Sigma Chemicals Co”, США), сефадекс G-25 и набор низкомолекулярных белков-маркеров (LMW Calibration Kit) фирмы “Pharmacia” (Швеция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов было изучено влияние нескольких факторов (рН среды, концентрация неорганического азота) на секрецию внеклеточных протеиназ фитопатогенами *P. infestans* (Mont.) de Bary, *R. solani*, и *F. culmorum*, которые на филогенетическом дереве, представленном на рис. 1, I, занимают различные ветви. Так, истинные грибы, относящиеся к семействам базидиомицетов (*R. solani*) и аскомицетов (*F. culmorum*), филогенетически далеки от *P. infestans*, который принадлежит к семейству оомицетов (Oomycota) (рис. 1, I). Традиционно, в связи с нитевидными особенностями роста оомицеты были классифицированы в царстве грибов. Тем не менее современные молекулярные и биохимические анализы показывают, что оомицеты таксономически менее сходны с нитчатными грибами, но более тесно связаны с бурями водорослями (heterokonts), относящимися к царству эукариот [17–19].

При росте на полусинтетической культуральной среде, содержащей KH_2PO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , тиамин и рибофлавин, наблюдали низкую секрецию протеиназ всеми указанными микроорганизмами, хотя все они поддерживали довольно хороший рост.

Поскольку изучаемые микроорганизмы являются возбудителями самых разрушительных болезней картофеля, в культуральную среду были добавлены термостабильные белки из клубней картофеля. Это инициировало секрецию протеиназ грибами *R. solani* and *F. culmorum* (рис. 1, IIa и IIIa, кривые 2). Однако в среде выращивания *P. infestans* активность экзопротеиназ оставалась на низком уровне и не изменялась практически в течение всего роста культуры, хотя и наблюдался значительный прирост биомассы (рис. 1, IVa, кривые 1 и 2).

Оказалось, что значение рН культуральной среды изменялось в процессе роста всех трех микроорганизмов от слегка кислого до нейтрального. Постоянное значение рН (7.2–7.4) достигалось после 12 сут инкубации (рис. 1, IIa–IVa, кривые 3).

Способность патогенных грибов поддерживать рН не зависела от состава питательной среды. Следует отметить, что зависимость синтеза и секреции экзопротеиназ от рН среды также была обнаружена у некоторых микроорганизмов [20]. Тем не менее грибы обычно избегают естественной среды обитания с неподходящим значением рН, возможно, из-за метаболических затрат на его коррекцию и не конкурируют с микроорганизмами, более адаптированными к изменениям рН. Наконец, протеолитическая активность фермента, как известно, сильно зависит от рН, поэтому для того чтобы эффективно расщеплять белки, оптимум рН протеиназ в идеале должен соответствовать рН среды обитания микроорганизма. Можно заметить, что значения рН среды влияло на рост биомассы (рис. 1, IIa–IVa, кривые 1).

Добавление в среду KNO_3 приводило к значительному снижению активности экзопротеиназ, что указывало на подавление их секреции и, возможно, синтеза. Поскольку секреция экзоферментов подавляется в присутствии нитратов, имеются основания полагать, что минеральный азот регулирует адаптацию патогена к окружающей среде по механизму, который можно отнести к каталитической репрессии [21].

Для изучения влияния органического азота на секрецию экзопротеиназ патогенов в питательную среду были дополнительно добавлены белки из экстракта дрожжей. При этом для всех микроорганизмов наблюдали заметное увеличение секреции экзопротеиназ, которое сопровождалось ускорением роста их мицелия (рис. 1, IIb–IVb, кривые 1 и 2). Можно предположить, что белки дрожжевого экстракта, являясь дополнительным источником пищевых субстратов для микроорганизмов, по-видимому, действуют также в качестве индуктора [22]. Важно отметить, что оомицет начинал эффективно продуцировать экзоферменты только в присутствии белков дрожжевого экстракта (рис. 1, IVb, кривая 2). Таким образом, можно заключить, что *P. infestans* более нуждается в белках для секреции ферментов, чем для роста.

Оказалось, что секреция протеиназ всеми исследуемыми микроорганизмами зависит от температуры культивирования. Когда культуры росли при 28°C, наблюдалось уменьшение секретиремой протеолитической активности в культуральной среде. При 21°C продукция экзопротеиназ была максимальной. Это, очевидно, соответствовало температурному режиму обитания микроорганизмов в естественной среде. Можно предположить, что температура 21°C оптимальна для исследуемых возбудителей болезней картофеля. Их неспособность расти при более высоких температурах, возможно, отражает распределение в естественной среде обитания, защищающей от действия высоких температур. Действительно, в работе [23] бы-

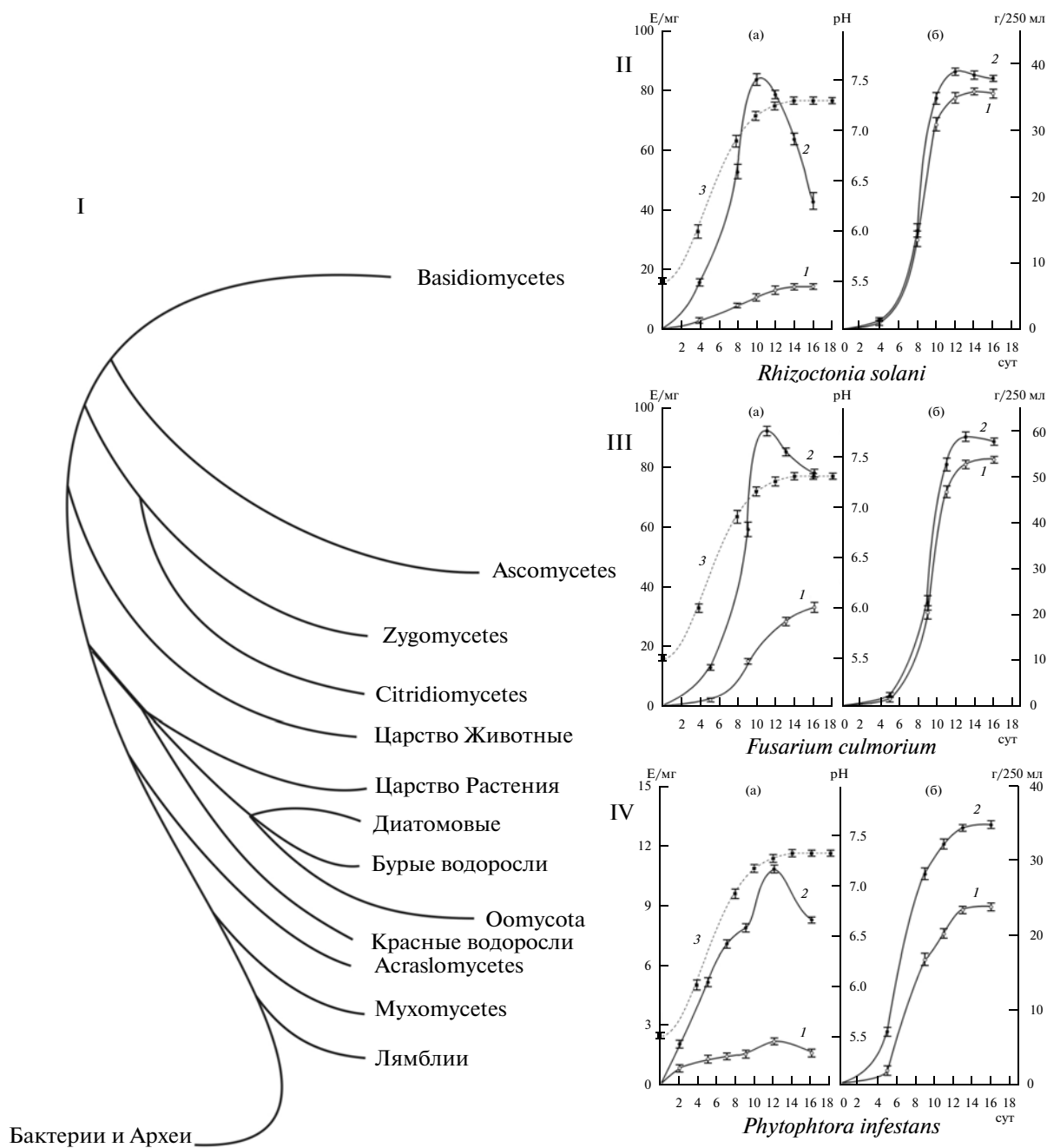


Рис. 1. Филогенетическое дерево грибов [4] (I) и динамика изменения активности экзопротеиназ (а) и влажной биомассы (б) в процессе роста *R. solani* (II), *F. culmorum* (III) и *P. infestans* (IV) в культуральной среде без (1) и при добавлении дрожжевого экстракта (2); изменение pH среды в течение роста микроорганизма (3).

ло показано, что несколько штаммов *Pythium at-trantheridium*, выделенных из мест повреждения корнеплодов моркови, плодов яблок и саженцев вишни, росли при 20–25°C. В то же время рост гриба *Pythium splendens*, вызывающего болезнь корней карамболы (южная Флорида), уменьшался при температуре выше 30°C [24].

Экзоферменты, секретируемые изучаемыми микроорганизмами, проявляли активность при

нейтральных и слабо щелочных значениях pH. Так, экзопротеиназы *F. culmorum* характеризовались максимальной протеолитической активностью при pH 8.0, а *R. solani* – при pH 8.5. Самый высокий уровень активности экзопротеиназ *P. infestans* наблюдался при нейтральных значениях pH и характеризовался максимумом при pH 7.0. Следует отметить, что активность ферментов *P. infestans* увеличивалась в слабо щелочной области

Таблица 1. Влияние синтетических ингибиторов на активность внеклеточных протеиназ, секретируемых *P. infestans*, *F. culmorum* и *R. solani* (концентрация ДИПФФ – 0.2 мМ, ЭДТА – 4.0 мМ и остальных ингибиторов – 1.0 мМ)

Ингибитор	Активность протеиназ <i>P. infestans</i> , %			Активность протеиназ <i>R. solani</i> , %		Активность протеиназ <i>F. culmorum</i> , %		
	Азоказеин, БАПА, Кбз-ААЛПА			Азоказеин, БАПА		Азоказеин, БАПА, Кбз-ААЛПА		
Без реагента	100	100	100	100	100	100	100	100
ДИПФФ	н.о.*	42.0	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
ПМСФ	100	100	0	61.1	96.0	35.0	17.4	78.0
ХМТЛК	н.о.	4.0	95.0	95.0	70.0	84.0	50.0	52.0
ХМТФК	н.о.	52.0	91.0	82.0	84.0	80.0	46.0	100
ЭДТА	20.3	41.0	0	89.0	93.0	112.0	99.0	99.0
ПХМБ	95.1	69.0	100	76.0	95.0	61.0	100	100
ИАА	100	90.1	100	100	93.0	97.0	101.6	101.2
ДТТ	100	93.4	84.2	66.0	129.1	82.0	98.4	99.2
Сулема	65.4	57.2	27.4	79.0	95.0	53.0	34.0	55.2

* н.о. – не определяли

рН, что указывало на наличие, по крайней мере, второй протеиназы с оптимумом рН действия в области от 8.0 до 9.0.

Экзопротеиназы всех трех микроорганизмов проявляли низкую активность по отношению к казеину и гемоглобину, в то же время активность по отношению к азоказеину была на порядок выше. Это послужило основанием для использования азоказеина в качестве белкового субстрата при изучении их свойств. Способность экзоферментов, хотя и очень слабо, гидролизовать гемоглобин могла свидетельствовать о присутствии среди них аспартильных протеиназ, характеризующихся оптимумом действия в области кислых значений рН, и некоторых цистеиновых протеиназ, которые могли бы проявлять активность при этих же значениях рН. Однако ни у одного из грибов не наблюдали изменения протеолитической активности экзопротеиназ по отношению к азоказеину при добавлении восстанавливающих агентов (L-цистеин, ЭДТА). Это с большой степенью вероятности указывало на отсутствие в их культуральных жидкостях цистеиновых протеиназ, активность которых в присутствии восстанавливающих агентов должна была бы увеличиваться.

