

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	<b>МИКРОБНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА (ОБЗОР)</b> Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алфёров В.А., Решетилев А.Н.	5-15	10
<input type="checkbox"/>	<b>ГИПОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС И ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕРИБАКТЕРИОИДНОЙ МЕМБРАНЫ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВ</b> Крылова В.В., Измайлов С.Ф.	16-22	0
<input type="checkbox"/>	<b>СВОЙСТВА BACILLUS SUBTILIS ИМВ В-7023 И ЕГО СРЕДЫ В ПРОЦЕССЕ РОСТА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ: ВЛИЯНИЕ</b> Рой А.А., Яценко И.П., Гордиенко А.С., Курдиш И.К.	23-27	0
<input type="checkbox"/>	<b>ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ TiO<sub>2</sub>-ПЛЕНОК</b> Плескова С.Н., Голубева И.С., Верёвкин Ю.К., Першин Е.А., Буренина В.Н., Королихин В.В.	28-32	5
<input type="checkbox"/>	<b>ИЗМЕНЕНИЕ pH И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА СРЕДЫ В ПРОЦЕССЕ РОСТА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ: ВЛИЯНИЕ</b> ОКИСЛИТЕЛЕЙ И ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ Согомонян Д., Акопян К., Трчунян А.	33-38	2
<input type="checkbox"/>	<b>ЭКСПРЕССИЯ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ TRIGONOPSIS VARIABILIS В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ PICHIA PASTORIS</b> Редо В.А., Новикова Е.К., Эльдаров М.А.	39-45	2
<input type="checkbox"/>	<b>БИОСИНТЕЗ 4,15-ДИАЦЕТИЛНИВАЛЕНОЛА FUSARIUM SAMBUCINUM VAR. MINUS</b> Соколова Г.Д., Вознесенский В.Н.	46-49	0
<input type="checkbox"/>	<b>ГИДРООКСИЛИРОВАНИЕ СТЕРОИДОВ МИЦЕЛИЕМ CURVULARIA LUNATA В ПРИСУТСТВИИ МЕТИЛ-β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА</b> Андрюшина В.А., Дружинина А.В., Ядерев В.В., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е.	50-57	2
<input type="checkbox"/>	<b>A NOVEL SCREENING METHOD OF CELLULASE-PRODUCING BACTERIA BASED ON PHYTOPTHORA PARASITICA VAR. NICOTIANAE</b> Wang W., Wang P., Hu R.	58-60	0
<input type="checkbox"/>	<b>STRAIN IMPROVEMENT FOR ENHANCED PRODUCTION OF CELLULASE IN TRICHODERMA VIRIDE</b> Xu F., Wang J., Chen S., Qin W., Yu Z., Zhao H., Xing X., Li H.	61-65	0
<input type="checkbox"/>	<b>DECOLORIZATION OF THE ANTHRAQUINONE DYE CIBACRON BLUE 3G-A WITH IMMOBILIZED COPRINUS CINEREUS IN FLUIDIZED BED BIOREACTOR</b> Moutaouakkil A., Blaghen M.	66-72	0
<input type="checkbox"/>	<b>УЧАСТИЕ ЛАККАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ ГРИБА LENTINUS (PANUS) TIGRINUS В БИОДЕГРАДАЦИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФЕНОЛА В ЖИДКИХ СРЕДАХ</b> Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Атыкян Н.А., Надежина О.С., Паршин А.А.	73-78	0
<input type="checkbox"/>	<b>ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АЛЬТЕРНАРИОЛА ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА КОНТАМИНАЦИИ АГРОПРОДУКЦИИ</b> Буркин А.А., Кононенко Г.П.	79-83	4
<input type="checkbox"/>	<b>ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСЕСТРОЛА В МЯСЕ ЖИВОТНЫХ</b> Вдовенко М.М., Чи-Фанг Пенг, Чуан-Лай Шу, Вылегжанина Е.С., Комаров А.А., Сахаров И.Ю.	84-89	0
<input type="checkbox"/>	<b>ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ SILENE VULGARIS (M.) G</b> Гюнтер Е.А., Оводов Ю.С.	90-94	0
<input type="checkbox"/>	<b>ДЫХАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК POLYSCIAS FILICIFOIA BAILEY, STEPHANIA GLABRA (ROXB.) MIERS И DIOSCOREA DELTOIDEA WALL</b> Титова М.В., Беркович Е.А., Решетняк О.В., Куличенко И.Е., Орешников А.В., Носов А.М.	95-101	0
<input type="checkbox"/>	<b>ВЛИЯНИЕ ВЛАГОТЕПЛОЙ ОБРАБОТКИ НА БЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ</b> Кораблёва Н.В., Касимова Т.Д.	102-112	0
<input type="checkbox"/>	<b>АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНОВ: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СТРУКТУРЫ И СПОСОБА ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ</b> Давыдова В.Н., Нагорская В.П., Горбач В.И., Калитник А.А., Реунов А.В., Соловьёва Т.Ф., Ермак И.М.	113-118	5

УДК 602.4:628.35:664

## МИКРОБНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА (ОБЗОР)

© 2011 г. О. Н. Понаморева\*, В. А. Арляпов\*, В. А. Алфёров\*, А. Н. Решетилов\*\*

\*Тульский государственный университет, Тула, 300600

e-mail: chem@tsu.tula.ru

\*\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пущино, 142290

e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 04.09.2009 г.

Рассмотрены последние достижения в применении биосенсоров для определения индекса биологического потребления кислорода (БПК) в воде. Особое внимание уделено принципам функционирования микробных БПК-сенсоров, суммирована информация о биораспознающих элементах таких систем и способах иммобилизации биокомпонентов в сенсорах пленочного типа. Подробно рассмотрены характеристики некоторых моделей БПК-сенсоров.

В результате бытовой активности и интенсивной промышленной деятельности человека в последнее время происходит нарастающее по масштабам загрязнение водоемов рек, озер и водохранилищ. Экспресс-оценка степени загрязнения объектов окружающей среды органическими соединениями является важным и, в некоторых случаях, жизненно необходимым компонентом экологического контроля. Учитывая постоянно растущий перечень веществ, поступающих как загрязнители в окружающую среду, можно констатировать, что выполнение полного химического анализа является сложной и дорогостоящей процедурой. Эффективным инструментом анализа оказываются методы, основанные на интегральной оценке органических компонентов. В этой связи значительное внимание уделяется разработке биосенсорных методов контроля, позволяющих выполнить интегральную оценку загрязненности, значительно повышающих оперативность анализа и снижающих его стоимость [1].

Важнейшей интегральной характеристикой качества воды является биохимическое потребление кислорода (БПК) — количество растворенного кислорода (мг), необходимое для окисления всех биоразлагаемых органических соединений, находящихся в 1 дм<sup>3</sup> воды. Единица индекса БПК имеет обозначение мг О<sub>2</sub>/л или мг О<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>. Оценка БПК — это эмпирический тест, в котором используют стандартизованную лабораторную процедуру, чтобы определить потребление кислорода в анализируемых пробах воды. БПК определяют условно по изменению содержания кислорода до и после размещения и выдерживания в течение определенного периода времени образца воды в специальных герметично закрытых колбах. Стандартный метод определения БПК предполагает инкубирование насыщенной кислородом пробы воды, в которую вно-

сят активный ил (смесь различных микроорганизмов), в течение 5, 7, 10 или 20 сут (БПК<sub>5</sub>, БПК<sub>10</sub>, БПК<sub>7</sub> или БПК<sub>20</sub> соответственно) при 20°C [2]. Полученный результат характеризует суммарное содержание биохимически окисляющихся органических примесей в воде, а также способность воды к самоочищению. В поверхностных водах величины БПК<sub>5</sub> изменяются обычно в пределах 0.5–4 мг/дм<sup>3</sup> и подвержены сезонным и суточным колебаниям. Весьма значительны изменения величин БПК<sub>5</sub> в зависимости от степени загрязненности водоемов. В зависимости от категории водоема величина БПК<sub>5</sub> регламентируется следующим образом: не более 3 мг/дм<sup>3</sup> для водоемов хозяйственно-питьевого водопользования и не более 6 мг/дм<sup>3</sup> для водоемов хозяйственно-бытового и культурного водопользования. Для морей (I и II категории рыбохозяйственного водопользования) БПК<sub>5</sub> при 20°C не должна превышать 2 мг/дм<sup>3</sup>. БПК-тест находит также широкое применение на очистных сооружениях для оценки эффективности уменьшения биоразлагаемых соединений в процессах очистки стоков. Традиционный БПК-тест имеет определенные преимущества, он является универсальным методом измерения большинства образцов сточных вод и водных объектов и, кроме того, не требует дорогостоящего оборудования. Он имеет, однако, серьезные ограничения по времени анализа. Отсутствие оперативности существенно снижает ценность традиционной методики. По указанной причине реально могут возникнуть экологически опасные ситуации, при которых остается «за кадром» поступление на водоочистные сооружения аварийно загрязненных вод или наоборот, недоочистка их в процессе регенерации.

Для оперативного анализа разрабатываются методы оценки БПК, основанные на использовании биосенсорных анализаторов. Биосенсор — это инте-

грированное устройство, которое способно обеспечивать количественную и полуколичественную аналитическую информацию с использованием биологического распознающего элемента, находящегося в тесном контакте с преобразователем. Исследования по созданию БПК-биосенсоров проводятся с конца 70 годов прошлого века [3, 4], но разработки таких систем интенсивно продолжаются и в настоящее время [5, 6]. Следует отметить, что с помощью биосенсоров возможно быстрое определение БПК (БПК<sub>6с</sub>), которое коррелирует, но не всегда полностью идентично величине традиционного БПК<sub>5</sub>. В последнее время развиваются новые подходы в биосенсорном анализе БПК, которые позволяют достичь приемлемой корреляции между показаниями биосенсора и традиционных методов. Корреляция данных, полученных с помощью биосенсорного анализатора, с данными, полученными методом БПК<sub>5</sub>, могут иметь значения порядка 0.95–0.98 [7]. Так, для калибровки БПК-биосенсора используют специализированные синтетические сточные воды или биораспознающий элемент БПК-биосенсора создают на основе специфических микроорганизмов, способных к эффективному окислению веществ конкретных стоков. Таким образом, целесообразно производить разработку биосенсоров, выбор соответствующих микроорганизмов и калибровочных растворов, которые обеспечивали бы наиболее эффективную детекцию БПК в соответствии с конкретным типом сточных вод, т.е. разрабатывать специализированные БПК-биосенсоры.

Распространенность и востребованность исследований по разработке биосенсорных систем определения БПК закономерно привели к коммерциализации и промышленному выпуску ряда моделей. БПК-сенсорные системы все еще имеют ряд ограничений, которые затрудняют их применение: недостаток стандартизации и недоработки законодательства в большинстве стран, сложные требования обслуживания и недостаточная устойчивость применяемых культур микроорганизмов к действию тяжелых металлов и различных токсичных веществ [6].

В обзорах по микробным биосенсорам [1], а также по применению биосенсоров для анализа объектов окружающей среды и экологическом мониторинге [6–8] приводятся примеры разработанных БПК-сенсоров. Отмечена важная роль биораспознающих элементов на основе эукариотических микроорганизмов в биосенсорах для решения проблем охраны окружающей среды, в том числе для определения БПК водных объектов [9]. Суммирована подробная информация о БПК-сенсорах, в основном тонкопленочного типа на основе кислородного электрода, а также о некоторых коммерчески доступных биосенсорных системах, разработанных до 2000 г. [5].

В настоящем обзоре обобщена информация о принципах функционирования, устройстве, анали-

тических характеристиках БПК-биосенсоров, свойствах биораспознающих элементов, приведены параметры функционирования и характеристик БПК-сенсоров разных типов.

## ПРИНЦИПЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БПК-БИОСЕНСОРОВ

**Биосенсоры биопленочного типа на основе кислородного электрода.** Большинство описанных БПК-сенсоров являются целоклеточными микробными сенсорами биопленочного типа, принцип функционирования которых основан на измерении скорости дыхания микроорганизмов, находящихся вблизи поверхности преобразователя. В 1977 г. Карубе с соавт. опубликовали работу, в которой впервые описали микробный сенсор для определения БПК<sub>6с</sub> [3] с использованием микроорганизмов, взятых из активного ила очистных сооружений. Особенностью таких биосенсоров является то, что между пористой (чаще всего, целлюлозной) и газопроницаемой (как правило, тефлоновой) мембраной кислородного электрода содержится слой микробной пленки в качестве биологического распознающего элемента (рис. 1).

Растворенный кислород диффундирует через аэрированный фосфатный буфер, сквозь диализную мембрану в слой иммобилизованных клеток, где часть кислорода расходуется иммобилизованными микроорганизмами на окисление органических соединений, содержащихся в пробе. Оставшийся кислород проникает через газопроницаемую тефлоновую мембрану и восстанавливается на катоде кислородного электрода. Сила тока в системе прямо пропорциональна количеству восстановившегося на электроде кислорода. После установления равновесия между диффузией кислорода и скоростью эндогенного дыхания иммобилизованных микроорганизмов в буферном растворе регистрируют равновесный ток (фоновый). Когда образец сточной воды вводят в измерительную кювету, органические вещества анализируемой пробы диффундируют через диализную мембрану и утилизируются иммобилизованными микроорганизмами, в результате увеличивается скорость дыхания микроорганизмов и потребление кислорода. В этом случае меньшее количество кислорода восстанавливается на электроде. Ток уменьшается до тех пор, пока не установится новое равновесие. При промывке измерительной кюветы буферным раствором восстанавливаются скорость эндогенного дыхания микроорганизмов и прежнее равновесие в системе. Так как процесс контролируется диффузией субстрата, сигнал сенсора будет в определенной степени пропорционален концентрации легко окисляемых субстратов в образце (рис. 2).

Для получения ответа биосенсора обычно используют два метода обработки: равновесный или динамический (определение по конечной точке) и

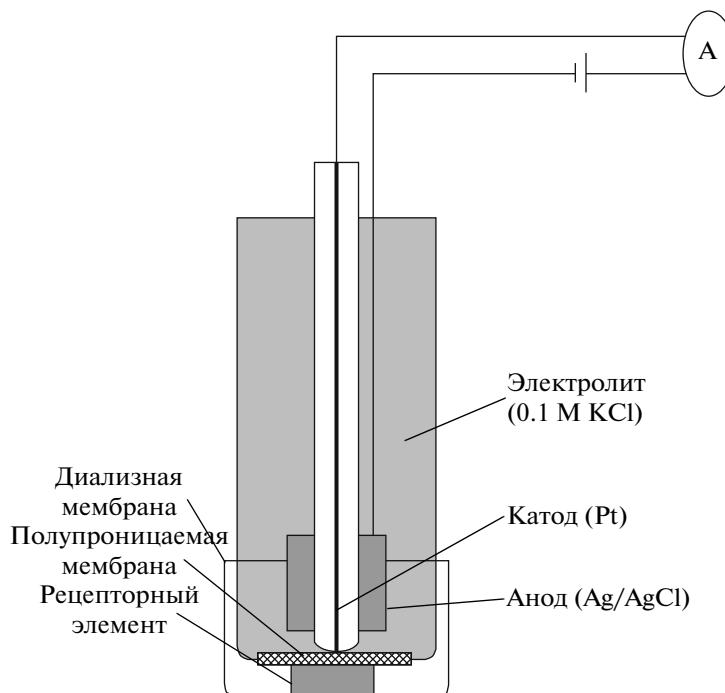


Рис. 1. Схема БПК-бенсора биопленочного типа на основе кислородного электрода Кларка.

кинетический (определение начальной скорости) [10]. В равновесном методе для определения  $BPK_{6c}$  используется разность между током в двух равновесных состояниях. Время измерения составляет 15–30 мин с последующим восстановлением в течение 1 ч. В кинетическом методе в качестве ответа сенсора используют начальное изменение силы тока от времени после добавления образца. Этот параметр отображает ускорение скорости микробного дыхания и, в определенной степени, пропорционален концентрации субстрата. В этом случае ответ сенсора регистрируется в течение 15–30 с, а время восстановления биораспознающего элемента составляет менее 10 мин. Следует отметить, что более высокой чувствительности можно достичь при использовании в качестве ответа начальной скорости отклика биосенсора при незначительной потере в воспроизводимости [11]. Таким образом, кинетический метод обработки сигнала биосенсора более предпочтителен в том случае, когда необходим постоянный контроль БПК, например, в ходе очистки сточных вод, или при анализе большого числа проб [12].

В настоящее время разрабатываются новые биопленочные БПК-сенсоры на основе кислородного электрода [5–8]. При проведении исследований основное внимание уделяют совершенствованию параметров БПК-сенсоров: увеличению стабильности, повышению корреляции данных, полученных биосенсорным и стандартными методами оценки  $BPK_5$ . Прежде всего это связано с поиском или созданием новых эффективных микроорганизмов, примени-

ем современных материалов и новых методов иммобилизации биоматериала.

**Сенсорные системы биореакторного типа.** Для определения  $BPK_{6c}$  используют сенсорные системы биореакторного типа с респирометром для постоянного измерения дыхательной активности суспензии микроорганизмов. Строго говоря, в соответствии с определением IUPAC такие системы не являются биосенсорами, так как биораспознающий элемент не находится в прямом контакте с преобразователем. Однако такие системы нашли широкое применение на предприятиях по очистке сточных вод для непрерывного контроля степени очистки

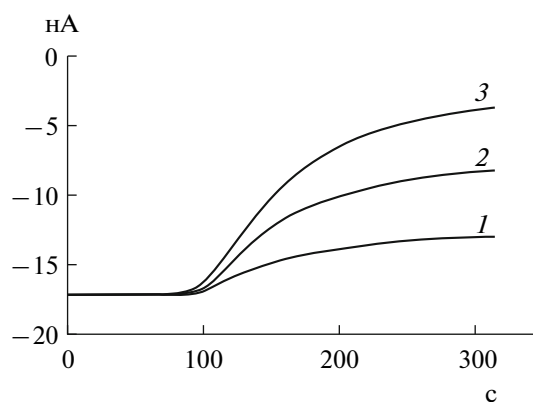
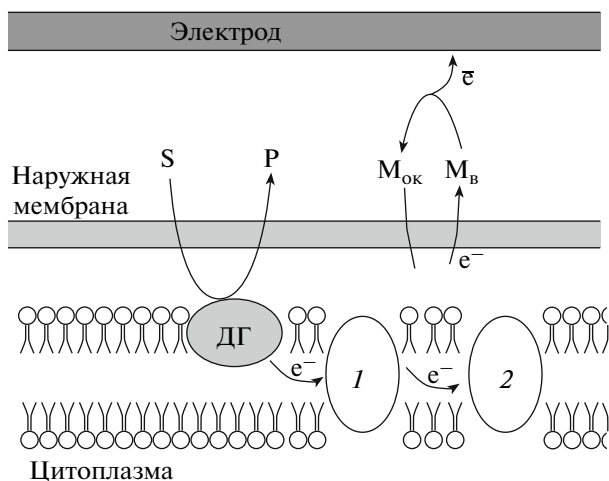


Рис. 2. Типичный отклик амперметрического БПК-бенсора биопленочного типа. Концентрация смеси глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС, мг/дм<sup>3</sup>): 1 – 10, 2 – 30, 3 – 60.



**Рис. 3.** Принцип функционирования микробного медиаторного биосенсора. S — субстрат, P — продукт, M<sub>ок</sub> — окисленная форма медиатора, M<sub>в</sub> — восстановленная форма медиатора, ДГ — мембрано-локализованная дегидрогеназа, 1, 2 — ферменты дыхательной цепи.

[13]. Общим для всех БПК-сенсоров респирометрического типа является наличие биореакторов, в которых активный ил (или индивидуальные микроорганизмы) и легко окисляемые органические вещества находятся в одной среде [14]. Образцы сточных вод постоянно транспортируются через проточный реактор, имеющий небольшой объем [15, 16]. Наиболее часто в качестве биораспознающего элемента в таких системах используют неидентифицированные микроорганизмы из сточных вод, например активный ил. Для повышения воспроизводимости результатов предложено использовать индивидуальные штаммы микроорганизмов с широким спектром окисляемых субстратов, которые относятся к родам *Trichosporon* [17], *Rhodococcus* и *Is-sachenkia* [18].

Одним из преимуществ биореакторной конфигурации распознающих элементов является то, что в таких системах можно легко заменить преобразователь. При этом не нарушается активность микроорганизмов. Кроме того, БПК-сенсор биореакторного типа имеет более стабильные рабочие характеристики по сравнению с био пленочным типом [19]. Недостатком таких устройств является стационарное расположение и невозможность обеспечения полевых измерений. Таким образом, биосенсорные системы реакторного типа имеют строго определенное назначение — непрерывный контроль процессов очистки сточных вод на соответствующих предприятиях.

**Биосенсоры медиаторного типа.** На величину БПК, определяемую с помощью микробного дыхания, влияют количество растворенного кислорода в образце. Эту нежелательную зависимость можно снизить или полностью ликвидировать за счет использования медиаторов. Так, известно, что некоторые синтетические соединения (искусственные

акцепторы электронов) способны восстанавливаться определенными микроорганизмами, т.е. конкурируют за электроны с кислородом (естественным акцептором электронов) [20]. Если эти соединения обладают обратимыми окислительно-восстановительными свойствами, то они могут служить переносчиками электронов от биокаталитических систем микроорганизмов на электрод (рис. 3).

При использовании медиаторов результаты измерений становятся практически независимыми от парциального давления кислорода в среде, если в процессе окисления восстановленного медиатора не участвуют протоны, то медиаторный электрод может быть относительно нечувствителен к изменениям pH. Таким образом, одним из наиболее перспективных направлений является разработка БПК-биосенсоров с применением медиаторов электронного транспорта [5, 20–27]. Равновесное состояние тока в таких системах наступает в течение нескольких секунд, что обеспечивает более высокую скорость анализа. В медиаторных микробных сенсорах генерируются токи, на порядки превышающие те, которые имеют место при использовании кислородного электрода [28], что обеспечивает возможность создания микросенсоров. Необходимой характеристикой биосенсоров является возможность их миниатюризации. При использовании технологии изготовления печатных электродов возможно создание недорогих одноразовых биодатчиков на основе целых клеток микроорганизмов для расширения возможностей их использования широким кругом потребителей [29].

Еще одним преимуществом применения редокс-красителей является возможность регистрации БПК в анаэробных условиях, так как ферменты дыхательной цепи микроорганизмов способны регенерироваться за счет восстановления искусственных акцепторов электронов. Предложена быстрая микробная технология измерения БПК в анаэробных условиях в присутствии косубстрата — гексацианоферрата(III) калия [30]. Добавление в измерительную кювету субстрата увеличивает катаболическую активность микроорганизмов и приводит к накоплению восстановленной формы медиатора, который успешно реокисляется на рабочем электроде; количество электричества измеряют с помощью кулонометрического преобразователя.

**Микробные биотопливные элементы как БПК-сенсоры.** Карубе с соавт. [31] разработали сенсор на основе биотопливного элемента для определения БПК<sub>60</sub>. На рис. 4 представлена схема функционирования БПК-сенсора на основе микробного биотопливного элемента (БТЭ).

Генерируемый в биотопливном элементе ток является результатом биоокисления водорода или образования продуктов из органических соединений путем восстановления под действием бактерий *Clostridium butyricum* в анаэробных условиях. Значи-

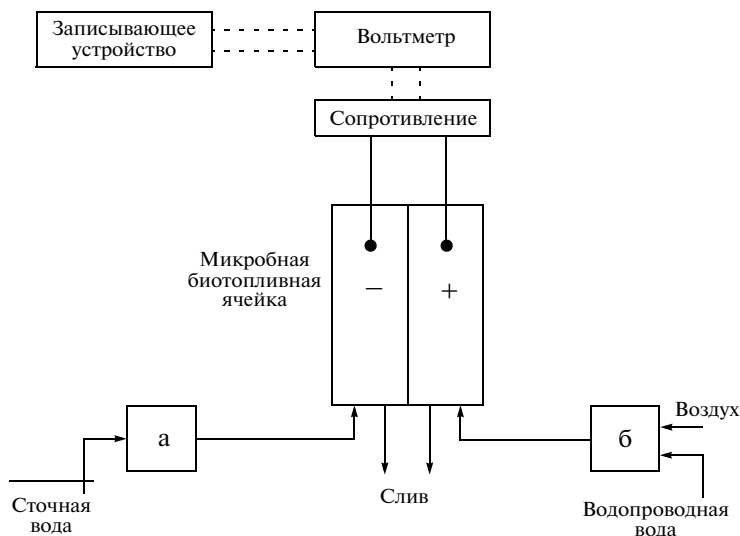


Рис. 4. Схема функционирования БПК-сенсора на основе микробного БТЭ. Устройства для удаления взвешенных частиц (а) и перемешивания водной фазы и воздуха (б).

тельный вклад в разработку БПК-сенсоров на основе безмедиаторного биотопливного элемента уже в начале нашего века внесли корейские исследователи [32–36]. Огромным достижением при разработке БПК-сенсоров стала высокая долговременная стабильность системы на основе функционирования безмедиаторного топливного элемента: сенсор работал в течение 5 лет без какого-либо обслуживания [34]. В то же время к недостаткам этой системы следует отнести большое время ответа (около 1 ч) и стационарность системы, что ограничивает область практического применения такого БПК-сенсора.

**БПК-биосенсоры оптического типа.** В связи с интенсивным развитием в конце прошлого века оптоволоконной техники появилась возможность для создания миниатюрных биосенсоров оптического типа [37–45]. При разработке оптических БПК-сенсоров существует два подхода: использование люминесцентных бактерий в биораспознающем элементе сенсора или применение люминесцирующей подложки для биоматериала. В первом случае принцип измерения основан на соотношении между интенсивностью люминесценции, продуцируемой бактериями, и клеточной ассимиляции органических соединений из образцов сточных вод [37, 38, 40, 45]. Во втором – в материал подложки вносят кислородчувствительные красители, а в качестве биораспознающего элемента в этой матрице используют целые клетки микроорганизмов. Интенсивность дыхания микроорганизмов зависит от содержания органических соединений в анализируемой пробе, которые окисляются микроорганизмами в присутствии кислорода. Изменение содержания кислорода в пленке регистрируют с помощью красителя оптическими методами [39–44]. Оптические биосенсоры обладают высо-

кой чувствительностью и позволяют определять низкие значения БПК. Важным достоинством таких систем является возможность создания микроплат и микросенсоров, биосенсоров на чипе [40, 45].

**Другие типы БПК-биосенсоров.** Методы анализа БПК с использованием биосенсоров не ограничиваются описанными выше. Так, например, разработан биосенсор для определения БПК очистных сооружений в режиме реального времени [46]. Основной рабочий принцип биосенсора основан на непрерывном измерении концентрации CO<sub>2</sub>, произведенного деградацией микроорганизмами углеродной составной стоков.

Нестандартный подход для определения БПК описан в работе [47]. Образцы сточной воды различной степени очистки шведского целлюлозного завода и чистая вода были проанализированы с помощью амперометрического биосенсора с несколькими ячейками и электродами с применением математических методов хемотронии при обработке массива полученных данных (так называемого биосенсорного “языка”). Образцы сточной воды были описаны такими параметрами, как химическое потребление кислорода, биологическое потребление кислорода, общее количество органического углерода, подавление нитрификации, ингибирование дыхания и токсичность по отношению к *Vibrio fischeri*, пресноводной морской водоросли *Pseudokirchneriella subcapita* и пресноводного ракообразного *Daphnia magna*.

Еще один подход к детекции БПК основан на регистрации изменений температуры, вызванных микробиологической деструкцией органических соединений. Этот подход основан на использовании калориметрических преобразователей; биосенсор на основе такого преобразователя описан



в работе [48]. Однако в последнее время это направление интенсивно не разрабатывается.

### БИОРАСПОЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ БПК-СЕНСОРОВ

**Микроорганизмы как основа биораспознавания.** Для создания биораспознающих элементов БПК-сенсоров используют либо чистые культуры с определенными свойствами (широкий спектр окисляемых субстратов, устойчивость к воздействию негативных факторов окружающей среды, специфичность в отношении определенных стоков), либо смесь идентифицированных микроорганизмов (искусственные ассоциации), либо индуцируемый консорциум микроорганизмов, либо активный ил и даже термически убитые бактерии. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки.

Обычно БПК-биосенсоры на основе чистой культуры имеют преимущество в стабильности функционирования биосенсорной системы. В то же время такие биосенсоры могут показывать заниженное значение БПК из-за ограниченного спектра окисляемых одним штаммом субстратов. В качестве биокатализаторов наиболее часто используют целые клетки таких бактерий, как *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*; дрожжей. *Arxula adenivorans*, *Hansenula anomala*, *Klebsiella*, *Candida*, *Trichosporon*, *Serratia marcescens*, *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи являются более предпочтительным биоматериалом для биосенсоров почти всех типов, поскольку устойчивы к негативным факторам окружающей среды и могут функционировать в распознающем элементе биосенсора длительное время [49, 50]. В то же время дрожжевые культуры подвержены контаминации сильнее бактериальных.

Для увеличения количества окисляемых субстратов используют ассоциации микроорганизмов, чаще всего состоящие из двух штаммов, например *Trichosporon cutaneum* и *Bacillus licheniformis* [51]. Как и большинство ранее описанных БПК-сенсоров, которые разрабатывались с целью улучшения сходимости и операционной стабильности, в биораспознающем элементе использовали смесь из двух идентифицированных штаммов. Это привело к расширению субстратной специфичности и стабилизации функционирования сенсора в течение длительного периода. БПК-сенсоры, основанные на сложной микробной популяции, такой, как активный ил и микробные консорциумы, имеют способность к детекции широкого спектра субстратов. Однако из-за нестабильности композиции в консорциуме со временем наблюдается нарастающая нестабильность в функционировании сенсора.

Для биосенсоров, основанных на живых клетках, требуется постоянное поддержание жизнедеятельности и поступление питательных веществ и минералов при длительном хранении. БПК-сенсоры на основе

убитых нагреванием клеток лишены этого недостатка. Такие клетки, сохранившие активность основных окисляющих ферментов, могут в дальнейшем храниться в фосфатном буфере в течение длительного периода времени при комнатной температуре [52–54].

**Иммобилизация микроорганизмов.** Микробные клетки на поверхности физико-химического преобразователя удерживаются в большинстве случаев с помощью простой адсорбции. В этом случае клетки помешают, главным образом, на пористую мембрану путем всасывания или удержания воды гидрогелями, в качестве которых применяют водный раствор поливинилового спирта [53] или поликарбонилсульфонат [54, 55]. Для миниатюризации БПК-сенсора используют метод кросс-сшивания резины (ENT-3400) под действием УФ для иммобилизации клеток на поверхности микрокислородного электрода [56]. В качестве альтернативы возможно использование одноразовых БПК-сенсоров, в которых биопленка должна легко заменяться. Разработан БПК-сенсор, биораспознающий элемент которого был приготовлен смешиванием магнитного порошка с активным илом. Намагниченный ил затем размещали на тефлоновой мембране катода и удерживали за счет магнитных взаимодействий [57].

Одним из перспективных современных направлений создания биораспознающих элементов на основе целых клеток микроорганизмов является разработка их иммобилизации в золь–гель матрицы [58, 59]. Такие элементы имеют высокую проницаемость для анализируемых проб, хорошую прочность и стабильность, а также низкую токсичность для иммобилизованных микроорганизмов. Однако получение таких биопленок представляет довольно сложную задачу, так как большинство методов образования золь–гелей основано на температурной обработке смеси реагентов.

### ХАРАКТЕРИСТИКА БПК-СЕНСОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

Эффективность биосенсора определяется его аналитическими и метрологическими характеристиками и рабочими параметрами. Они включают свойства аналитического сигнала (величина и время отклика) в ответ на добавление анализируемого вещества, обратимость системы после удаления анализируемого соединения, стабильность биодатчика, технику измерения, операционные условия и многие другие. Однако оптимизация биосенсорной системы является комплексной задачей, так как часто улучшение одного свойства приводит к ухудшению другого.

Для получения количественной информации о содержании анализируемых веществ в образце необходимо знать калибровочные характеристики БПК-биосенсора, то есть зависимость аналитического сигнала от концентрации. При описании калибров-

ки необходимо указывать, в каких условиях она была получена, и для какого калибровочного раствора. Линейность зависимости ответов БПК-биосенсора от концентрации в определенном интервале является мерой возможности определения БПК при анализе сточных вод с различными концентрациями субстратов. Широкий линейный интервал желателен для точности и надежности измерений. Линейность характеристики БПК-биосенсоров при измерении в стационарном состоянии меньше, чем при использовании начальной скорости изменения сигнала биосенсора. Кроме собственно калибровочной зависимости для сравнения эффективности биосенсоров используются такие количественные характеристики, как чувствительность и предел обнаружения [60]. Коэффициент чувствительности определяется, как значение производной от калибровочной характеристики биосенсора по концентрации измеряемого вещества; как правило, указывается максимальное значение этого параметра. Другой важной характеристикой является нижний предел обнаружения. В случае амперометрических биосенсоров можно проследить следующую закономерность. Повысить чувствительность сенсора возможно путем увеличения количества биоматериала. Однако это в определенном диапазоне количества биоматериала может приводить к смещению предела обнаружения в область более высоких концентрации анализируемого соединения. Таким образом, объективной характеристикой биосенсора может являться отношение его предела обнаружения к чувствительности.

Линейность и количественные характеристики калибровочной зависимости связаны с устройством преобразователя, типом сенсора и концентрацией клеток в распознающем элементе. БПК-сенсоры с высокой плотностью клеток в биопленке обычно более чувствительны, но имеют более узкий линейный интервал определяемых концентраций. На эти параметры также влияет чувствительность сенсора в отношении определенных типов органических соединений. БПК-сенсор может давать неодинаковые линейные характеристики при использовании разных калибровочных растворов и образцов с различным составом органических субстратов. В качестве растворов для калибровки прибора обычно используется раствор смеси глюкозы и глутаминовой кислоты (ГГС) с концентрацией 205 мг/дм<sup>3</sup> или другие смеси органических соединений (так называемые синтетические сточные воды). В настоящее время значительное внимание уделяют разработке калибровочных растворов – синтетических сточных вод, которые содержат примерный перечень тех соединений, которые являются основными компонентами анализируемых образцов воды [12, 40, 61–65]. Была предложена концепция нормализованного ответа для того, чтобы определить, подходит калибровочный раствор для данного образца или нет; с этой целью ответ биосенсора на калибровочный раствор

должен походить на ответ анализируемого образца воды [12].