В табл. 1 представлены результаты изучения взаимодействия различных синтетических ингибиторов с экзопротеиназами, секретируемыми тремя микроорганизмами. ЭДТА, который подавляет активность металлопротеиназ, действовал только на экзоферменты оомицета. Таким образом, в составе экзоферментов, секретируемых истинными грибами, отсутствовали металлопротеиназы. При введении восстанавливающих агентов (L-цистеин, ЭДТА) в случае определения протео-

литической активности экзопротеиназ *P. infestans* наблюдали не увеличение, а почти двукратное ее снижение. Это свидетельствовало не только об отсутствии цистеиновых протеиназ, но указывало на присутствие в культуральной жидкости оомицета металлопротеиназ, активность которых подавлялась ЭДТА (табл. 1). ПМСФ эффективно подавлял активность экзоферментов все трех патогенов. Это свидетельствует о том, что все они секретируют в основном сериновые протеиназы. Ферменты, принадлежащие к этому классу, значительно различаются по субстратной специфичности. Результаты обработки хлорметилкетонами указывают на то, что среди них присутствуют трипсино-и субтилизиноподобные ферменты (табл. 1). Таким образом, в составе белков, секретируемых *R. solani*, присутствуют в основном трипсиноподобные ферменты. Ферменты, секретируемые *F. culmorum*, представлены субтилизиноподобными протеиназами, в то время как в культуральной жидкости оомицета дополнительно обнаруживались металлопротеиназы.

Результаты ДДС-ПААГ-электорофореза в присутствии желатины показали, что все исследованные штаммы секретируют три или более белков, обладающих протеолитической активностью (рис. 2). Все штаммы содержали высокомолекулярный белок, который оставался на старте геля. Остальные белки имели молекулярную массу в пределах от 12 до 65 кДа. Так, *P. infestans* секретирует протеиназы 17, 29 и 50 кДа, *F. culmorum* – 21, 29 и 50 кДа, а *R. solani* – 25 и 65 кДа. Наиболее высокой желатинолитической активностью обладали компоненты с молекулярной массой 29 и 50 кДа.

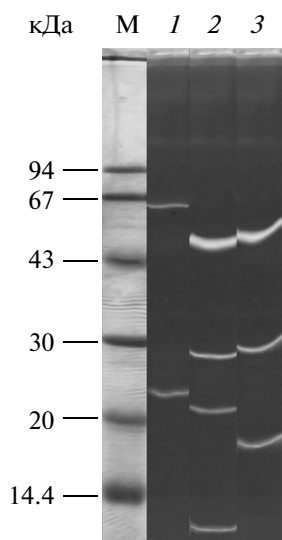


Рис. 2. Зимограмма, полученная при ДДС-Na-ПААГ-электрофорезе в присутствии желатины, частично очищенных культуральных сред после 12 сут роста *R. solani* (полоса 1), *P. infestans* (полоса 2) и *F. culmorum* (полоса 3). М – белки-маркеры молекулярных масс (кДа): фосфорилаза b – 94, бычий сывороточный альбумин – 67, яичный альбумин – 43, карбоангидраза – 30, соевый ингибитор трипсина Кунитца – 20.1 и лактальбумин – 14.4. Около 50 мкг белка было нанесено на полосы 1–3.

Результаты определения амидазной активности экзоферментов, секретируемых *P. infestans* и *F. culmorum*, при гидролизе *n*-нироанилидов аминокислот и трипептидов представлены в табл. 2. Существуют четкие различия между специфичностью действия на синтетические субстраты трипсина и субтилизинов, которые позволяют различать эти ферменты. Видно, что экзопротеиназы *P. infestans* наиболее эффективно гидролизуют БАПА (субстрат для трипсиноподобных протеиназ) и в меньшей степени Кбз-ААЛПА (субстрат для субтилизиноподобных протеиназ). В то же время они не действовали на субстраты для химотрипсина и эластазаподобных протеиназ (СукГГФПА и Ац-АААПА соответственно), а также для аминоксипептидаз (ЛПА). Ферменты, сек-

Таблица 2. Амидазная активность (АЕ) ферментов, секретируемых *P. infestans* и *F. culmorum* (концентрация субстратов 0.5 мМ)

Субстрат	Экзопротеиназы <i>P. infestans</i>	Экзопротеиназы <i>F. culmorum</i>
БАПНА	4.2 ± 0.17	1.9 ± 0.06
Кбз-ААЛПА	2.1 ± 0.08	6.7 ± 0.23
СукГГФПА	0 ± 0.00	0.5 ± 0.01
ЛПА	0 ± 0.00	1.1 ± 0.03
АцАААПА	0 ± 0.00	1.0 ± 0.02

ретируемые *F. culmorum*, эффективно расщепляли Кбз-ААЛПА и в меньшей степени БАПА. Они проявляли низкую активность по отношению к субстратам для химотрипсина, эластазаподобных протеиназ и аминоксипептидаз. Состав экзоферментов *P. infestans* и *F. culmorum* не зависел от состава культуральной среды.

Амидазная активность экзоферментов, секретируемых *R. solani*, зависела от состава питательной среды (табл. 3). При культивировании гриба на среде, не содержащей дрожжевого экстракта, секретируемые им протеиназы гидролизуют азоказеин и БАПА, но на Кбз-ААЛПА действовали слабее. Эти ферменты не действовали на специфические субстраты для химотрипсина, эластазаподобных протеиназ и аминоксипептидаз. Добавление в культуральную среду дрожжевого экстракта приводило к изменению состава протеиназ, секретируемых *R. solani*. Из табл. 3 видно, что экзопротеиназы начинали эффективнее гидролизовать азоказеин и субстрат для субтилизина (Кбз-ААЛПА), а их активность по отношению к БАПА была существенно ниже. Таким образом, при добавлении дрожжевого экстракта состав ферментов, секретируемых *R. solani*, изменялся. Гриб начинал продуцировать в основном субтилизиноподобные ферменты, при этом в культуральной среде значительно уменьшалось содержание трипсиноподобных протеиназ.

Было изучено взаимодействие экзопротеиназ, секретируемых *R. solani* и *F. culmorum*, с природными белками, выделенными из клубней картофеля и семян бобовых растений, которые действуют как ингибиторы сериновых протеиназ (рис. 3). Активность экзопротеиназ *R. solani* эффективно подавлялась специфическими ингибиторами трипсина из картофеля, сои (SKTI, Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor) и гледичии (рис. 3а, кривые 1, 3 и 4), но картофельный ингибитор химотрипсина I ингибировал их значительно слабее (рис. 3а, кривая 2). Это подтверждает высказанное выше предположение о том, что трипсиноподобные экзопротеиназы секретируются *R. solani* при культивировании без дрожжевого экстракта. Белки SKTI и SBVI (Soybean Bowman-Birk Inhibitor) менее эффективно подавляли активность экзопротеиназ, секретируемых *F. culmorum* (рис. 3б, кривые 3 и 6). Однако специфический ингибитор субтилизина из клубней картофеля эффективно действовал на них, подавляя их активность более чем на 60% (рис. 3б, кривая 5). Это указывает на то, что субтилизиноподобные ферменты составляют значительную часть протеиназ, секретируемых *F. culmorum*. Аналогичные результаты были получены при изучении действия белковых ингибиторов на экзопротеиназы *P. infestans*. Полученные данные подтверждают, что экзопротеиназы

грибов и оомицета принадлежат к протеолитическим ферментам клана химотрипсина [5]. Следует отметить, что ингибитор субтилизина из клубней картофеля подавлял *in vitro* рост и развитие макроконидий *F. culmorum* и зооспор *P. infestans* [28]. Можно предположить, что экзопротеиназы, секретируемые фитопатогенными микроорганизмами, являются фактором их патогенности.

Таким образом, ингибиторный анализ основных экстрацеллюлярных ферментов патогенных грибов *R. solani* и *F. culmorum*, также оомицета *P. infestans*, показал, что они принадлежат к группе сериновых протеиназ. На основании их субстратной специфичности и чувствительности к синтетическим и природным ингибиторам можно сделать заключение, что ферменты *F. culmorum* и *P. infestans* секретируют трипсино- и субтилизиноподобные протеиназы. Состав экзоферментов, секретируемых *R. solani*, зависел от состава культуральной среды, особенно от формы азотного питания. В условиях избытка белкового питания гриб *R. solani* секретировал преимущественно субтилизиноподобные ферменты и рос как сапрофит. При недостатке азотного питания гриб начинал секретировать трипсиноподобные протеиназы, которые способствовали инфицированию растительной ткани. Несмотря на то, что гриб *R. solani* был выделен из ткани картофеля, можно предположить, что он сохранял свойства сапрофита, который живет на рас-

Таблица 3. Активность экзопротеиназ гриба *R. solani*, выращенного на среде с добавлением дрожжевого экстракта и без него

Субстрат	Удельная активность, (Е)АЕ/мг белка	
	С дрожжевым экстрактом, 1%	Без дрожжевого экстракта
Azocasein, 0.5%-ный раствор	83.3 ± 2.34	15.0 ± 0.56
БАПНА (0.5 мМ)	26.0 ± 0.88	10.0 ± 0.31
Кбз-ААЛПНА (0.5 мМ)	40.0 ± 1.38	1.8 ± 0.06

тительных остатках. Весьма вероятно, что экзопротеиназы позволяют аскомицету *R. solani* расти на большом разнообразии живых и неживых растительных субстратов.

Полученные данные показывают, что различные источники питания для микроорганизмов могут быть важны для дифференциальной продукции ими сериновых протеиназ. Как секреция субтилизинов, так и трипсинов индуцируется сигналами окружающей среды [7, 29]. Субтилизины патогенных грибов могут играть разные роли в патогенезе. С одной стороны, они повышают адаптацию микроорганизма к растению-хозяину, а с другой — выполняют различные функции при

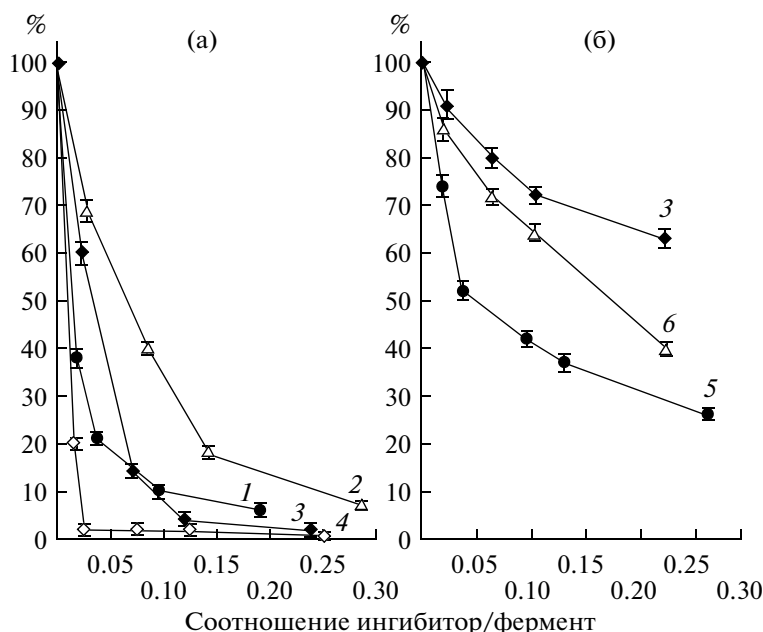


Рис. 3. Влияние белков-ингибиторов протеиназ на амидазную активность (%) экзоферментов *R. solani* (а) и *F. culmorum* (б) 1 – ингибитор трипсина из клубней картофеля [25], 2 – ингибитор химотрипсина I [26], 3 – SKTI, 4 – ингибитор трипсина из семян гледичии [27], 5 – ингибитор субтилизина из клубней картофеля [28], 6 – SBVI. В качестве субстратов использовали БАПНА и Кбз-ААЛПНА.