Поскольку БПК-сенсоры разрабатывались для создания быстрого альтернативного аналитического метода, то анализ с помощью биосенсоров должен иметь точность, не хуже традиционного метода БПК. БПК определяют 5-суточным тестом по стандартному раствору ГГС, для которого усредненная величина БПК<sub>5</sub> составляет 205 мг/л, а стандартное отклонение – 30,5 мг/л, что составляет около 15,4%. Повторяемость измерений БПК-сенсоров биопленочного типа характеризуется стандартным отклонением 10–11%) для сенсора на основе одного штамма, и возрастает до 15% для сенсоров, основанных на ассоциации микроорганизмов [5].

Важным потребительским качеством биосенсоров является время выполнения одного анализа, которое складывается из времени ответа биосенсора и восстановления активности биорецепторного элемента. Время ответа БПК-сенсора варьирует, прежде всего, в зависимости от применяемой техники измерения. Сигнал сенсора при использовании электрохимического кислородного преобразователя (электрод типа Кларка) удается зарегистрировать за 5–25 мин при измерениях в стационарном состоянии и через 15–30 с при измерении начальной скорости. При измерениях в стационарном состоянии время установления нового устойчивого состояния зависит от концентрации субстрата в образце и значительно увеличивается при анализе образцов с высокой концентрацией субстратов. Обычно время, требуемое на восстановление базового сигнала, позволяющего приступить к очередному измерению, больше, чем время сигнала, т.е. составляет 15–60 мин при измерении по конечному значению и 5–10 мин при измерении по начальной скорости соответственно. Время восстановления также возрастает при увеличении времени измерения и может увеличиваться до нескольких часов.

Следует отметить, что сточные воды некоторых производств, например зерноперерабатывающих предприятий (спиртовые, пивоваренные, крахмалопаточные) характеризуются высоким содержанием органических загрязнений, что приводит к гибели естественных экосистем вокруг таких предприятий при неконтролируемом сбросе отработанного материала в окружающую среду. В этом случае основной проблемой является утилизация жидких отходов. Первый шаг утилизации состоит в проверке отходов на содержание органических компонентов. Для таких предприятий не только практически сложно, но и нерационально стремиться к созданию универсального БПК-сенсора. Целесообразно производить разработку биосенсоров и выбор соответствующих микроорганизмов, которые обеспечили бы наиболее эффективную детекцию БПК в соответствии с конкретным типом сточных вод,



## Характеристика и параметры БПК-сенсоров

Микроорганизм, иммобилизация	Условия измерения	Характеристика	[Ссылка], год
<b>БПК-биосенсоры на основе кислородного электрода</b>			
Клетки <i>Trichosporon cutaneum</i> и <i>Bacillus subtilis</i> , коиммобилизованные в золь-гелевую матрицу на основе кремнезема и сополимера 4-винилпиридина с поливиниловым спиртом.	Определение БПК в озерной воде и коммунальных стоках.	Время жизни сенсора более 40 сут. Пределы определения БПК 1–60 мг О <sub>2</sub> /л.	[59], 2003
Клетки <i>Trichosporon cutaneum</i> и <i>Bacillus licheniformis</i> , коиммобилизованные на тефлоновой мембране.	Калибровка по ГГС.	Время измерения 5–10 мин при нижнем пределе детекции 0.5 мг О <sub>2</sub> /л БПК.	[50], 2002
Клетки <i>Klebsiella</i> sp., выделенные из активного ила и иммобилизованные на тефлоновой мембране.	ГГС, определение лактозы в сточных водах молокозавода.	Время ответа сенсора 15 мин, время регенерации активности рецепторного элемента 20 мин. Оптимум рН и температуры 7.0 и 30°C соответственно.	[61], 2001
Клетки <i>Arxula adeninovorans</i> , иммобилизованные в поликарбомоил-сульфонат.	Определение БПК в коммунальных и промышленных сточных водах из различных источников, в том числе в стоках с высоким содержанием солей.	Сенсор стабилен в течение 40 сут. Работоспособность сохраняется без уменьшения активности. Линейная зависимость калибровки до 550 мг О <sub>2</sub> /л, стабилен в области рН 6.5–7.5.	[55], 1999
Препарат активного ила, клетки в котором убиты нагреванием при 300°C в течение 1.75 мин.	Калибровка по ГГС.	–	[52], 2005
Клетки <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , инкапсулирование в кальций-альгинатный гель.	ГГС, анализ образцов сточных вод.	Соответствие между БПК <sub>6с</sub> и БПК <sub>5</sub> характеризуется высокой корреляцией (0.95 для шести измерений).	[49], 2009
Ассоциация микроорганизмов, иммобилизованных на нейлоновой мембране.	ГГС, анализ образцов сточных вод.	Время ответа 90 мин, стабильность в течение 400 циклов измерений, хранение при 4°C, нижний предел детекции 1 мг О <sub>2</sub> /л, воспроизводимость 1.85–2.25%.	[50], 2008
Клетки <i>Gluconobacter oxydans</i> , иммобилизованные адсорбцией на стекловолоконном фильтре.	ГГС, анализ стоков пищевых производств.	Время стабильной работы 12 сут, чувствительность 0.28 нА дм <sup>3</sup> /мин мг. Длительность измерения 7–10 мин, линейный диапазон зависимости ответа биосенсора 2.0 – 20.3 мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> .	[66] 2008
Клетки <i>Arxula adeninovorans</i> , иммобилизованные адсорбцией на стекловолоконном фильтре.	ГГС, анализ стоков пищевых производств.	Время стабильной работы 28 сут, чувствительность 0,83 нА дм <sup>3</sup> /мин мг, длительность одиночного измерения 8–12 мин, линейный диапазон зависимости ответа биосенсора от БПК <sub>5</sub> 1.4–11.6 мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> .	[66] 2008
<b>БПК-биосенсоры медиторного типа</b>			
Бактерии <i>Pseudomonas fluorescens</i> , иммобилизованные в ацетатцеллюлозную мембрану, в сочетании с медиатором гексацианоферратом калия.	Синтетические сточные воды, анализ образцов сточных вод.	Диапазон определения от 15 до 260 мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> . После 35 сут. хранения ответ сенсора составлял половину от первоначального.	[21], 2001
Новые дрожжевые штаммы (SPT1 и SPT2), закрепленные на стеклогуглеродном электроде с помощью диализной мембраны, медиатор — феррицианид.	ГГС, анализ образцов сточных вод.	Оценка БПК в пределах 2–100 мг О <sub>2</sub> /л. Время измерения 5 мин.	[22], 2001

Таблица. Окончание

Микроорганизм, иммобилизация	Условия измерения	Характеристика	[Ссылка], год
<p>Дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, двухмедиаторная система с феррицианидом и липофильным медиатором менадионам.</p> <p>Стеклоуглеродный электрод, модифицированный феррицианидом в ионообменном полисилоксане. Бактерии <i>Gluconobacter oxydans</i> в графитовой пасте, медиатор ферроцен.</p>	Анализ образцов речной и морской воды.	Линейный диапазон в интервале от 1 мкМ до 10 мМ концентрации гексацианоферрата(II) ( $r^2 = 0.9995$ , относительное стандартное отклонение 1.3%).	[24], 2007
	ГГС, образцы морской воды.	Сходимость 3,8%, воспроизводимость 7,7%, корреляция БПК <sub>6с</sub> и БПК <sub>5</sub> 0.988.	[26], 2008
	ГГС, анализ стоков пищевых производств.	Время стабильной работы биосенсора 30 сут, чувствительность 4 нА дм <sup>3</sup> /мг, длительность одного измерения 7 мин, линейный диапазон зависимости ответа биосенсора от БПК <sub>5</sub> 34–680 мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup> .	[67], 2008
<b>Оптические БПК-биосенсоры</b>			
<p>Клетки <i>Pseudomonas putida</i>, адсорбированные на нитроцеллюлозной мембране.</p> <p>Рекомбинантный штамм <i>Escherichia coli</i>, содержащий фрагменты lux-оперона <i>Vibrio fisheri</i>.</p> <p>Клетки <i>Bacillus subtilis</i>, иммобилизованные в композитный золь-гель кварца и поливинилового спирта. Кислородчувствительная пленка из трис(4,7-дифенил-1,10-фенантролин) рутения(II).</p> <p>Микроорганизмы <i>Bacillus licheniformis</i>, <i>Dietzia maris</i> и <i>Marinobacter marinus</i> из морской воды, иммобилизованные в поливиниловом спирте с чувствительным к кислороду комплексом рутения.</p>	Синтетические сточные воды, образцы речной воды.	Оценка БПК в диапазоне 1–10 мг О <sub>2</sub> /л, нечувствителен к присутствию хлоридов и ионов тяжелых металлов, время измерения – 15 мин.	[39], 2000
	ГГС, образцы различных сточных вод.	—	[40], 2003
	ГГС	—	[41], 2005
	ГГС, образцы морской воды.	Время устойчивой работы до 10 мес. При использовании в качестве стандарта ГГС коэффициент корреляции в диапазоне от 0.3–40 мг О <sub>2</sub> /л БПК составил 0.985. Воспроизводимость ±2.3%.	[42], 2006 [43], 2006
<b>БПК-биосенсоры на основе БТЭ</b>			
	Мониторинг сточных вод в реальном времени	Устойчивый ток после ввода проб различной концентрации в БТЭ через 60 мин. Воспроизводимость 10% при определении БПК в концентрации 100 мг О <sub>2</sub> /л.	[35], 2004 [36], 2005
<b>БПК-биосенсоры на основе других методов регистрации</b>			
<p>Измерение концентрации СО<sub>2</sub>, произведенного деградацией микроорганизмами углеродной составной стоков. Контроль СО<sub>2</sub> с помощью инфракрасного спектрометра.</p> <p>Амперометрический биоэлектронный “язык”. Модификация электродов тирозиназой, пероксидазой хрена, ацетилхолинэстеразой и бутирилхолинэстеразой.</p> <p>Активный ил, рН-преобразователь. Определение СО<sub>2</sub> в аэробных условиях и NaOH в анаэробных.</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Колориметрический метод в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола.</p>	Определение БПК очистных сооружений.	—	[46], 2005
	Образцы сточных вод.	—	[47], 2005
	Мониторинг степени загрязнения органическими соединениями и токсичности.	—	[63], 2008
	ГГС, образцы речной воды.	Линейный интервал 1.1–22 мг О <sub>2</sub> /л <sup>-1</sup> ( $r = 0.988$ , $n = 3$ ), хранение 36 сут.	[25], 2007

т.е. создавать специализированные БПК-биосенсоры. Так, для контроля степени очистки сточных вод крахмалопаточного комбината в БПК-биосенсоре предложено использовать уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans*, которые обеспечивают высокую чувствительность по отношению к спиртам и сахарам [66, 67]; такой подход позволил разработать экспресс-метод контроля БПК стоков этого предприятия. Наиболее остро проблема загрязнения органическими соединениями окружающей среды относится к спиртовой промышленности, в частности к утилизации основного отхода производства — послеспиртовой барды. С этой целью разработан биосенсорный метод определения общего содержания легкоокисляемых органических соединений в отходах ферментационных производств [68, 69]. Метод анализа с использованием разработанного биосенсора характеризуется высокой скоростью, высокой чувствительностью и селективностью. Авторы отмечают, что биосенсоры, предназначенные для экологического контроля стоков пищевых производств, можно использовать и для мониторинга ферментационных процессов на этих производствах, это позволит сократить затраты на оборудование и увеличить экономическую отдачу предприятия.

Более подробно основные характеристики и параметры БПК-биосенсоров различных типов представлены в таблице.

Таким образом, определение БПК с помощью биосенсоров является достаточно развитым направлением аналитической биотехнологии. Однако БПК-сенсоры все еще имеют ряд ограничений, которые затрудняют их применение, поэтому проведение в России собственных исследований и выполнение работ, создающих основу для выпуска коммерческих БПК-биосенсоров является актуальным. Биосенсорные анализаторы БПК представляют собой надежные, простые и дешевые аналитические инструменты и могут с успехом использоваться для контроля водных экосистем наряду с традиционными методами определения БПК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госконтракта 02.740.11.0296 и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы (ГК П258, ГК П551).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *D'Souza S.F.* // *Biosen. Bioelectron.* 2001. V. 16. P. 337–353.
2. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* Washington: Amer. Publ. Health Association, 1992. P. 5.1–5.6.
3. *Karube I., Mitsuda S., Matsunaga T., Susuki S.* // *Biotechnol. Bioeng.* 1977. V. 19. № 10. P. 1535–1547.
4. *Hikuma M., Suzuki H., Yasuda T., Karube L., Suzuki S.* // *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1979. V. 8. P. 289–297.
5. *Liu J., Mattiasson B.* // *Water Res.* 2002. V. 36. P. 3786–3802.
6. *Rodriguez-Mozaz S., de Alda M.J.L., Barcelo D.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. № 4. P. 1025–1041.
7. *Bourgeois W., Burgess J.E., Stuetz R.M.* // *J. Chem. Techn. Biotechn.* 2001. V. 76. P. 337–348.
8. *Baeumner A.J.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 377. P. 434–445.
9. *Walmsley R.M., Keenan P.* // *Biotechn. Bioprocess Engineering.* 2000. V. 5. № 6. P. 387–394.
10. *Tan T.C., Li F., Neoh K.G.* // *Sens. Act. B.* 1993. № 10. P. 137–142.
11. *Yang Z., Sasaki S., Karube I., Suzuki H.* // *Anal. Chim. Acta.* 1997. V. 357. № 1–2. P. 41–50.
12. *Liu J., Bjornsson L., Mattiasson B.* // *Biosen. Bioelectron.* 2000. V. 14. № 12. P. 883–993.
13. *Iranpour R., Zermeno M.* // *Water Environ. Res.* 2008. V. 80. № 4. P. 24–29.
14. *Spanjers H., Vanrolleghem P., Olsson G., Dold P.* // *Water Sci. Technol.* 1996. V. 34. № 31. P. 117–143.
15. *Spanjers H., Klapwijk A.* // *Water Sci. Technol.* 1991. V. 24. № 7. P. 29–32.
16. *Spanjers H., Olsson G., Klapwijk A.* // *Water Sci. Technol.* 1993. V. 28. № 11–12. P. 401–415.
17. *Sohn M.-J., Lee J.-W., Chung C., Ihn G.-S., Hong D.* // *Anal. Chim. Acta.* 1995. V. 313. № 3. P. 221–228.
18. *Heim S., Schnieder I., Binz D., Vogel A., Bilitewski U.* // *Biosen. Bioelectron.* 1999. V. 14. P. 187–193.
19. *Praet E., Reuter V., Gaillard T., Vassel J.-L.* // *Trends Anal. Chem.* 1995. V. 14. № 7. P. 371–378.
20. *Tkac J., Vostiar I., Gorton L., Gemeiner P., Sturdik E.* // *Biosen. Bioelectron.* 2003. V. 18. № 9. P. 1125–1134.
21. *Yoshida N., Yano K., Morita T., McNiven S.J., Nakamura H., Karube I.* // *Analyst.* 2000. V. 125. № 12. P. 2280–2284.
22. *Trosok S.P., Driscoll B.T., Luong J.H.T.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 56. № 3–4. P. 550–554.
23. *Yoshida N., Hoashi J., Morita T., McNiven S.J., Nakamura H., Karube I.* // *J. Biotechnol.* 2001. V. 88. № 3. P. 269–275.
24. *Nakamura H., Suzuki K., Ishikuro H., Kinoshita S., Koizumi R., Okuma S., Gotoh M., Karube I.* // *Talanta.* 2007. V. 72. № 1. P. 210–216.
25. *Nakamura H., Kobayashi S., Hirata Y., Suzuki K., Mogi Y., Karube I.* // *Anal. Biochem.* 2007. V. 369. № 2. P. 168–174.
26. *Chen H., Ye T., Qiu B., Chen G., Chen X.* // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 612. № 1. P. 75–82.
27. *Liua L., Shanga L., Liua C., Liua C., Zhanga B., Dong S.* // *Talanta.* 2010. V. 81. № 4–5. P. 1170–1175.
28. *Arlyapov V.A., Chigrinova E.Yu., Ponamoreva O.N., Reshetilov A.N.* // *Starch Science and Technology* / Ed. Zaikov G.E. New York: Nova Science Publisher, 2008. P. 161–175.
29. *Farré M., Barceló D.* // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001. № 371. P. 467–473.
30. *Pasco N., Baronian K., Jeffries C., Webber J., Haya J.* // *Biosen. Bioelectron.* 2004. V. 20. P. 524–532.
31. *Karube I., Matsunaga T., Tsuru S., Suzuki S.* // *Biotechnol. Bioeng.* 1977. V. 19. № 11. P. 1727–1760.
32. *Kim M., Youn S.M., Shin S.H., Jang J.G., Han S.H., Hyun M.S., Gadd G.M., Kim H.J.* // *J. Environ. Monit.* 2003. V. 2. № 5. P. 640–643.
33. *Kim B.H., Chang I.S., Gil G.C., Park H.S., Kim H.J.* // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. P. 541–545.

34. Moon H., Chang I.S., Kang K.H., Jang J.K., Kim B.H. // *Biotechnol. Lett.* 2004. V. 26. № 22. P. 1717–1738.
35. Chang I.S., Jang J.K., Gil G.C., Kim M., Kim H.J., Cho B.W., Kim B.H. // *Biosen. Bioelectron.* 2004. V. 19. № 6. P. 607–613.
36. Chang I.S., Moon H., Jang J.K., Kim B.H. // *Biosen. Bioelectron.* 2005. V. 20. № 9. P. 1856–1859.
37. Hyun C.-K., Tamiya E., Takeuchi T., Karube I. // *Biotechnol. Bioeng.* 1993. V. 41. P. 1107–1118.
38. Karube I., Yokoyama K. // *NATO ASI Ser. E.* 1993. V. 252. P. 281–288.
39. Chee G.-J., Nomura Y., Ikebukuro K., Karube I. // *Biosen. Bioelectron.* 2000. V. 15. № 7–8. P. 371–376.
40. Sakaguchi T., Kitagawa K., Ando T., Murakami Y., Morita Y., Yamamura A., Yokoyama K., Tamiya E. // *Biosen. Bioelectron.* 2003. V. 19. № 2. P. 115–121.
41. Kwok N.-Y., Dong S., Lo W., Wong K.-Y. // *Sens. Act. B.* 2005. V. 110. № 2. P. 289–298.
42. Lin L., Xiao L.-L., Huang S., Zhao L., Cui J.-S., Wang X.-H., Chen X.N. // *Biosen. Bioelectron.* 2006. V. 21. № 9. P. 1703–1709.
43. Jiang Y., Xiao L.-L., Zhao L., Chen X., Wang X., Wong K.-Y. // *Talanta.* 2006. V. 70. № 1. P. 97–103.
44. Pang H.L., Kwok N.Y., Chan P.H., Yeung C.H., Lo W., Wong K.Y. // *Environ. Sci. Technol.* 2007. V. 4. № 11. P. 4038–4082.
45. Sakaguchi T., Morioka Y., Yamasaki M., Iwanaga J., Beppu K., Maeda H., Morita Y. // *Biosen. Bioelectron.* 2007. V. 22. № 7. P. 1345–1350.
46. Vaiopoulou E., Melidis P., Kampragou E., Aivasidis A. // *Biosen. Bioelectron.* 2005. V. 21. № 2. P. 365–371.
47. Tønning E., Sapelnikova S., Christensen J., Carlsson C., Winther-Nielsen M., Dock E., Solna R., Skladal P., Nørgaard L., Ruzgas T., Emnéus J. // *Biosen. Bioelectron.* 2005. V. 21. № 4. P. 608–617.
48. Mattiasson B., Larsson P.O., Mosbach K. // *Nature.* 1977. V. 268. P. 519–520.
49. Seo K.S., Choo K.H., Chang H.N., Park J.K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 83. № 2. P. 217–223.
50. Dhall P., Kumar A., Joshi A., Saxena T.K., Manoharan A., Makhijani S.D., Kumar R. // *Sens. Act. B.* 2008. V. 133. № 2. P. 478–483.
51. Suriyawattanakul L., Surareungchai W., Sritongkam P., Tanticharoen M., Kirtikara K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 59. № 1. P. 40–44.
52. Tan T.C., Lim E.W.C. // *Sens. Act. B.* 2005. V. 107. № 2. P. 546–551.
53. Qian Z., Tan T.C. // *Wat. Res.* 1999. V. 33. № 13. P. 2923–2928.
54. Tag K., Lehmann M., Chan C., Renneberg R., Riedel K., Kunze G. // *Sens. Act. B.* 2000. V. 67. P. 142–148.
55. Chan C., Lehmann M., Chan K., Chan P., Chan C., Gruendig B., Kunze G., Renneberg R. // *Biosen. Bioelectron.* 2000. V. 15. № 7. P. 343–353.
56. Lehmann M., Chan C., Lo A., Lung M., Tag K., Kunze G., Riedel K., Gruendig B., Renneberg R. // *Biosen. Bioelectron.* 1999. V. 14. P. 295–302.
57. Yang Z., Suzuki H., Sasaki S., Karube I. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996. V. 46. № 1. P. 10–14.
58. Sakai Y., Abe N., Takeuchi S., Takahashi F. // *J. Ferment Bioeng.* 1995. V. 80. № 3. P. 300–303.
59. Chen D., Cao Y., Liu B., Kong J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 372. P. 737–739.
60. Jianbo J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S. // *Biosen. Bioelectron.* 2003. V. 18. № 8. P. 1023–1029.
61. Thévenot R.D., Toth K., Durst A.D., Wilson G.S. // *Biosen. Bioelectron.* 2001. V. 16. P. 121–131.
62. Kim M.-N., Park K.-H. // *Sens. Act. B.* 2001. V. 80. P. 9–14.
63. Melidis P., Vaiopoulou E., Aivasidis A. // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2008. V. 31. № 3. P. 277–352.
64. Tanaka H., Nakamura E., Minamiyama Y., Toyoda T. // *Water Sci. Technol.* 1994. V. 30. № 4. P. 215–227.
65. Jung J., Sofer S., Lakhwala F. // *Biotechnol. Tech.* 1995. V. 9. № 4. P. 289–294.
66. Арляпов В.А., Понаморева О.Н., Алферов В.А., Рогова Т.В., Блохин И.В., Ченкова И.Ф., Решетиллов А.Н. Вода: химия и экология. 2008. № 3. С. 20–22.
67. Arlyapov V.A., Chigrinova E.Yu., Ponomoreva O.N., Reshetilov A.N. Express Detection of BOD in Wastewaters of Starch-Processing Industry. *Starch Science and Technology* / Ed. Zaikov G.E. New York: Nova Science Publisher. 2008. P. 161–175.
68. Решетиллов А.Н., Алферов В.А., Леденев В.П., Сергеев В.И. // Ликероводочное производство и виноделие. 2008. Т. 3. № 99. С. 20–22.
69. Решетиллов А.Н., Алферов В.А., Леденев В.П., Сергеев В.И. // Ликероводочное производство и виноделие. 2008. Т. 3. № 100. С. 24–27.

## Microbial Biosensors for Detection of Biological Oxygen Demand (a Review)

O. N. Ponomoreva<sup>a</sup>, V. A. Arlyapov<sup>a</sup>, V. A. Alferov<sup>a</sup>, and A. N. Reshetilov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Tula State University, Tula, 300600 Russia  
e-mail: chem@tsu.tula.ru

<sup>b</sup> Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia  
e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Received September 4, 2009

**Abstract**—The review briefs recent advances in application of biosensors for determining biological oxygen demand (BOD) in water. Special attention is focused on the principles of operation of microbial BOD sensors; the information about biorecognition elements in such systems and the methods used for immobilization of biological components in film biosensors is summarized. Characteristics of some BOD sensor models are considered in detail.