его выживании в разных экологических местах обитания вне хозяина. Известно, что не все микроорганизмы, поражающие растения, секретируют трипсины [30, 31]. Их секреция возрастает со степенью эволюционного “возраста” гриба. В связи с этим высказывается предположение, что филогенетическое распределение штаммов древних грибов является более широким, чем современных [30]. Такое распределение может являться отражением конвергентной эволюции, в результате которой филогенетически различные микроорганизмы приобрели способность секретировать близкие по свойствам протеолитические ферменты, действующие на одни и те же субстраты.

Оказалось, что оомицет *P. infestans* и аскомицет *F. culmorum* секретируют близкие по составу экзопротеиназы, несмотря на то, что они более удалены на филогенетическом дереве, чем аскомицет и базидиомицет *R. solani* (рис. 1, I). Таким образом, существует несколько механизмов адаптации различных штаммов микроорганизмов, которые секретируют протеолитические ферменты различных классов в зависимости как от их конкретных потребностей, так и природы их конкретных хозяев. Наши исследования также показали, что *in vitro* поведение исследуемых видов микроорганизмов не связано напрямую с экологическими нишами, из которых они были выделены. Различие состава протеиназ, секретлируемых микроорганизмами, поражающими растения, может отражать физиологические различия сапрофитов и фитопатогенов [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tunlid A., Talbot N.J. // Current Opinion Microbiol. 2000. V. 5. № 7. P. 513–519.
2. Oliver R., Osbourn A. // Microbiology. 1995. V. 141. № 1. P. 1–9.
3. St. Leger R.J., Joshi L., Roberts D.W. // Microbiology. 1997. V. 143. № 6. P. 1983–1992.
4. Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E., Butler G. // BMC Evolut. Biol. 2006. V. 22. № 6. P. 99.
5. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. № 1. P. D160–D164.
6. Дунаевский Я.Е., Белякова Г.А., Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 2. С. 327–330.
7. Дунаевский Я.Е., Грубань Т.Н., Белякова Г.А., Белозерский М.А. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 6. С. 848–853.
8. Дунаевский Я.Е., Голубева Е.А., Грубань Е.Т., Белякова Г.А., Белозерский М.А. // Журн. Росс. фитопатол. общ. 2001. Т. 2. С. 39–44.
9. Soanes D.M., Alam I., Cornell M., Wong H.M., Hedeler C., Paton N.W., Rattray M., Hubbard S.J., Oliver S.G., Talbot N.J. // PLoS ONE. 2008. V. 3. № 6. e2300. doi:10.1371/journal.pone.0002300.
10. Dubovenko A.G., Dunaevskii Ya.E., Belozerskii M.A., Oppert B., Lord G.C., Elpidina E.N. // Fungal Biol. 2010. V. 20. № 1. P. 1–9.
11. Kunitz M. // J. Gen. Physiol. 1947. V. 30. № 4. P. 291–310.
12. Charney J., Toarelli R.M. // J. Biol. Chem. 1947. V. 171. № 3. P. 501–505.
13. Erlanger D.F., Kokowsky N., Cohen W. // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. № 2. P. 271–278.
14. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
15. Heussen C., Dowdle E.B. // Anal. Biochem. 1980. V. 102. № 1. P. 196–202.
16. Appenroth K.J., Augsten H. // Biochem. Physiol. Pflanz. 1987. B. 182. № 1. S. 85–89.
17. Kamoun S. // Eukaryotic Cell. 2003. V. 2. № 2. P. 191–199.
18. Rossman A.Y., Palm M.E. // Inoculum. 2007. V. 58. № 1. P. 1–3.
19. Baldauf S.L., Roger A.J., Wenk-Siefert I., Doolittle W.F. // Science. 2000. V. 290. № 5493. P. 972–977.
20. St. Leger R.J., Screen S.E., Shams-Pirzadeh B. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 1. P. 320–324.
21. Cohen B. // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 79. № 2. P. 311–320.
22. Fortelius C., Markkanen P. // J. Indust. Microbiol. Biotech. 2000. V. 24. № 3. P. 369–373.
23. Allain-Boulé N., Lévesque C.A., Martinez C., Bélanger R.R., Tweddell R.J. // Can. J. Plant Pathol. 2004. V. 26. № 3. P. 365–370.
24. Ploetz C. // Mycopathologia. 2004. V. 157. № 2. P. 225–231.
25. Ревина Т.А., Кладницкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 1. С. 46–51.
26. Ревина Т.А., Валуева Т.А., Ромашкин В.И., Мосолов В.В. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 4. С. 683–689.
27. Мосолов В.В., Колосова Г.В., Валуева Т.А., Дронова Л.А. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 5. С. 787–802.
28. Ревина Т.А., Сперанская А.С., Кладницкая Г.В., Шевелев А.Б., Валуева Т.А. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1345–1352.
29. Monod M., Capoccia S., Léchenne B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O. // Int. J. Med. Microbiol. 2002. V. 292. № 2. P. 405–419.
30. Hu G., St. Leger R.J. // J. Evol. Biol. 2004. V. 17. № 10. P. 1204–1214.
31. St. Leger R.J., Bidochka M.J., Roberts D.W. // Arch. Biochem. Biophys. 1994. V. 313. № 1. P. 1–7.

Secretion of Proteolytic Enzymes by Three Phytopathogenic Microorganisms

N. N. Kudryavtseva, A. V. Sofyin, T. A. Revina, E. L. Gvozdeva, E. V. Ievleva, and T. A. Valueva

Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Received February 20, 2013

Abstract—Serine proteinases from three phytopathogenic microorganisms that belong to different fungal families and cause diseases in potatoes were studied and characterized. The oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and the fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium culmorum* were shown to secrete serine proteinases. An analysis of the substrate specificity of these enzymes and their sensitivity to synthetic and protein inhibitors allowed us to refer them to trypsin- and subtilisin-like proteinases. The correlation between the trypsin- and subtilisin-like proteinases depended on the composition of the culture medium, particularly on the form of the nitrogen source. A phylogenetic analysis was carried out. In contrast to basidiomycetes *R. solani*, ascomycetes *F. culmorum* and oomycetes *P. infestans* produced a similar set of exoproteinases, although they had more distant phylogenetic positions. This indicated that the secretion of serine proteinases by various phytopathogenic microorganisms also depended on their phylogenetic position. These results allowed us to suggest that exoproteinases from phytopathogenic fungi play a different role in pathogenesis. They may promote the adaptation of fungi if the range of hosts is enlarged. On the other hand, they may play an important role in the survival of microorganisms in hostile environments outside their hosts.

УДК 619.611.573.616:092.632.636.578

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ЛИШАЙНИКАХ

© 2013 г. А. А. Буркин, Г. П. Кононенко

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии,
гигиены и экологии РАСХН, Москва, 123022

e-mail: kononenkogp@mail.ru

Поступила в редакцию 18.03.2013 г.

С помощью иммуноферментного анализа дана характеристика встречаемости и частоты накопления микотоксинов в лишайниках, принадлежащих к 20 родам семейств Cladoniaceae, Nephromataceae, Parmeliaceae, Peltigeraceae, Teloschistaceae и Umbilicariaceae. Во всех родах, кроме *Peltigera*, могут регулярно обнаруживаться альтернариол, стеригматоцистин, микофеноловая кислота, цитринин, циклопиазоновая кислота и эмодин с содержанием более 1000 нг/г, т.е. 0.0001%. Обсуждается необходимость контроля безопасности препаратов на основе экстрактивных веществ лишайников.

DOI: 10.7868/S0555109913050036

Лишайники – разнообразные организмы, плотно заселяющие практически всю поверхность суши, были и остаются объектом интереса биологической науки. Это во многом связано с тем, что продукты их метаболизма, возникающие как следствие симбиотической связи микобионта, водорослей и/или цианобактерий, обладают важными для человека свойствами. На ранних этапах исследований для лишайниковых веществ, среди которых были алифатические соединения, тритерпены, дибензофураны, депсиды, депсидоны, антрахиноны, был обнаружен широкий спектр антибиотического действия, включая фунгистатический, противомикробный и противовирусный эффекты. Например, лишайник *Cetraria islandica*, известный так же как исландский мох, был отнесен к фармакологически значимым, введен в Фармакопеи ряда государств, в том числе в СССР, и является лекарственным сырьем.

Недавно в лишайниках обнаружена группа структурно различных низкомолекулярных физиологически активных веществ, биосинтез которых реализуется свободно живущими микроскопическими грибами, главным образом, родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* и *Fusarium* [1, 2]. Эти метаболиты – микотоксины – при попадании в организм человека и животных с пищей или кормами могут оказывать повреждающее действие – ингибируют синтез белка, нарушают проницаемость сосудов, угнетают репродуктивные функции и подавляют иммунитет, а также имеют особо опасные формы действия с отдаленными последствиями, такие, как канцерогенность и генотоксичность, включая мутагенную и тератогенную активность [3, 4]. Регулярный характер встречаемости микотоксинов у представителей лишайников разных таксономических групп и мест обитания [5] указывает на

существование в этих организмах устойчивого метаболического фона, обусловленного их присутствием.

В последние годы возрастает интерес к лишайникам как источникам веществ с противоопухолевой и иммуностропной активностью, а также веществ, влияющих на механизмы регуляции жирового обмена, окислительные процессы, регенерацию эпителиальных клеток. В их числе оказались не только редко обнаруживаемые вещества – у отдельных видов или даже у географически локализованных групп [6], но и типичные для многих родов, например лихенан – линейный β-D глюкоан, широко распространенный в лишайниках семейства Parmeliaceae и являющийся структурным компонентом клеточных стенок микосимбионта [7, 8]. Успехи этого направления поиска, безусловно, открывают широкие перспективы применения новых носителей физиологически активных веществ в диетологии, косметологии и профилактической медицине. Однако при разработке лечебных, корректирующих и профилактических средств важно иметь возможность обоснованного выбора биообъекта, чтобы гарантировать безопасность его применения.

Цель работы – сравнительная оценка частоты встречаемости микотоксинов и уровней их накопления в лишайниках разной родовой принадлежности.

МЕТОДИКА

Исследование выполнено на 78 видах лишайников, относящихся к 15 родам семейства Parmeliaceae и 5 родам семейств Cladoniaceae, Nephromataceae, Peltigeraceae, Teloschistaceae и Umbilicariaceae. Сборы образцов проведены с раз-

ных субстратов в летние сезоны 2010–2012 гг. на территориях Европейской части России, в Сибири и на Дальнем Востоке (Республики Карелия, Коми, Саха (Якутия), Красноярский и Приморский края, Мурманская, Ленинградская, Московская, Владимирская, Тверская, Тюменская, Амурская, Астраханская, Камчатская области), отдельные образцы были получены из Норвегии, Швеции, Финляндии и Турции. Определение видовой принадлежности лишайников выполнено Т.Ю. Толпышевой на кафедре микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Слоевидные лишайники или фрагменты слоевищ взвешивали, помещали в пробирку и добавляли смесь ацетонитрила и воды, приготовленную в объемном соотношении 84 : 16. Соотношение навески материала и объема экстрагента равнялось 1 : 10 (вес/объем). Пробирку интенсивно встряхивали и оставляли на 12–14 ч. После повторного встряхивания экстракты разбавляли буфером в 10 раз и использовали для непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). Количественное определение афлатоксина В₁ (АВ₁), Т-2 токсина (Т-2), эргоалкалоидов (ЭА), стеригматоцистина (СТЕ), охратоксина А (ОА), роридина А (РоА), микофеноловой кислоты (МФК), цитринина (ЦИТ), альтернариола (АОЛ), зеараленона (ЗЕН), дезоксиниваленола (ДОН), эмолина (ЭМО), фузонизинов (ФУМ), диацетоксисцирпенола (ДАС), циклопиазоновой кислоты (ЦПК), РР токсина (РР) выполняли с помощью наборов коммерческих и исследовательских иммунореагентов и калибраторов отечественного производства, предназначенных для контроля объектов растительного происхождения [2]. Нижние пределы определения микотоксинов в воздушно-сухом материале слоевищ составили 2 нг/г (АВ₁, Т-2, ЭА), 4 нг/г (СТЕ), 8 нг/г (ОА, РоА), 20 нг/г (МФК, ЦИТ, АОЛ, ЗЕН), 40 нг/г (ДОН, ЭМО), 50 нг/г (ФУМ) и 100 нг/г (ДАС, ЦПК, РР).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая многочисленность представителей семейства Parmeliaceae, взятых для исследования (табл. 1), их целесообразно рассматривать, условно разделяя по общности морфологического строения и среде обитания. Одна из них – это листоватые лишайники, относящиеся к родам *Hypogymnia*, *Parmelia*, *Arctoparmelia*, *Melanohalea* и *Melanelia*. Для первых четырех родов число регулярно присутствующих микотоксинов весьма велико. Из 16 анализируемых веществ в этих лишайниках практически всегда или очень часто обнаруживается набор из 11–12 компонентов (табл. 2). Однако в устойчивом и напряженном метаболическом профиле этих лишайников ак-

центы в виде метаболитов с наиболее высокими уровнями содержания (более 1000 нг/г) выражены у родов по-разному. Так, у *Hypogymnia* – это МФК и ЭМО, *Parmelia* – ЭМО, ЦПК, *Arctoparmelia* – ЦИТ, ЭМО, а в *Melanohalea* – РР. *Melanelia* по насыщенности микотоксинами уступает остальным, в нем регулярно встречаются только 5 компонентов, среди которых преобладает ЭМО.