УДК 576.8.094.7+581.138.1

## ГИПОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС И ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕРИБАКТЕРОИДНОЙ МЕМБРАНЫ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВ

© 2011 г. В. В. Крылова, С. Ф. Измайлов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276

e-mail: nitrogenexchange@mail.ru

Поступила в редакцию 03.08.2009 г.

При действии гипоксического стресса на корневую систему бобов (*Vicia faba* L.) происходило снижение функционирования на перибактероидной мембране клубеньков  $H^+$ -АТФазы и опосредованного через нее транспорта дикарбоксилатов (малат и сукцинат) — основных углеродсодержащих метаболитов, участвующих в энергообеспечении бактериоидов, что приводило к смене типов взаимоотношений партнеров симбиоза от мутуализма к комменсализму и за счет этого возрастающей доминанте эукариот над прокариотами.

Азотфиксирующие корневые клубеньки бобовых приспособлены к недостатку кислорода в окружающей среде, и необходимые микроаэрофильные условия для работы нитрогеназы создаются за счет поддержания парциального давления кислорода в бактериоидсодержащей ткани на наномолярном уровне, что обеспечивается барьерными функциями коры и наличием леггемоглобина в цитозоле клеток [1–3]. Кислород, связываясь с леггемоглобином, передается симбиосомам (бактероидам), где и используется для их энергетических нужд, в том числе и для самого процесса фиксации азота [4]. Однако длительное действие гипоксии вызывает ингибирование азотфиксирующей активности бактериоидов [5, 6] вследствие того, что продукт нитратного дыхания —  $NO$  блокирует кислородтранспортную функцию леггемоглобина и активность нитрогеназы [7, 8]. Параллельно при остром дефиците кислорода в среде происходит значительное закисление цитоплазмы эукариота вследствие увеличения концентрации протонов [9], развивается энергетический голод бактериоидов из-за ослабленного импорта восстановленных углеродсодержащих метаболитов и уменьшается синтез АТФ в дыхательной цепи бактериоидов, что предполагает нарушение бобово-ризобияльных взаимоотношений на уровне функционирования транспортных систем перибактероидной мембраны (ПБМ). Среди них важную роль играет идентифицированная и функционально охарактеризованная на ПБМ  $H^+$ -АТФаза Р-типа, участвующая в энергизации мембраны, регулировании рН перибактероидного пространства (ПБП), а также в обмене метаболитами и ионами между партнерами симбиоза [10–12]. В связи с этим вопрос о том, насколько стабильным и взаимосвязанным в условиях действия гипоксии остается функционирование транспортных систем ПБМ представляется актуальным не толь-

ко с точки зрения понимания особенностей взаимоотношения про- и эукариот, но и устойчивости всей азотфиксирующей системы.

Цель работы — изучение транспорта малата, сукцината и глутамата через ПБМ, а также функционирования  $H^+$ -АТФазы ПБМ симбиосом клубеньков при затоплении корневой системы бобов.

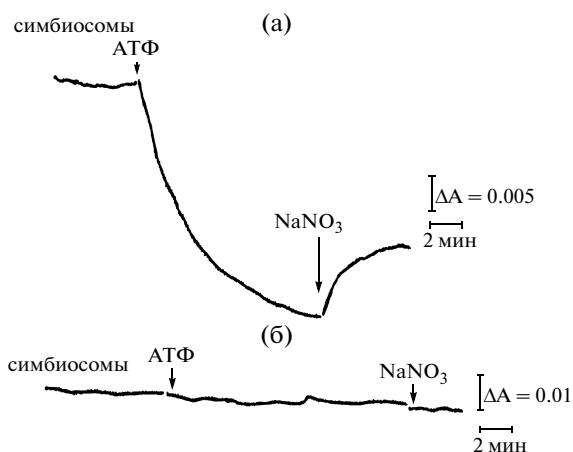
### МЕТОДИКА

Использовали бобы *Vicia faba* L., сорт Русские черные, инокулированные эффективным штаммом *Rhizobium leguminosarum* 501, любезно предоставленным доктором А. Классен (Латвийский сельскохозяйственный университет). Растения выращивали, как описано ранее [13]. Гипоксию создавали, затопляя растения в сосудах на 3–5 см водой над поверхностью песка, в котором они выращивались. Время экспозиции составляло 12, 21, 48, 72 и 120 ч.

Фракцию симбиосом с интактной ПБМ выделяли из клубеньков бобов по разработанному в лаборатории методу путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности перкола [14].

Активность  $H^+$ -АТФазы ПБМ определяли спектрофотометрически (Specol М-40, Германия) по регистрации АТФ-зависимой генерации градиента рН ( $\Delta pH$ ) и мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) на ПБМ, используя проникающий  $\Delta pH$ -индикатор акридиновый оранжевый (АО) и чувствительный к изменению потенциала  $\Delta\psi$ -зонд оксонол VI, при 492 или 590 нм соответственно [15, 16].

Критерием транспорта метаболитов через ПБМ служило их действие на АТФ-зависимое закисление ПБП, а также на закисление в бескальевой среде инкубации, регистрируемое спектрофотометрически с применением АО. Величину этого изменения оценивали по начальной скорости закисления ПБП



**Рис. 1.** Кинетика спектральных изменений оксонола VI, вызванных АТФ-зависимой энергизацией ПБМ симбиосом зрелых клубеньков контрольных растений (а) и подвергнутых действию гипоксии 72 ч (б). Симбиосомы суспендировали в основной среде инкубации, рН 6.5, содержащей оксонол VI и 2 мМ  $MgSO_4$ . Стрелками указано добавление 2 мМ АТФ и 20 мМ  $NaNO_3$ .

и выражали в оптических единицах на мг белка симбиосом в минуту (ОЕ/мг белка мин).

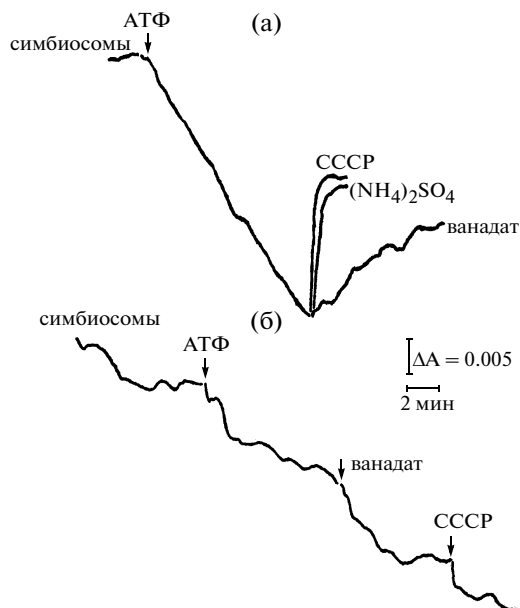
С целью большей достоверности получаемых результатов при изучении транспорта метаболитов через ПБМ использовали другой методический подход — измерение интенсивности светорассеяния суспензии симбиосом в результате их осмотического набухания или сжатия при внесении исследуемых метаболитов в среду инкубации. Регистрацию также осуществляли спектрофотометрически при 550 нм в двухлучевом режиме [17].

Белок определяли по методу Бредфорд. При регистрации изменения интенсивности светорассеяния симбиосом его концентрация в пробах составляла 100–150 мкг, а в остальных случаях — 50–70 мкг.

Основная среда инкубации содержала 0.4 М сорбит, 20 мМ *Nepes*-бис-трис-пропан (БТП) (рН 6.5 или 7.0) и 16 мкМ АО или 4 мкМ оксонол VI. Концентрации остальных компонентов, вносимых в инкубационную смесь, указаны в подписях к рисункам. Использовали: сорбит — “Calbiochem” (США); БТП, *Nepes*, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (СССР), валиномицин — “Sigma” (США); ЭГТА, MES, АТФ, АО, малат, сукцинат, глутамат — “Serva” (Германия), оксонол VI — “Molecular Probes” (США); катион тетрафенилфосфония (ТФФ) — “Fluka” (Швейцария). Остальные реактивы отечественного производства квалификации х.ч..

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных рис. 1а, у растений, не подвергнутых действию стресса, за счет функциониро-

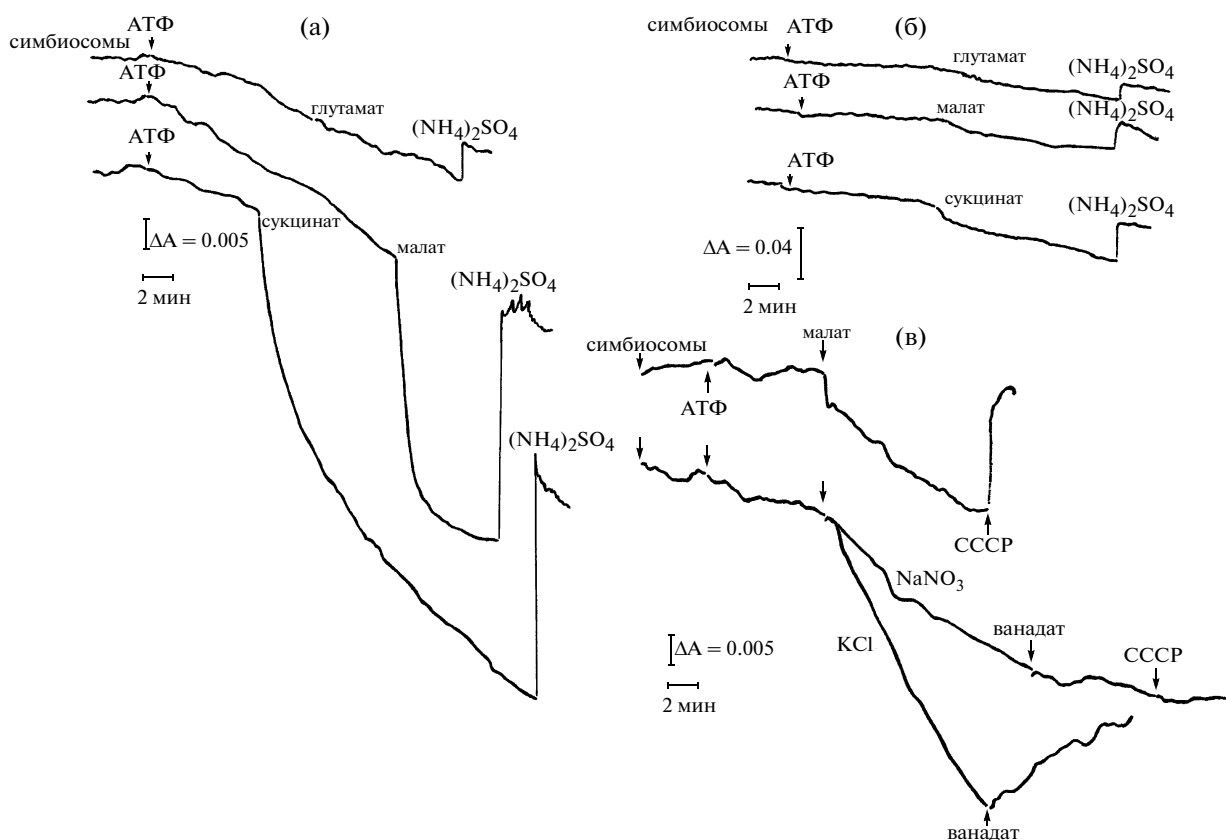


**Рис. 2.** Кинетика АТФ-зависимого закисления ПБП симбиосом контрольных растений (а) и подвергнутых действию гипоксии 120 ч (б). Симбиосомы суспендировали в основной среде инкубации, рН 6.5, содержащей АО, 2 мМ  $MgSO_4$ , 30 мМ КСl. Стрелками указано добавление 2 мМ АТФ, 2 мкМ СССР, 80 мкМ ванадата и 10 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ .

вания  $H^+$ -АТФазы на ПБМ создавался мембранный потенциал ( $\Delta\psi$ ). О его создании на ПБМ свидетельствовало регистрируемое изменение оптического поглощения  $\Delta\psi$ -индикатора оксонола VI и сброс  $\Delta\psi$  проникающим анионом  $NO_3^-$ . При действии на растения гипоксии в течение 48 ч генерация  $H^+$ -АТФазой  $\Delta\psi$  на ПБМ резко падала, а через 72 ч уже отсутствовала (рис. 1б).

Изменение абсорбции проникающего индикатора АО при добавлении  $Mg^{2+}$ -АТФ в инкубационную среду, содержащую симбиосомы из зрелых, активно фиксирующих азот клубеньков, вызывало закисление ПБП вследствие создания локализованной на ПБМ  $H^+$ -АТФазой градиента рН (рис. 2а). Градиент рН быстро диссипировался при добавлении в среду инкубации  $(NH_4)_2SO_4$ , протонофора СССР, а также ванадата — ингибитора АТФаз Р-типа. Абсорбция АО оставалась практически неизменной на протяжении всего времени регистрации, когда в среду инкубации симбиосом не вводили какие-либо компоненты. Это свидетельствовало об отсутствии текучести ПБМ для протонов. В случае действия гипоксии спектральный сдвиг абсорбции АО к 120 ч не был связан с активностью  $H^+$ -АТФазы, о чем говорит отсутствие сброса градиента рН при добавлении  $(NH_4)_2SO_4$  и СССР, а также ингибирования помпы ванадатом (рис. 2б).





**Рис. 3.** Действие малата, сукцината, глутамата и анионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{NO}_3^-$  на величину АТФ-зависимого закисления ПБП симбиосом клубеньков контрольных растений (а, в) и подвергнутых действию гипоксии 72 ч (б). Симбиосомы суспендировали в среде инкубации, рН 7.0, содержащей АО, 2 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 30 мМ  $\text{KCl}$  (а, б), и в бескальциевой среде (в). Стрелками указано добавление 2 мМ АТФ, 10 мМ малата, сукцината, глутамата, 10 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 мМ  $\text{NaNO}_3$ , 2 мкМ  $\text{CCCP}$ , 100 мкМ ванадата, 30 мМ  $\text{KCl}$ .

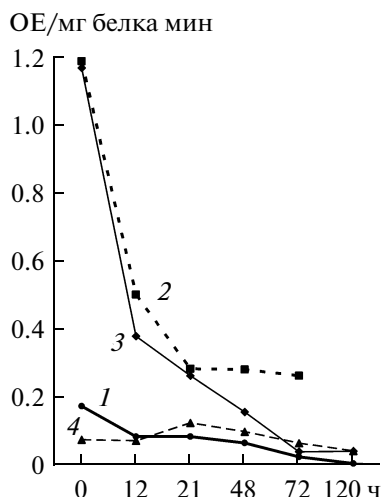
Изучение транспорта метаболитов через ПБМ симбиосом контрольных растений по регистрации их действия на АТФ-зависимое закисление ПБП показало, что малат и сукцинат резко стимулировали генерацию  $\Delta\text{pH}$  на ПБМ симбиосом (рис. 3а). Генерация градиента рН при добавлении  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  не наблюдалась. Глутамат не изменял АТФ-зависимое закисление ПБП. В условиях действия на растения гипоксии регистрировали некоторое увеличение АТФ-зависимого закисления ПБП при добавлении в среду инкубации как малата, сукцината, так и глутамата, однако скорость транспорта дикарбоксилатов по сравнению с контрольными растениями снижалась (рис. 3б).

Ускорение дикарбоксилатами АТФ-зависимой генерации градиента рН у контрольных бобов имело кинетику аналогичную действию противоионов  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , увеличивающих АТФ-зависимое закисление ПБП (рис. 3в). Как известно, транспорт дикарбоксилатов в симбиосомы является потенциалзависимым и связан с генерацией положительного потенциала

на внутренней стороне ПБМ [11, 12]. Закисление ПБП наблюдалось как при переносе дикарбоксилата, так и за счет конверсии  $\Delta\psi$  электрохимического градиента протонов, генерируемого  $\text{H}^+$ -АТФазой в  $\Delta\text{pH}$ , что и наблюдали в случае добавки анионов  $\text{Cl}^-$  или  $\text{NO}_3^-$ .

Изучение динамики описанных выше процессов (рис. 4) в течение 120 ч действия гипоксии показало, что в течение 12 ч скорость АТФ-зависимой генерации градиента рН на ПБМ по сравнению с таковой для растений, не подвергнутых стрессу (0.17 ОЕ/мг белка мин) снижалась в 2 раза и сохранялась на этом уровне до 21 ч. Затем происходило менее резкое падение скорости переноса протонов через ПБМ: через 48 ч — до 30%, а через 72 ч — до 10% от начальной скорости.

Действие малата и сукцината на генерацию АТФ-зависимого градиента рН ПБМ у контрольных растений выявило достаточно высокую скорость их транспорта через мембрану — до 1.0 ОЕ/мг белка мин (рис. 4). В условиях действия гипоксии

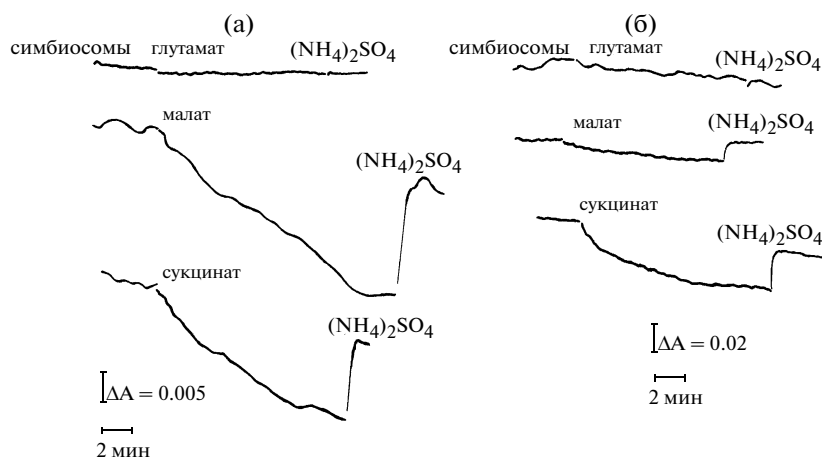


**Рис. 4.** Скорость АТФ-зависимого переноса протонов и метаболитов через ПБМ корневых клубеньков бобов при действии гипоксии 12–120 ч. 1 –  $H^+$ -АТФаза, 2 – сукцинат, 3 – малат, 4 – глутамат. Представлены среднearифметические значения измерений, выполненных на различных препаратах симбиосом из одной партии растений и повторенных 3–6 раз.

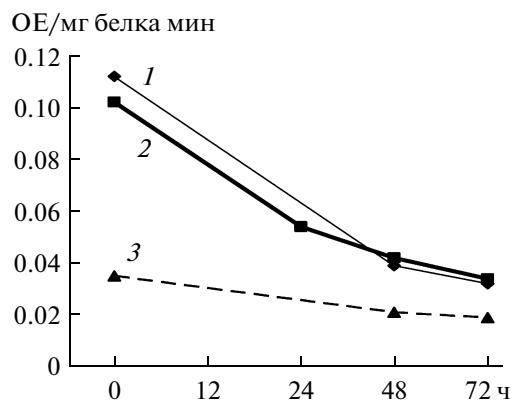
скорость транспорта малата падала до 0.3 ОЕ/мг белка мин, о чем можно судить по изменению скорости АТФ-зависимого закисления ПБП за период действия 12 ч гипоксии (рис. 4). Затем до 21 ч перенос малата снижался еще в 2 раза и далее резко падал. После 72 ч транспорт малата практически уже отсутствовал. Скорость транспорта сукцината также стремительно уменьшалась до 21 ч, оставаясь практически постоянной с 21 до 72 ч действия стресса. Это может быть связано с тем, что в сукцинате бактериоды испытывают большую потребность, чем в малате как основном дыхательном суб-

страте для *Rhizobium leguminosarum* [18]. При наличии в среде инкубации симбиосом глутамата на протяжении всего периода действия гипоксии на растения наблюдалось снижение рН в ПБП. Можно отметить в данном случае лишь некоторое увеличение закисления ПБП после 21 ч действия гипоксии. Однако скорость поступления глутамата в симбиосомы до 21 ч была гораздо ниже, чем для малата и сукцината. После 48 ч скорость транспорта глутамата была уже сопоставима с таковой для малата (рис. 4). Это свидетельствует о возможном его поступлении в симбиосомы на уровне пассивного транспорта по градиенту концентрации.

Транспорт метаболитов изучался также с использованием другого методического подхода – по их действию на пассивное закисление ПБП. Как видно на рис. 5а, добавление малата и сукцината в бескальциевую среду инкубации симбиосом, полученных из контрольных растений, стимулировало процесс пассивного закисления ПБП. Наблюдаемая кинетика изменения абсорбции АО объяснялась тем, что первоначальное закисление ПБП происходило благодаря формированию на ПБМ отрицательного диффузионного потенциала, связанного с выходом из симбиосом ионов  $K^+$ , что, в свою очередь, вызывало импорт в ПБП протонов. По достижении стационарного уровня отрицательный потенциал вновь генерировался на ПБМ за счет входа анионов дикарбоксилатов. Это вызывало новую волну поступления  $H^+$  и дальнейшее закисление ПБП. Генерация градиента рН при добавлении  $(NH_4)_2SO_4$  отсутствовала. Кинетика изменения абсорбции АО, наблюдаемая при добавлении глутамата, который при данном значении рН среды также находится в виде аниона, имела иной характер. Глутамат не вызывал закисления ПБП.



**Рис. 5.** Кинетика пассивного закисления ПБП симбиосом контрольных растений (а) и подвергнутых действию гипоксии 72 ч (б). Симбиосомы суспендировали в бескальциевой среде инкубации рН 6.5, содержащей АО. Стрелками указано добавление 10 мМ малата, сукцината, глутамата и 10 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ .

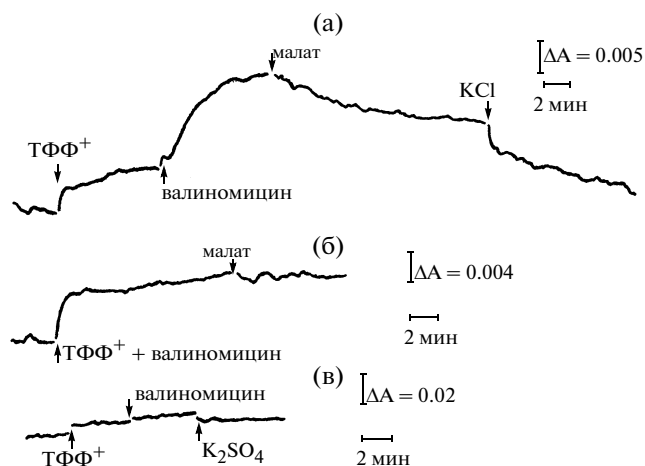


**Рис. 6.** Скорость изменения интенсивности светорассеяния суспензии симбиосом контрольных растений и подвергнутых действию гипоксии 12–72 ч, вызванного добавлением 10 мМ малата (1), сукцината (2) и глутамата (3). Представлены среднеарифметические значения измерений, выполненных на различных препаратах симбиосом из одной партии растений и повторенных 3–5 раз.