В лишайниках родов *Platismatia* и *Vulpicida*, обитающих преимущественно на ветках и стволах деревьев, при сохранении многокомпонентности постоянными являются только 6–7 веществ, а у наземных листовато-кустистых лишайников *Cetraria* и особенно *Flavocetraria* этот признак выражен еще в меньшей степени. Наибольшие уровни накопления по сравнению с другими микотоксинами во всех этих случаях свойственны ЭМО (табл. 2).

Эпифитные кустистые лишайники по многообразию компонентов располагаются в ряд по родам: *Alectoria*, *Evernia* > *Pseudevernia*, *Usnea* > *Letharia* > *Bryoria* (табл. 2). При этом практически у всех, как и у ранее рассмотренных, по интенсивности накопления среди микотоксинов доминирует ЭМО и только у *Letharia* – ДАС.

Среди представителей других семейств (табл. 3) лишайники р. *Nephroma* имеют наибольшую насыщенность микотоксинами – 8 регулярно содержащихся компонентов, за ним следуют *Umbilicaria* – 6, *Cladonia* – 5 и только 3 компонента – у *Peltigera* и *Xanthoria* – СТЕ, АОЛ, ЭМО (табл. 4). Каждый из этих родов имеет свои особенности в накоплении регулярно встречающихся веществ. Так, уровни выше 1000 нг/г имеют в *Nephroma* ЭМО, МФК, *Umbilicaria* – ЭМО, АОЛ, *Cladonia* – ЭМО. Лишь у представителей *Peltigera* значительных уровней накопления микотоксинов не установлено. Лишайники *Xanthoria* отличаются крайне высоким накоплением ЭМО не только по отношению к остальным присутствующим в них микотоксинам, но и в сравнении с другими лишайниками. Среднее содержание ЭМО, рассчитанное по выборке из 124 образцов *Xanthoria* из разных мест обитания, составляет 30900 нг/г (табл. 4), приближенные к этому показатели выявлены только у представителей родов *Arctoparmelia* (15950 нг/г) и *Pseudevernia* (15800 нг/г), хотя и на гораздо меньших выборках.

Таким образом, в большинстве исследованных лишайников в количественном отношении преобладает ЭМО, отдельно или в сочетаниях с АОЛ, СТЕ, МФК, ЦПК или ЦИТ. Иная ситуация наблюдается лишь у *Melanohalea*, где доминирующим является РР, и *Letharia* – ДАС.

У всех обследованных родов лишайников с высокой частотой встречаются ЭМО (89–100%), АОЛ (79–100%), СТЕ (76–100%, кроме *Bryoria* – 12%), МФК (89–100%, кроме *Peltigera* – 52% и

Таблица 1. Таксономическая принадлежность исследованных лишайников семейства Parmeliaceae

Род	Вид и число образцов
<i>Alectoria</i>	<i>A. ochroleuca</i> (Hoffm.) Massal. – 17, <i>A. sarmentosa</i> (Ach.) Ach. – 26
<i>Arctoparmelia</i>	<i>A. centrifuga</i> (L.) Hale – 19, <i>A. separata</i> (Th.Fr.) Hale – 5
<i>Bryoria</i>	<i>B. capillaris</i> (Ach.) Brodo et D. Hawksw. – 20, <i>B. chalybeiformis</i> (L.) Brodo et D. Hawksw. – 18, <i>B. fremontii</i> (Tuck.) Brodo et D. Hawksw. – 1, <i>B. furcellata</i> (Fr.) Brodo et D. Hawksw. – 1, <i>B. fuscescens</i> (Gyeln.) Brodo et D. Hawksw. – 18, <i>B. implexa</i> (Hoffm.) Brodo et D. Hawksw. – 10, <i>B. lanestris</i> (Ach.) Brodo et D. Hawksw. – 2, <i>B. nadvornikiana</i> (Gyeln.) Brodo et D. Hawksw. – 2, <i>B. simplicior</i> (Vain.) Brodo et D. Hawksw. – 4, <i>B. subcana</i> (Nyl. ex Stizenb) Brodo et D. Hawksw. – 10
<i>Cetraria</i>	<i>C. islandica</i> (L.) Ach. – 95, <i>C. laevigata</i> Rassad. – 15
<i>Evernia</i>	<i>E. mesomorpha</i> Nyl. – 52, <i>E. prunastri</i> (L.) Ach. – 53
<i>Flavocetraria</i>	<i>F. cucullata</i> (Bellardi) Randl. et Saag – 28, <i>F. nivalis</i> (L.) Randl. et Saag – 52
<i>Hypogymnia</i>	<i>H. farinacea</i> Zopf – 1, <i>H. physodes</i> (L.) Nyl. – 112, <i>H. tubulosa</i> (Schaer.) Hav. – 1
<i>Letharia</i>	<i>L. vulpina</i> (L.) Hue. – 5
<i>Melanelia</i>	<i>M. hepatizon</i> (Ach.) Thell. – 14
<i>Melanohalea</i>	<i>M. exasperata</i> (DeNot.) O. Blanco et al. – 7, <i>M. olivacea</i> (DeNot.) O. Blanco et al. – 30, <i>M. septentrionalis</i> (DeNot.) O. Blanco et al. – 10
<i>Parmelia</i>	<i>P. saxatilis</i> (L.) Ach. – 48, <i>P. sulcata</i> Taylor – 56
<i>Platismatia</i>	<i>P. glauca</i> (L.) W.L. Culb. et C.F. Culb. – 52
<i>Pseudevernia</i>	<i>P. furfuracea</i> (L.) Zopf. – 14
<i>Usnea</i>	<i>U. subfloridana</i> Stirt. – 17, <i>U. dasypoga</i> (Ach.) Nyl. – 20, <i>U. hirta</i> (L.) Wigg. emend. Mot. – 18, <i>U. lapponica</i> Vainio – 4
<i>Vulpicida</i>	<i>V. pinastri</i> (Scop.) J.-E. Mattson et M.J. Lai – 27

Xanthoria – 27%) и ЦИТ (78–100%, кроме *Cetraria* – 42%, *Flavocetraria* – 45%, *Platismatia* – 56%, *Cladonia* – 54%, *Peltigera* – 28%, *Xanthoria* – 27%). ЦПК обнаруживается у представителей родов *Hypogymnia*, *Parmelia*, *Melanohalea*, *Vulpicida*, *Cetraria*, *Evernia*, *Letharia*, *Nephroma* и *Umbilicaria* с частотой 77–100%, отсутствует или встречается крайне редко в *Arctoparmelia*, *Flavocetraria* и выявляется у остальных с частотой 15–47%.

Микотоксины, которые часто встречаются в лишайниках и могут накапливаться в количествах, близких 10000 нг/г (или 0.001% к сухому материалу), известны как метаболиты свободно живущих микроскопических грибов, главным образом, принадлежащих родам *Penicillium*, *Aspergillus* (СТЕ, МФК, ЦПК, ЦИТ, PR), *Alternaria* (АОЛ) и *Fusarium* (ДАС). Эти грибы способны активно развиваться практически на любых природных субстратах и при

многообразии условий окружающей среды (на воздухе, в анаэробных условиях, в широком диапазоне температур и влажности). Описаны случаи отравлений сельскохозяйственных животных и птицы СТЕ при потреблении контаминированных кормов, нефропатия свиней и птицы, этиологическим фактором которой, наряду с ОА, считают ЦИТ, высокая токсичность *in vitro* показана для ЦПК и АОЛ [9]. Для токсинов группы трихотец-9-енов, к которой относятся ДАС и Т-2, известна высокая степень дерматотоксичности [10]. В связи с опасностью микотоксинов для человека и животных в последние десятилетия наукой были предприняты настойчивые усилия по идентификации токсигенных микромицетов. Оказалось, что токсинообразование у этих грибов в большинстве случаев является видоспецифичным, определены виды, обладающие высоким и устойчивым токси-

Таблица 2. Частота встречаемости (%) и содержание микотоксинов (мин. – средн. – макс., нг/г) в лишайниках различных родов семейства Parmeliaceae

Микотоксины	<i>Нуроутиниа</i> (n = 114)	<i>Parmelia</i> (n = 104)	<i>Arctoparmelia</i> (n = 24)	<i>Melanohalea</i> (n = 47)	<i>Melanelia</i> (n = 14)	<i>Platismatia</i> (n = 52)	<i>Vulpicida</i> (n = 27)
AB ₁	–	10 2-5-7	54 2-4-8	–	–	–	1 4
T-2	7 8-10-12	36 2-9-30	79 5-7-10	51 3-7-15	–	67 4-5-9	11 3-4-5
ЭА	9 10-22-60	53 2-12-80	50 3-4-8	28 2-3-10	–	21 2-11-48	7 5, 6
СТЕ	100 10-100-1500	100 20-275-1600	100 15-110-370	76 8-38-320	100 20-70-180	100 15-51-140	100 160-400-1840
ОА	89 8-11-24	44 8-18-50	29 8-10-15	11 10-25-40	–	2 13	4 10
РоА	10 10-40	–	–	–	–	–	–
МФК	100 40-1040-7900	100 80-440-2500	100 310-745-1400	100 20-210-500	100 50-120-250	100 27-185-530	100 150-335-840
ЦИТ	100 40-140-400	100 30-135-400	100 50-1650-4500	87 40-70-140	86 30-210-580	56 28-52-110	100 49-130-330
АОЛ	100 100-520-3240	100 90-680-2200	100 100-585-1500	100 40-175-1000	100 60-400-1100	100 48-410-1900	100 76-800-6460
ЗЕН	93 40-180-6300	85 25-65-200	100 110-160-250	85 30-47-80	28 20-22-25	56 20-31-63	100 40-64-200
ДОН	97 100-240-700	72 50-155-600	42 50-75-110	85 60-135-310	–	71 46-110-250	30 66-135-280
ЭМО	100 150-1470-10500	100 300-6480-89100	100 1400-15950-44700	100 140-380-1300	100 620-3500-10400	100 158-870-12000	100 290-1840-10590
ФУМ	95 80-300-1350	65 50-180-1900	50 80-170-400	45 50-135-380	–	27 52-135-309	4 120
ДАС	100 210-480-1100	86 100-395-1200	96 240-415-1000	94 130-410-1000	14 100	83 100-200-390	100 165-500-1740
ЦПК	99 190-910-4100	88 140-1250-7600	8 165	100 220-565-2000	28 220-360-500	15 100-175-315	85 110-305-670
PR	97 130-380-1550	85 100-710-6500	67 130-290-460	96 120-1120-5000	–	40 125-205-320	15 105-305-500

Таблица 2. Окончание

Микотоксины	<i>Setaria</i> (n = 110)	<i>Flavosetaria</i> (n = 80)	<i>Alectoria</i> (n = 43)	<i>Evernia</i> (n = 105)	<i>Pseudevernia</i> (n = 14)	<i>Usnea</i> (n = 59)	<i>Letharia</i> (n = 5)	<i>Bryoria</i> (n = 86)
AB ₁	—	—	14 2-3-3	15 2-3-6	—	—	40 2	—
T-2	2 10	1 2	14 4-5-6	58 2-5-10	7 4	24 2-6-10	—	—
ЭА	12 2-5-10	1 10	16 2-6-13	16 2-12-30	71 2-5-20	12 6-30-90	—	13 3-4-6
СТЕ	82 5-68-610	100 16-125-460	100 15-110-1300	100 20-75-260	100 15-45-80	100 25-50-110	100 60-70-160	12 20-80-200
ОА	—	—	14 8-9-12	26 8-17-30	93 10-15-20	17 8-12-30	—	6 8-11-16
РоА	—	—	—	—	—	—	—	—
МФК	89 20-42-165	100 32-110-320	100 150-775-1680	100 70-550-1500	100 240-330-540	100 65-180-480	100 280-330-410	100 20-310-1300
ЦИТ	42 20-43-160	45 25-50-110	86 30-90-160	100 130-800-6310	78 40-60-120	86 30-160-1000	100 130-150-190	90 30-90-1000
АОЛ	98 26-220-1000	84 26-230-870	95 20-590-6310	100 45-240-1330	100 50-180-530	88 25-75-220	100 20-50-70	99 20-270-1000
ЗЕН	3 22-24-28	31 20-40-89	95 40-60-110	92 20-70-170	93 50-55-70	41 20-29-50	40 70	—
ДОН	40 50-95-180	—	5 80	22 70-120-260	14 95	8 100-130-170	20 100	20 70-130-200
ЭМО	99 56-690-3500	100 63-3110-27260	100 185-3130-25120	100 620-2650-11750	100 6610-15800-30200	98 100-920-1840	100 130-230-310	100 70-890-7500
ФУМ	16 50-110-295	—	30 100-120-200	8 90-180-330	93 110-310-500	7 80-110-130	—	21 60-100-150
ДАС	21 100-155-310	76 100-155-315	93 105-225-510	82 100-240-550	64 180-250-400	73 100-180-1070	100 410-760-1300	12 100-180-270
ЦПК	77 100-220-690	—	42 105-270-560	81 100-370-1950	43 180-280-400	47 120-300-820	100 280-330-400	29 110-290-800
PR	8 100-130-190	1 115	28 130-220-400	20 100-225-480	21 130-190-240	2 160	—	34 100-245-790

Таблица 3. Таксономическая принадлежность исследованных лишайников других семейств

Семейство, род	Вид и число образцов
Cladoniaceae, <i>p. Cladonia</i>	<i>C. arbuscula</i> (Wallr.) Flot. – 31, <i>C. amaurocraea</i> (Florke) Schaerer – 13, <i>C. bellidiflora</i> (Ach.) Schaer. – 4, <i>C. botrytes</i> (K.Hagen) – 2, <i>C. cenotea</i> (Ach.) Schaer – 9, <i>C. coccifera</i> (L.) Willd. – 3, <i>C. cornuta</i> (L.) Hoffm. – 33, <i>C. crispata</i> (Ach.) Flot. – 6, <i>C. deformis</i> (L.) Hoffm. – 13, <i>C. fimbriata</i> (L.) Fr. – 5, <i>C. furcata</i> (Huds.) Schrad. – 10, <i>C. gonecha</i> (Ach.) – 2, <i>C. maxima</i> (Asah.) – 5, <i>C. mitis</i> Sandst. – 9, <i>C. pleurota</i> (Florke) Schaerer – 6, <i>C. rangiferina</i> (L.) F.H. Wigg. – 41, <i>C. rangiformis</i> Hoffm. – 3, <i>C. rei</i> Schaer. – 2, <i>C. squamosa</i> (Scop.) Hoffm. – 2, <i>C. stellaris</i> (Opiz) Pouz et Vězda – 24, <i>C. subulata</i> (L.) Wigg. – 6, <i>C. sulphurina</i> (Michx.) Fr. – 30
Nephromataceae, <i>p. Nephroma</i>	<i>N. arcticum</i> (L.) Torss. – 42
Peltigeraceae, <i>p. Peltigera</i>	<i>P. aphthosa</i> (L.) Willd. – 47, <i>P. canina</i> (L.) Willd. – 35, <i>P. didactyla</i> (With.) J.R. Laundon – 8, <i>P. horizontalis</i> (Huds.) – 5, <i>P. leucophlebia</i> (Nyl.) Gyeln. – 5, <i>P. malacea</i> (Ach.) Funk. – 4, <i>P. neopolydactyla</i> Neck. – 14, <i>P. polydactyla</i> (Neck.) – 21, <i>P. praetextata</i> (Florke ex Sommerf.) – 14, <i>P. rufescens</i> (Weiss) – 6, <i>P. scabrosa</i> Th.Fr. – 19
Umbilicariaceae, <i>p. Umbilicaria</i>	<i>U. deusta</i> (L.) Baumg. – 7, <i>U. hyperborea</i> (Ach.) Hoffm. – 10, <i>U. polyphylla</i> (L.) Baumg. – 2, <i>U. proboscidea</i> (L.) Schrad. – 9, <i>U. torrefacta</i> (Lightf.) Schrad. – 7
Teloschistaceae, <i>p. Xanthoria</i>	<i>X. candelaria</i> (L.) Th. – 10, <i>X. parietina</i> (L.) Th. Fr. – 114

генным потенциалом. Так, активными продуцентами СТЕ являются *Aspergillus nidulans* и *A. versicolor*, МФК – *Penicillium brevi-compactum*, PR – *P. roqueforti* [11]. В отношении остальных микотоксинов составлены перечни продуцирующих видов, но поиск наиболее активных среди них еще не завершен. Следует отметить, что для отдельных видов грибов установлена способность в определенных условиях синтезировать не один, а два метаболита из этой группы, например *P. viridicatum* (ОА + ЦИТ) [12], *P. roqueforti* (PR + МФК) [13]. Более того, для ОА и ЦИТ показано синергическое действие на организм теплокровных, в котором ЦИТ выступает в качестве биоактиватора ОА [14]. Факт частого совместного присутствия этих нефротоксинов показан недавно для разных видов агропродукции [15]. Интересно, что и в лишайниках также нередки случаи одинаково частого совместного обнаружения ОА и ЦИТ – например в *Hypogymnia* и *Pseudevernia* (табл. 2).

Доминирующий по степени накопления среди других микотоксинов – ЭМО, обладающий диарейным действием на теплокровных, ранее был найден в составе антрахинонов лишайников *Asahinea chrysantha* [16], *Cetraria cucullata* [17], а также *Xanthoria aureola* и *X. ulophyloides* [18] из Магаданской области, но, к сожалению, уровень его содержания в расчете на вес материала в этих работах не указан.

Факт достаточно широкой встречаемости МФК как совместно с PR (в листоватых лишайниках родов *Hypogymnia*, *Parmelia*, *Arctoparmelia*, *Melano-*

halea), так и отдельно, заслуживает особого внимания в связи с выраженной иммунодепрессивной активностью этого вещества. МФК используется при аллогенных трансплантациях и имеет преимущества в сравнении с остальными иммунодепрессантами из-за отсутствия у него мутагенного действия [19]. Вряд ли можно считать лишайники возможным источником получения этого вещества, поскольку случаи высокого накопления редки, и оно не достигает 10000 нг/г, т.е. 0.001%, 7900 нг/г – у представителей *Hypogymnia* и 5012 нг/г – *Nephroma*). Тем не менее в случае использования в лечебных целях лишайников, в которых по усредненной оценке уровень содержания МФК достаточно высок – *Hypogymnia*, *Arctoparmelia*, *Alectoria*, *Nephroma*, это обстоятельство, несомненно, следует учитывать.

По своей токсикологической значимости фузариотоксины – Т-2, ДОН, ЗЕН, ФУМ, а также АВ₁, ОА и ЭА явно уступают рассмотренным выше, поскольку выявляются в малых количествах, иногда – у предела определения метода, и, как правило, редко. Однако внимания заслуживает то, что АВ₁ обнаруживается у представителей *Arctoparmelia* с частотой 54%, ОА – очень часто в родах *Pseudevernia* (93%), *Hypogymnia* (89%) и *Nephroma* (88%), ЭА – *Pseudevernia* (70%), *Parmelia* (53%) и *Arctoparmelia* (50%), Т-2 – *Arctoparmelia* (79%), *Platismatia* (67%), *Evernia* (58%), *Melanohalea* (51%) (табл. 2). ЗЕН повсеместно и в гораздо больших количествах в сравнении с остальными родами находится в лишайниках родов *Hypogym-*

Таблица 4. Частота встречаемости (%) и содержание микотоксинов (мин.—средн.—макс., нг/г) в лишайниках других родов

Микотоксины	<i>Nephroma</i> (n = 42)	<i>Umbilicaria</i> (n = 35)	<i>Cladonia</i> (n = 269)	<i>Peltigera</i> (n = 178)	<i>Xanthoria</i> (n = 124)
AB ₁	2 3	—	1 3	—	—
T-2	40 3-7-11	—	2 4	6 2-4-6	1 8
ЭА	40 3-6-33	—	16 2-18-56	13 2-14-112	20 2-11-24
СТЕ	100 56-480-1480	100 19-145-500	88 8-145-890	88 4-300-1450	77 8-48-200
ОА	31 8-9-10	20 8-10-12	11 8-12-25	6 8-9-12	17 8-9-24
РоА	—	—	—	—	—
МФК	100 700-1770-5010	100 62-205-555	94 20-120-775	52 20-40-160	27 20-53-155
ЦИТ	100 32-90-345	97 25-150-500	54 20-105-920	28 20-52-200	27 31-95-240
АОЛ	100 130-555-2600	100 230-2060-5890	88 20-585-4200	87 20-235-1330	792 5-105-630
ЗЕН	88 26-67-150	11 20-59-105	25 20-38-90	11 20-58-315	2 40
ДОН	28 80-215-400	9 80	11 50-190-1950	2 50-72-100	1 160
ЭМО	100 1070-5330-23380	100 420-7310-27990	97 40-1180-12600	89 40-285-3050	100 7080-30900-94500
ФУМ	—	—	—	3100-152-305	-
ДАС	100 110-280-780	6 195	56 100-200-515	14 100-125-400	5 100-210-380
ЦПК	100 140-420-1230	86 125-265-600	33 100-225-740	32 100-540-1550	22 130-325-640
PR	21 100-115-195	—	121 05-215-570	3 155-270-500	1 135

nia и *Parmelia*, для ФУМ отмечена высокая степень обнаружения в *Hypogymnia* (95%) и *Pseudevernia* (93%), а для ДОН — в *Hypogymnia* (97%) и *Melanohalea* (85%). Эти факты нуждаются в дальнейшем изучении и объяснении. Они также имеют большое значение для надлежащей оценки опасности, связанной с многокомпонентным характером накопления микотоксинов, когда токсические эффекты одного метаболита могут усиливать негативное действие других.

Вопрос о происхождении микотоксинов в лишайниках остается пока открытым. Заселение этих организмов микроскопическими грибами показано уже несколькими группами исследователей

[20–23]. Недавно значительное многообразие эндофитных грибов подтверждено в работе на слоевищах лишайников 8 родов, обитающих в арктической бореальной, умеренной и тропической зонах на стволах деревьев (*Lobaria scrobiculata*), в ассоциациях с бриофитами (12 видов р. *Peltigera* и *Nephroma arcticum*) и на валунах (*Umbilicaria mamulata*) [24]. Однако прямой связи эндолишайниковых грибов с продуцированием токсичных метаболитов пока не установлено. Нельзя полностью исключать и возможность того, что лишенизированные грибы (аскомицет) может иметь биосинтетические механизмы, свойственные свободно живущим грибам. В то же время трудно представить

себе, чтобы один организм обладал совокупностью возможностей, которые в свободном существовании имеют грибы, относящиеся не только к разным родам, но и видам.

Конечно, лишайники с биохимической точки зрения организованы чрезвычайно сложно. Продукты вторичного обмена представлены в них собственными метаболитами лишайникового гриба, фикобионта и веществами, синтез которых осуществляется собственно симбионтом. К настоящему времени пути биосинтеза явно обозначены только для части этих веществ, главным образом, для тех, что присутствуют в значительных количествах. В отношении других пока остается много неясного. Дифференцировать происхождение метаболитов в организме лишайника не удается. Попытки выяснить это на изолированных фикобионтах и микобионтах дают только гипотезы, поскольку при разрыве симбиотической связи возможно искажение метаболического поведения. Трудности лабораторного моделирования биохимических процессов связаны, кроме того, и с чрезвычайно медленным ростом лишайников.

Вклад ассоциированных организмов — бактерий, грибов в метаболический фон симбионта оценить пока невозможно, так как нельзя экстраполировать на лишайники условия существования микромицетов в свободной среде. Когда речь идет о высоких уровнях накопления микотоксинов, необходимо иметь в виду не только значительную продолжительность жизненного цикла лишайников, но и их уникальную способность к консервации этих веществ. Недавно было обнаружено, что в гербарийных образцах даже после 100-летнего хранения микотоксин содержится в количествах, сопоставимых с найденными в свежесобранном материале [25]. Таким образом, с одной стороны, возможна активация токсинообразования грибов в особых условиях обитания внутри лишайника, а с другой, склонность к сохранности продуктов их метаболизма в этом длительно живущем организме.

В литературе нередко можно встретить сообщения о том, что некоторые метаболиты в лишайниках имеют повсеместную или весьма широкую распространенность, а другие свойственны только небольшим группам и отдельным видам или связаны с их географической локализацией. Вряд ли такие суждения можно признать обоснованными при ограниченных ареалах обследования и отсутствии методологии избирательного скринингового анализа этих веществ. После направленного поиска с помощью современных методов картина может оказаться совершенно иной. Например, недавно с помощью метода ИФА установлен факт повсеместной встречаемости усниновой кислоты при варьировании уровней ее содержания — от единиц до десятков тысяч мкг/г

(0.0002–2.6%) в лишайниках, относящихся к 8 семействам [26]. Поэтому каждый факт обнаружения нового физиологически активного вещества в этих организмах должен становиться предметом развернутого обследования границ его встречаемости и естественного содержания. Можно надеяться, что полученные в данной работе сведения помогут обеспечить эффективный контроль за использованием фармакологических препаратов, биодобавок и косметических средств на основе лишайников с позиций микотоксикологической безопасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2010. № 1. С. 185.
2. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Докл. Россельхозакад. 2011. № 2. С. 54–56.
3. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины (Медицинские и биологические аспекты). М.: Медицина, 1985. 320 с.
4. Хмелевский Б.Н., Пилипец З.И., Малиновская Л.С., Костин В.В., Комарницкая Н.П., Иванов В.Г. Профилактика микотоксикозов животных. М.: Агропромиздат, 1985. 271 с.
5. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Толтышева Т.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 81–87.
6. Muggia L., Schmitt I., Grube M. // SIM News. 2009. V. 59. № 3. P. 85–97.
7. Common R.S. // Mycotaxon. 1991. V. 41. № 1. P. 67–112.
8. Honegger K., Haish A. // New Phytol. 2001. V. 150. № 3. P. 739–746.
9. Weidenborner M. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 2001. 295 p.
10. Леонов А.Н., Зотова Е.В., Соболева Н.А., Кононенко Г.П. // Докл. ВАСХНИЛ. 1990. № 2. С. 52–55.
11. Cole R.J., Cox R.H. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. New York-London-Toronto-Sydney-San Francisco: Acad. Press, 1981. 937 p.
12. Scudamore K.A., Clarke J.H., Hetmanski M.T. // Lett. Appl. Microbiol. 1993. V. 17. № 2. P. 82–87.
13. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 505–510.
14. Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R.A. // Mol. Nutr. Food Res. 2007. V. 51. № 1. P. 61–99.
15. Kononenko G.P., Burkin A.A. // Agricult. Sci. 2013. V. 4. № 1. P. 34–38.
16. Мищенко Н.П., Степаненко Л.С., Кривошекова О.Е., Максимов О.Б. // Химия природных соединений. 1980. № 2. С. 160–165.
17. Krivoshchekova O.E., Maximov O.B., Stepanenko L.S., Mishchenko N.P. // Phytochemistry. 1982. V. 21. № 1. P. 193–196.
18. Кривошекова О.Е., Максимов О.Б., Мищенко Н.П., Степаненко Л.С. // Химия природных соединений. 1981. № 1. С. 96–97.

19. Allison A.C., Eugui E.M. // Immunol. Rev. 1993. № 136. P. 5–28.
20. Petrini O., Hake U., Dreyfuss M.M. // Mycologia. 1990. V. 82. № 4. P. 444–451.
21. Girlanda M., Isocrano D., Bianco C., Luppi-Mosca A.M. // Mycologia. 1997. V. 89. № 4. P. 531–536.
22. Suryanarayanan T.S., Thirunavukkarasu N., Hariharan G.N., Balaji P. // Sydowia. 2005. V. 57. № 1. P. 120–130.
23. Li W.C., Zhou J., Guo S.Y., Guo L.D. // Fungal Diversity. 2007. V. 25. P. 69–80.
24. Arnold A.E., Miadlikowska J., Higgins K.L., Sarvate S.D., Gugger P., Way A., Hofstetter V., Kauff F., Lutzoni F. // Syst. Biol. 2009. V. 58. № 3. P. 283–297.
25. Буркин А.А., Толышева Т.Ю., Кононенко Г.П. // Вест. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2012. № 3. С. 28–32.
26. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Толышева Т.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 3. С. 322–328.

Characteristics of Mycotoxin Accumulation in Lichens

A. A. Burkin and G. P. Kononenko

All-Russia Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene, and Ecology, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Moscow, 123022 Russia

e-mail: kononenkogp@mail.ru

Received March 18, 2013

Abstract—The levels and frequencies of mycotoxin accumulation in lichens belonging to 20 genera of the families Cladoniaceae, Nephromataceae, Parmeliaceae, Peltigeraceae, Telosshistaceae, and Umbilicariaceae were characterized using enzyme immunoassay. Alternariol, sterigmatocystin, mycophenolic acid, citrinin, cyclopiazonic acid, and emodin were regularly detected in all genera, except for *Peltigera*, at an average level of more than 1000 ng/g (i.e., 0.0001%). The necessity for the safety monitoring of drugs based on lichen extractives is discussed.

УДК 547.466

МЕТОД АНАЛИЗА L-АРГИНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АРГИНАЗЫ I

© 2013 г. Н. Е. Стасюк*, Г. З. Гайда*, М. В. Гончар* **

*Институт биологии клетки НАН Украины, Львов, 79005

**Жешувский университет, 36-100 Кольбушова, Польша

e-mail: galina_gayda@yahoo.com

Поступила в редакцию 21.02.2013 г.

Разработан высокоселективный и чувствительный метод количественного определения L-аргинина (Арг) с флуоресцентной детекцией продукта реакции. Метод основан на использовании аргиназы I печени человека, выделенной из рекомбинантного штамма-продуцента – дрожжей *Hansenula polymorpha*, и 2,3-бутандионмонооксида в качестве реагента на мочевины – продукт ферментативной реакции. Линейный диапазон концентраций определения Арг в конечной реакционной смеси – от 0.2 до 250 мкМ, предел детекции – 0.16 мкМ. Апробация нового метода на образцах коммерческих фармацевтических препаратов, содержащих Арг, продемонстрировала высокую корреляцию результатов ($R = 1.0$) с данными производителя и результатами других методов определения Арг.

DOI: 10.7868/S0555109913050139

Большинство известных химических и физико-химических методов определения концентрации L-аргинина (Арг) имеет ряд недостатков – низкую селективность и чувствительность, высокую стоимость и сложность аппаратуры (для физико-химических методов), недостаточную стабильность операционную и при хранении (для биосенсорных методов). В связи с этим необходима разработка новых высокоселективных и чувствительных методов количественного анализа Арг, в том числе энзиматических. Перспективными инструментами для разработки таких методов могут служить ферменты метаболизма Арг – аргиназа, аргининдеиминаза, аргинин-декарбоксилаза.

Аргиназа (КФ 3.5.3.1; L-аргинин-амидиногидролаза) катализирует гидролиз Арг до L-орнитина (Орн) и мочевины. Цитоплазматическая аргиназа I печени человека принимает непосредственное участие в цикле мочевины, а митохондриальная аргиназа II различных органов (почек и др.), не участвуя в цикле мочевины, поддерживает гомеостаз Арг и Орн [1–4]. Исследования последних лет показали, что аргиназа I может быть перспективным препаратом в энзимотерапии онкологических заболеваний, вызывая голодание раковых клеток по Арг, в первую очередь, гепатокарциномы и меланомы [5–8]. Для контроля за таким лечением требуется постоянный мониторинг уровня Арг в крови. Другой важной сферой, где необходимо проводить анализ Арг, является пищевая промышленность, в частности виноделие, поскольку Арг и мочевина в процессе термической обработки продуктов образуют в присутствии этанола канцерогенный продукт – этилкарбамат (уретан) [9].

В силу высокой стоимости препарата аргиназы I, актуальны поиск альтернативного источника фермента и разработка эффективной технологии его выделения.

В Институте биологии клетки НАН Украины были получены рекомбинантные дрожжевые штаммы-продуценты аргиназы I печени человека (далее – аргиназа), разработаны оптимальные схемы получения высокоочищенных стабильных препаратов фермента [10–12]. Препараты аргиназы успешно применялись для иммобилизации на золотых и серебряных наночастицах, для конструирования биосенсоров на Арг [13–16], а также для разработки энзиматического метода анализа Арг со спектрофотометрической (СФ) детекцией продукта реакции [17].

Однако недостаточная чувствительность разработанных прежде методов (предел детекции Арг в анализируемом образце – 100 мкМ для СФ метода и потенциометрического биосенсора) не позволяла измерять концентрацию этой аминокислоты в реальных образцах биологических жидкостей.

Цель работы – разработка чувствительного энзиматического метода определения Арг, основанного на применении аргиназы и 2,3-бутандионмонооксида, с флуориметрической регистрацией продукта реакции (мочевины) и апробация нового метода на образцах фармацевтических препаратов.

МЕТОДИКА

В качестве продуцента аргиназы использовали рекомбинантный штамм дрожжей NCYC 495

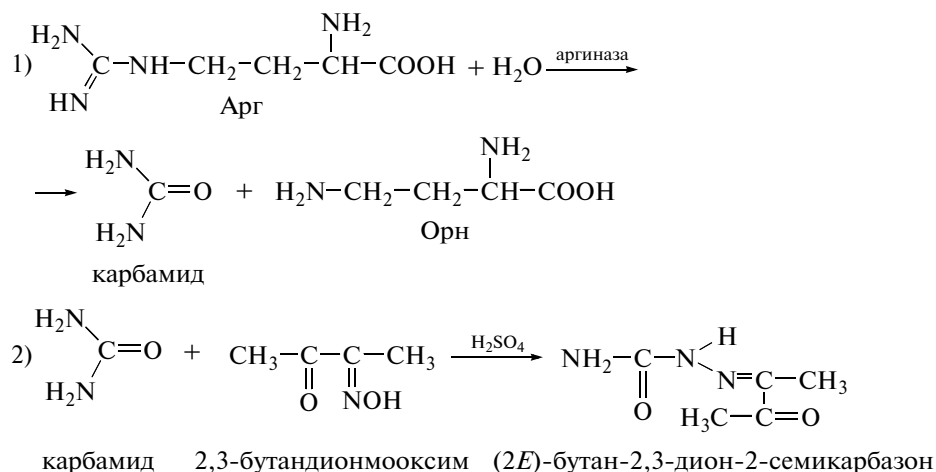


Рис. 1. Схема реакций при определении Арг с использованием аргиназы.

Hansenula polymorpha pGAP1-HsARG1(леu2car1 Sc:LEU2), содержащий целевой ген *HsARG1* под контролем конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [10].

Фермент выделяли из бесклеточного экстракта штамма-продуцента и очищали хроматографически на аффинном сорбенте Арг-макропористое стекло [12–13]. Препарат фермента с удельной активностью 600 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹ белка (600 ед./мг) использовали для разработки энзиматического метода анализа Арг.

В работе анализировали следующие образцы фармацевтических препаратов, содержащие Арг: Тивортин, производства “Юрія Фарм” (Украина), Цитрагинин – “Laphal Industria” (Франция) и Аминоплазмаль 10% Е – “Mr Brown Melzunhen AG” (Германия). Все образцы хранили при –20°C.

Референтный химический анализ Арг, основанный на использовании 8-гидроксихинолина [18], осуществляли методом добавок. Оптическую плотность продукта реакции регистрировали на спектрофотометре “Shimadzu UV-1650 PC” (Япония), при 500 нм, против контрольного образца, не содержащего Арг. Концентрацию Арг в фотометрируемом образце определяли по калибровочному графику.

Процедуру количественного анализа Арг проводили по схеме, разработанной ранее для энзиматического метода с СФ регистрацией продукта [17]. В стеклянные пробирки вносили по 0.1 мл проб, разведенных 30 мМ трис-НСI буфером (ТБ), рН 8.8, а для калибровочных проб – по 0.1 мл стандартных растворов Арг в ТБ с концентрациями от 0.05 мМ до 12 мМ. Реакцию запускали добавлением 0.01 мл раствора аргиназы (16.5 ед./мл) в ТБ. Инкубационную смесь выдерживали при 37°C в течение 15 мин, затем добавляли 1.8 мл

0.5%-ного раствора 2,3-бутандионмооксима (ДМО) в воде, 1.2 мл 3.0 М H₂SO₄ и кипятили на водяной бане 30 мин.

Оптимальные условия регистрации флуоресценции конечного продукта, в частности выбор длины волны эмиссии, осуществляли на приборе Hitachi – MPF-4 (Япония) с возбуждением при 380 нм. Эксперименты по определению диапазона линейности и селективности метода, а также измерение концентрации Арг в пробах методом сравнения со стандартным образцом [19] проводили на приборе Quantech Digital Filter Fluorometer (“Thermo Scientific”, США), используя светофильтры для возбуждения флуоресценции (λ = 360 нм) и для регистрации эмиссии (λ = 535 нм).

Результаты измерений обрабатывали статистически. Статистическую обработку проводили с помощью программы OriginPro 8.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенный нами метод основан на ферментативном гидролизе Арг до Орн и карбамида (I стадия реакции энзиматическая). Карбамид при прогревании в кислой среде взаимодействует с ДМО (II стадия, химическая), образуя продукт желтого цвета, концентрацию которого можно количественно оценить спектрофотометрически при 480 нм или флуориметрически при 510 нм [20]. Конечным продуктом химической реакции может быть как (2E)-бутан-2,3-дион-2-семикарбазон, так и другие соединения, в том числе циклические [21–23]. Принципиальная схема предполагаемых реакций, на которых основан метод определения Арг, представлена на рис. 1.

На рис. 2 представлены спектры продуктов химической реакции ДМО с растворами карбамида разной концентрации. Абсорбционный макси-

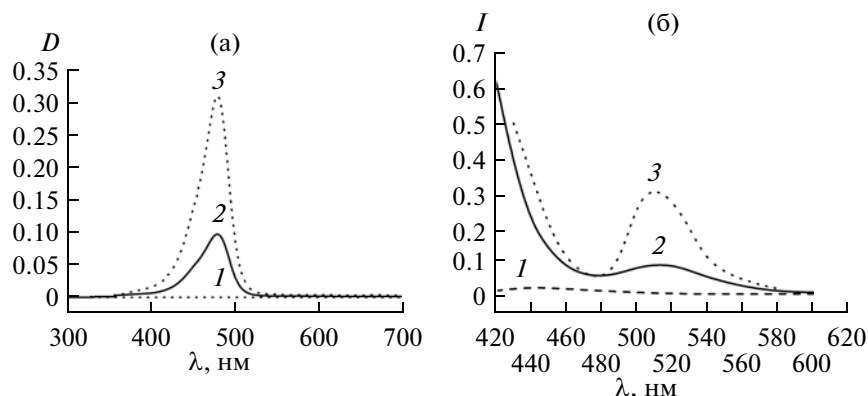


Рис. 2. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) модельных реакционных смесей ДМО-мочевина: контроль (1); 0.01 мМ (2) и 0.028 мМ мочевины (3). Флуоресценцию регистрировали на приборе Hitachi – MPF-4 с возбуждением при $\lambda = 380$ нм.

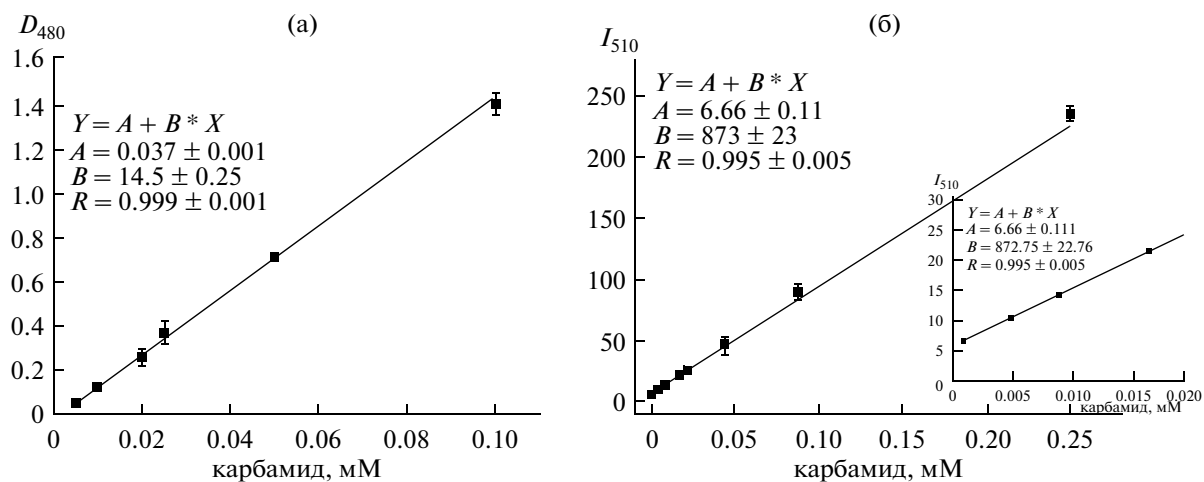


Рис. 3. Калибровочные графики для определения мочевины спектрофотометрическим (а) и флуориметрическим (б) методами. Флуоресценцию регистрировали на флуориметре Thermo Scientific, с фильтрами возбуждения при $\lambda = 360$ нм и эмиссии при $\lambda = 535$ нм.

мум поглощения окрашенного продукта находится в коротковолновой видимой области при 480 нм (рис. 2а), а пик эмиссии флуоресценции – при 510 нм (рис. 2б).

Для оптимизации условий проведения химической реакции экспериментально подбирали концентрацию ДМО и время кипячения на химической стадии реакции для получения максимальной флуоресценции [17]. На рис. 3 представлены калибровочные графики определения мочевины энзиматическим методом со спектрофотометрической (рис. 3а) и флуориметрической (рис. 3б) детекцией продукта реакции ДМО-мочевины в конечной реакционной смеси. Миллимолярный коэффициент экстинкции (ϵ) совпадает по величине с наклоном линии регрессии калибровочного

графика [19]. Как видно из рис. 3, ϵ мочевины для СФ метода составляла $14.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [17], а для флуоресцентного – $873 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$, что свидетельствовало о возможности 60-кратного повышения чувствительности флуориметрического способа регистрации по сравнению со спектрофотометрическим.

Сравнение калибровочных графиков для энзиматического определения мочевины (рис. 3) позволило сделать вывод, что при флуориметрической регистрации продукта реакции диапазон линейности определяемых концентраций гораздо шире, чем при СФ детекции.

Все последующие эксперименты проводили в оптимальных условиях энзиматической стадии реакции, установленных ранее [17]: кон-

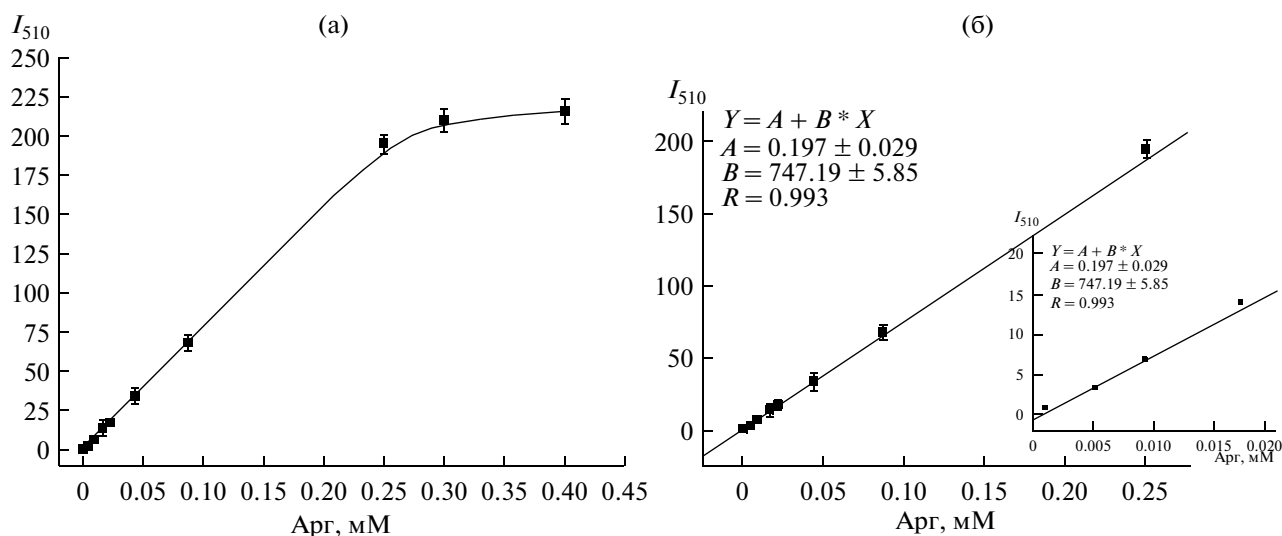


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции конечной реакционной смеси от концентрации Арг (а) и диапазон линейности метода (б). Флуоресценцию регистрировали на флуориметре Thermo Scientific, с возбуждением при $\lambda = 360$ нм и эмиссией при $\lambda = 535$ нм.

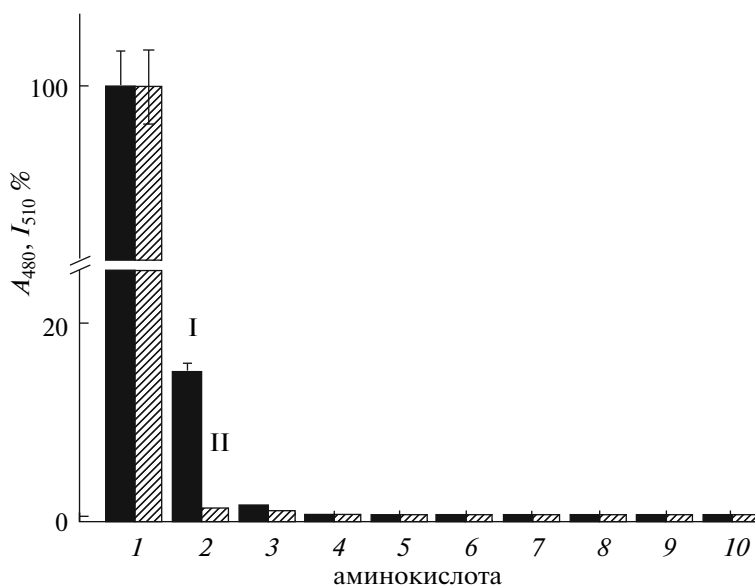


Рис. 5. Сравнение селективности ферментативных методов, основанных на применении ДМО: поглощение при 480 нм (I) и интенсивность излучения (II). В качестве тестируемых соединений использовали 1.0 мМ растворы L-аминокислот: 1 – Арг, 2 – Цит, 3 – Кан, 4 – Лиз, 5 – Глн, 6 – Глу, 7 – Про, 8 – Мет, 9 – Трп, 10 – Орн. Флуоресценцию регистрировали на флуориметре Thermo Scientific, с возбуждением при $\lambda = 360$ нм и эмиссией при $\lambda = 535$ нм.

центрация аргиназы в инкубационной смеси – 1.5 ед./мл, время инкубации – 15 мин. На рис. 4 представлены результаты изучения зависимости интенсивности флуоресценции конечного продукта реакции (ДМО-мочевина) от концентрации Арг и определения диапазона линейности метода. Линейность калибровочного графика сохранялась в диапазоне концентраций Арг 2×10^{-4} –0.25 мМ в конечной пробе, предел обнаружения Арг – 1.6×10^{-4} мМ. Сравнение ϵ для

чистого карбамида ($873 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и карбамида, образовавшегося из Арг ($747 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) в результате ферментативного гидролиза свидетельствовало о 85%-ной конверсии Арг, т.е. при избытке аргиназы на первой стадии реакции можно ожидать еще 1.2-кратного повышения чувствительности метода.

Изучение стабильности измеряемого конечного продукта от времени показало, что интенсивность флуоресценции через 1 сут снижалась всего

Результаты анализа Арг в фармацевтических препаратах

Метод, ссылка	Концентрация Арг в образцах, мМ		
	Тиворгин	Цитраргинин	Аминоплазмаль
Данные производителя $R = 1.0$	199.3	475.0	8.0
Спектрофотометрия $R = 1.0$ [17]	199.4 ± 0.9	480.1 ± 0.9	8.2 ± 0.1
Референтный химический [эта статья] $R = 0.9999$	198.5 ± 3.5	481.6 ± 4.1	8.0 ± 0.4
Амперометрия [16] $R = 0.9999$	200.3 ± 2.5	479.9 ± 4.7	7.8 ± 0.3
Потенциометрия [15] $R = 0.9998$	200.7 ± 4.5	447.2 ± 3.3	8.5 ± 0.3
Флуориметрия [эта статья]	200.1 ± 3.6	477.5 ± 0.6	8.1 ± 0.1

R – коэффициент корреляции при сравнении с флуориметрическим методом.

на 15% при хранении реакционной смеси в темноте при комнатной температуре.

Таким образом, предложен высокочувствительный энзиматический метод количественного определения Арг в модельных растворах с флуоресцентной регистрацией продукта реакции, не уступающей большинству известных на сегодня физико-химических методов по чувствительности [24].

Однако высокая чувствительность – это не единственное требование к методу. Одной из важнейших характеристик каждого аналитического метода является селективность. Уровень селективности предлагаемого метода (рис. 5) оценивали в относительных единицах (%) интенсивности флуоресценции к величине максимального сигнала (для 1 мМ Арг), принятой за 100%. В случае СФ регистрации наблюдались положительные сигналы: 15% на канаванин (**Кан**) и 1% на цитруллин (**Цит**). Положительный сигнал на Кан в СФ методе обусловлен способностью аргиназы гидролизовать эту аминокислоту до мочевины [26]. При флуориметрической детекции влияние Кан и Цит незначительно – 0.4 и 0.7% соответственно.

Отсутствие сигнала на остальные исследуемые аминокислоты объясняется высокой селективностью аргиназы к природному субстрату – Арг и высокой степенью чистоты ферментного препарата. Положительный сигнал на Кан не может быть существенной помехой при анализе реальных образцов, по крайней мере биологических жидкостей и пищевых продуктов, поскольку Кан встречается, как правило, только в семенах некоторых растений [25].

Предложенный энзиматический флуориметрический метод тестировали на образцах коммерческих фармацевтических препаратов, содержащих Арг, путем сравнения со стандартом. Результаты количественного определения Арг несколькими методами представлены в таблице. Соответствующие коэффициенты корреляции (R) между результатами анализа Арг, полученными различными методами, близки к 1 при высокой степени достовер-

ности таких связей ($p < 0.006$). Воспроизводимость результатов анализа предложенным методом также достаточно высока, коэффициент вариации составлял 0.1–2.0%.

Предварительные исследования показали (данные не представлены), что разработанный ферментативный метод можно применять для мониторинга Арг в биологических жидкостях и пищевых продуктах. Учитывая высокую стабильность полученного нами препарата аргиназы (за 3 г. хранения фермента при -10°C в трис-буфере, содержащем 1М NaCl и 1 мМ MnCl_2 , его активность уменьшалась только в 2 раза), можно прогнозировать перспективность разработки и выпуска энзиматического набора для определения Арг на основе предложенного метода для использования его в лабораторной практике.

Таким образом, разработан энзиматический метод количественного анализа Арг с флуориметрической детекцией продукта реакции – мочевины. Метод основан на применении ДМО и высокоочищенного фермента – аргиназы I печени человека, полученного из клеток рекомбинантного штамма дрожжей *H. polymorpha*. Новому методу присущи высокая пороговая чувствительность определения Арг (0.16 мкМ), широкий диапазон линейности 0.2–250 мкМ, а также нечувствительность к интерферирующему влиянию других аминокислот. Метод прост в исполнении, не требует сложной подготовки образцов для анализа и может применяться для количественного определения Арг в реальных образцах.

Работа выполнена при финансовой поддержке проектов НАТО NUKR.SFPP 984173 и комплексной научно-технической программы НАН Украины “Сенсорные приборы для медико-экологических и промышленно-технологических потребностей: метрологическое обеспечение и опытная эксплуатация” 5/3-2013, а также индивидуально-гранта FEMS (UA-SMU2013-1Stasyuk).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guoyao W.U., Morris S.M. // J. Biochem. 1998. V. 366. P. 1–17.
2. Kepka-Lenhart D., Mistry S.K., Wu G., Morris S.M. Jr. // Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000. V. 279. № 6. P. 2237–2242.
3. Morris S.M. Jr., Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D. // Gene. 1997. V. 193. № 2. P. 157–161.
4. Visek W.J. // J. Nutr. 1985. V. 116. № 1. P. 36–46.
5. Wheatley D.N., Campbell E., Lai P.B.S., Cheng P.N.M. // Gene Ther. Mol. Biol. 2005. V. 9. P. 33–40.
6. Glazer E.S., Stone E.M., Zhu C., Massey K.L., Hamir A.N., Curley S.A. // Transl. Oncol. 2011. V. 4. № 3. P. 138–146.
7. Mauldin J.P., Zeinali I., Kleypas K., Woo J.H., Blackwood R.S., Jo C.H., Stone E.M., Georgiou G., Frankel A.E. // Transl. Oncol. 2012. V. 5. № 1. P. 26–31.
8. Vynnytska-Myronovska B., Bobak Y., Garbe Y., Dittfeld C., Stasyk O., Kunz-Schughart L.A. // Int. J. Cancer. 2012. V. 130. № 9. P. 2164–2175.
9. Weber J.V., Sharypov V.I. // Sustainable Agriculture Reviews. / E. Lichtfouse. Springer, 2009. V. 2. P. 429–452.
10. Нагорний В.О., Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Стасюк О.В., Сибірний А.А. // Збірка наукових праць “Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології” ІХ з’їзду Українського товариства генетиків та селекціонерів. Алушта. 2007. Київ: Логос, 2007. Т. 1. С. 366–371.
11. Zakalskiy A.E., Zakalska O.M., Rzhepetskiy Y.A., Potocka N., Stasyk O.V., Horak D., Gonchar M.V. // Protein Expr. Purif. 2012. V. 81. P. 63–68.
12. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Ковальчук Є.П., Стасюк О.В., Гончар М.В. // Укр. біохім. журн. 2010. Т. 82. № 6. С. 14–21.
13. Stasyuk N., Serkiz R., Mudry S., Gayda G., Zakalskiy A., Koval'chuk Y., Gonchar M., Nisnevich M. // Nanotech. Develop. 2011. V. 1:e3. P. 11–14.
14. Патент України. 2011. № 64025.
15. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Koval'chuk Y., Gonchar M. // J. Mater. Sci. Eng. 2011. V. 1. P. 819–827.
16. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Vus B., Gonchar M., Koval'chuk Ye. // Biosens. Bioelectron. 2012. V. 37. № 1. P. 46–52.
17. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Гайда А.В., Гончар М.В., Ковальчук Є.П. // Ukrainica Biorganica Acta. 2012. Т. 1. С. 31–37.
18. Wang H., Liang X.-H., Zhao R.-X., Feng Li-D., Li H. // Agric. Sci. China. 2008. V. 7. № 10. P. 1210–1215.
19. Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И. Основы аналитической химии. М.: Высшая школа, 2010. 416 с.
20. Rho J.H. // Clin. Chem. 1972. V. 18. № 5. P. 476–478.
21. Lugosi R., Thibert R.J., Holland W.J., Lam L.K. // Clin. Biochem. 1972. V. 5. P. 171–181.
22. Butler A.R., Hussain I., Leitch E. // Clin. Chim. Acta. 1981. V. 112. P. 357–360.
23. Rosenthal G.A., Dahlman D.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 1. P. 14–18.
24. Francis P.S., Lewis S.W., Lim K.F. // Trends Anal. Chem. 2002. V. 21. № 5. P. 389–400.
25. Ekanayake S., Skog K., Asp N.G. // Food Chem. Toxicol. 2007. V. 45. № 5. P. 797–803.

L-Arginine Assay with the Use of Arginase I

N. E. Stasyuk^a, G. Z. Gaida^a, and M. V. Gonchar^{a, b}^a Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 79005 Ukraine^b Rzeszow University, 36-100 Kolbuszowa, Poland

e-mail: galina_gayda@yahoo.com

Received February 21, 2013

Abstract—A highly selective and sensitive method for the quantitative determination of L-arginine (Arg) with a fluorescent detection of the reaction product has been developed. The method is based on the use of human liver arginase I isolated from a recombinant producer strain, yeast *Hansenula polymorpha*, and 2,3-butanedione monoxime, which is used to detect carbamide—the product of enzymatic reactions. The linear concentration range for determining Arg in the final reaction mixture varies from 0.2 to 250 μM , and the detection limit is 0.16 μM . Tests of the new method using commercial Arg-containing pharmaceutical preparations showed a high correlation ($R = 1.0$) of the results with the manufacturer's data and the results of other methods for Arg detection.

Сдано в набор 29.04.2013 г.	Подписано к печати 10.07.2013 г.	Дата выхода в свет 23 нечетн.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 13.0	Усл. кр.-отт. 1.5 тыс.	Уч.-изд. л. 13.0
	Тираж 111 экз.	Зак. 1582	Цена свободная

Учредитель: Российская академия наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Издатель: Академиздатцентр “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
 Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
 Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6