В условиях гипоксии действие дикарбоксилатов на пассивное закисление ПБП симбиосом в бескальевой среде становилось менее интенсивным, о чем свидетельствовали более пологие кинетические кривые по сравнению с таковыми, полученными на симбиосомах из клубеньков контрольного варианта. Действие глутамата было аналогично малату и сукцинату (рис. 5б).

Расчеты начальной скорости транспорта метаболитов показали, что она была на порядок ниже (0.1 OE/мг белка мин), чем скорость их транспорта на фоне генерации мембранного потенциала  $H^+$ -АТФазой ПБМ у растений, не подвергнутых стрессу. Она оставалась на этом уровне в течение 72 ч действия гипоксии, а затем снижалась еще в 2 раза, что говорит о частичном сохранении проницаемости ПБМ в отношении ионов  $K^+$  и  $H^+$ . Как видим, использование данного подхода позволило выявить вторую составляющую общего транспорта метаболитов через ПБМ, связанную с  $K^+$ -диффузионным потенциалом, но она оказалась менее значимой, чем зависящая от мембранного потенциала.

Об этом же говорят и данные, полученные при изучении пассивного транспорта метаболитов с использованием третьего методического подхода — спектрофотометрической регистрации изменения интенсивности светорассеяния суспензии симбиосом в результате их сжатия или набухания под действием метаболитов и  $K^+$  [17]. В подвергнутых стрессу растениях скорость проникновения малата и сукцината ПБМ через 72 ч действия гипоксии уменьшалась в 3 раза (с 0.11 до 0.03 OE/мг белка мин),



**Рис. 7.** Кинетика изменения интенсивности светорассеяния суспензии симбиосом контрольных растений (а) и подвергнутых действию 48 ч гипоксии (б, в) в бескальевой среде инкубации, обусловленного действием на них мембраноактивных соединений. Стрелками указано добавление 10 мМ малата, 30 мМ KCl или  $K_2SO_4$ , 1 мМ ТФФ<sup>+</sup>, 2 мкМ валиномицина.

а глутамата — постепенно при несколько более низком уровне процесса (рис. 6).

Интенсивность светорассеяния суспензии симбиосом регистрировали и по выходу  $K^+$  в бескальевую среду инкубации вследствие деполаризации ПБМ после внесения липофильного катиона — ТФФ. С помощью этого мембраноактивного соединения моделировали осмотическое сжатие симбиосом, вызывая увеличение интенсивности светорассеяния симбиосом. Существенное увеличение процесса происходило при последующем добавлении  $K^+$ -ионофора валиномицина, повышающего проницаемость ПБМ для  $K^+$ . Оказалось, что у растений контрольного варианта внесение в среду ТФФ и валиномицина заметно увеличивало интенсивность светорассеяния. Последующее добавление малата, а также сукцината приводило к ее заметному снижению, т.е. осмотическому набуханию (рис. 7а). В присутствии глутамата интенсивность светорассеяния симбиосом оставалась практически неизменной. В препаратах симбиосом растений, подвергнутых действию гипоксии, интенсивность светорассеяния изменялась слабо на добавление мембрано-активных соединений, метаболитов (рис. 7б) и  $K_2SO_4$  (рис. 7в).

Таким образом, использование трех различных методических подходов позволило заключить, что при действии на растения гипоксии происходило снижение активности  $H^+$ -АТФазы ПБМ, падение как опосредованной через нее, так и зависимой от  $K^+$ -диффузионного потенциала, транслокации дикарбоксилатов к бактериоидам. Это, в конечном счете, приводило к нарушению рН- и осмотического баланса симбиосом.

В связи с приведенными результатами исследований заслуживают упоминания данные литературы об общих изменениях метаболизма растений, подвергнутых действию гипоксии. Речь идет об ослаблении активного фотосинтеза и, прежде всего, задержке накопления дикарбоксилатов, снижении их транспорта в корневую систему и интенсификации гликолитических процессов при одновременной редукции цикла трикарбоновых кислот [19, 20]. Совокупность указанных процессов следует рассматривать, как первую фазу в изменении метаболизма, дистанционно влияющую на функционирование азотфиксирующих бактерий в клубеньках. Вторая, по существу ключевая фаза, связанная с доступностью субстратов, необходимых для азотфиксации в бактероидах, всецело зависит от особенностей функционирования ПБМ и ее транспортных систем. Протонная помпа ПБМ координирует и облегчает обмен малата и  $\text{NH}_4^+$  между растением и бактериоидом, что помогает поддерживать рН-баланс в ПБП [12]. Последнее важно для стабильности симбиоза, т.к. чрезмерное закисление ПБП может ингибировать азотфиксацию, что приводит к раннему старению инфицированных клеток [21].

Полученные в работе результаты по уменьшению скорости генерации на ПБМ градиента рН и мембранного потенциала у растений под действием гипоксии указывают на снижение активности электрогенного протонного насоса, что приводит к закислению ПБП. На этом фоне падение динамики транспорта дикарбоксилатов к бактериоидам приводит к уменьшению интенсивности азотфиксации и образованию  $\text{NH}_4^+$  в ПБП. Изменение рН-статуса ПБП и цитозоля инфицированной клетки, в свою очередь, может активировать локализованные в этом компартменте литические ферменты – протеазы, липазы, кислые фосфатазы,  $\alpha$ ,  $\beta$ -глюкозидазы, которые при длительном действии стрессора вызывают сначала структурные изменения в организации симбиотической системы, а далее – лизис бактериоидов. Симбиосома в результате всего наделяется функцией вторичной лизосомы [22]. Такого рода, неспецифические реакции, происходящие на уровне взаимодействия симбионтов через ПБМ и ПБП при действии гипоксии, как и при старении клубеньков [23], способствуют возрастающей доминанте растения-хозяина над микросимбионтом и качественной перестройке отношений от состояния мутуализма к комменсализму.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-01118).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Igamberdiev A.U., Hill R.D.* // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. № 408. P. 2473–2482.
2. *Downie J.A.* // Current Biology. 2005. V. 15. № 6. P. 196–198.
3. *White J., Prell E., Poole P.* // Plant Physiol. 2007. V. 144. № 2. P. 604–614.
4. *Топунов А.Ф., Розов Ф.Н., Петрова Н.Э.* // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 6. С. 935–941.
5. *Андреева И.Н., Сварадж К., Козлова Г.И., Райхман Л.А.* // Физиология растений. 1987. Т. 34. № 3. С. 528–536.
6. *Trinchant J.C., Rigaud J.* Nitrogen Fixation: Hundred Years After / Ed. B. Bruijn. Stuttgart–New York: Gustav Fischer, 1988. 565 p.
7. *Dordas C., Rivoal J., Hill R.D.* // Ann. Botany. 2003. V. 91. № 2. P. 173–178.
8. *Meakin G.E., Bueno E., Jepson B., Bedmar E.J., Richardson D.J., Delopdo M.J.* // Microbiology. 2007. V. 153. № 2. P. 411–419.
9. *Cardenas L., Holdaway-Clarce T.L., Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G., Hepler P.K.* // Plant Physiol. 2000. V. 123. № 2. P. 443–451.
10. *Дуброво П.Н., Крылова В.В., Ливанова Г.И., Жизневская Г.Я., Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 1992. Т. 39. № 3. С. 503–513.
11. *Andreev I., Dubrovo P., Krylova V., Andreeva I., Koren'kov V., Sorokin E., Izmailov S.* // J. Plant Physiol. 1997. V. 151. № 5. P. 563–569.
12. *Udvardi M.K., Day D.A.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. V. 48. P. 493–523.
13. *Крылова В.В., Дуброво П.Н., Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 2. С. 209–216.
14. *Измайлов С.Ф., Радюкина Р.Л., Агибетов К.А., Кадьров Р.М., Андреева И.Н., Федорова Е.Э., Жизневская Г.Я.* // Физиология растений. 1989. Т. 36. № 2. С. 309–317.
15. *Palmgren M.G.* // Anal. Biochem. 1991. V. 192. № 2. P. 316–321.
16. *Appel H.-J., Bersh B.* // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 903. № 3. P. 480–494.
17. *Андреев И.М., Крылова В.В., Дуброво П.Н., Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 2004. Т. 51. № 1. С. 80–85.
18. *Glenn A.R., Poole P.S., Hudman J.F.* // J. Gen. Microbiol. 1980. V. 119. № 1. P. 267–271.
19. *Ricard B., Couee I., Raymond P., Saglio P.H., Saint-Ges V., Pradet A.* // Plant Physiol. Biochem. 1994. V. 32. № 1. P. 1–10.
20. *Ладыгин В.Г.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 2. С. 246–258.
21. *Brewin N.J.* // Ann. Rev. Cell Biol. 1991. V. 7. P. 191–226.
22. *Андреева И.Н., Кожаринова Г.М., Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 1. С. 117–130.
23. *Измайлов С.Ф.* // Физиология растений. 1996. Т. 43. № 5. С. 773–791.

# Hypoxic Stress and the Transport Systems of the Peribacteroid Membrane of Bean Root Nodules

V. V. Krylova and S. F. Izmailov

*Timiryazev Research Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia*

*e-mail: nitrogenexchange@mail.ru*

Received August 3, 2009

**Abstract**—When the roots of *Vicia faba* L. beans were subjected to hypoxic stress, the activity of H<sup>+</sup>-ATPase on the peribacteroid membrane, as well as the transport of dicarboxylates (malate and succinate) mediated by this enzyme, decreased. Since malate and succinate are the main carbon-containing metabolites involved in the energy supply to bacteroids, this caused a change of the relation type from mutualism to commensalism, and the domination of the eukaryote over the prokaryote consequently increased.

УДК 579.22.852.1.64

## СВОЙСТВА *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 И ЕГО СТРЕПТОМИЦИНУСТОЙЧИВОГО ШТАММА

© 2011 г. А. А. Рой, И. П. Яценко, А. С. Гордиенко, И. К. Курдиш

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

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

Поступила в редакцию 30.10.2009 г.

Изучены свойства фосфатмобилизирующих бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого штамма. При выращивании в среде с глюкозой и глицерофосфатом удельная скорость роста маркированного по антибиотику штамма была примерно одинаковой с *B. subtilis* ИМВ В-7023, а размеры клеток в 1.3 раза меньше. Оба штамма существенно стимулировали прорастание семян растений, адгезировались на их корнях, незначительно отличались антагонистической активностью к фитопатогенам, количественным составом клеточных жирных кислот и фосфатазной активностью. Стрептомицинустойчивый штамм может использоваться для мониторинга *B. subtilis*, интродуцированных в агроэкосистемы.

Интенсивное использование химических удобрений и средств защиты растений сопровождается нарушением экологического равновесия в природных экосистемах. Поэтому в настоящее время остро стоит вопрос об уменьшении их применения и использовании для коррекции микробиологических процессов в агроэкосистемах бактериальных препаратов [1]. В отделе микробиологических процессов на твердых поверхностях Института микробиологии и вирусологии НАН Украины создан гранулированный препарат комплексного действия для растений. В состав препарата введены высокоактивный штамм азотфиксатора *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и фосфатмобилизирующих бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, а также природные высокодисперсные глинистые минералы [2, 3]. Эти препараты улучшают азотное и фосфорное питание растений, заметно стимулируют их рост и развитие, защищают от фитопатогенов [4, 5]. Однако малоизученным остается процесс взаимодействия интродуцированных бактерий с растениями и другими компонентами почвенной экосистемы. Для таких исследований применяют маркированные штаммы бактерий, в том числе и устойчивые к антибиотикам [6–8]. Полученные мутанты могут существенно отличаться от исходного штамма по основным биологическим свойствам.

Цель работы — изучение биологических свойств *B. subtilis* ИМВ В-7023 и стрептомицинустойчивого штамма этих бактерий для оценки возможности использования последнего в модельных экспериментах по исследованию взаимодействия с разными компонентами агроэкосистемы.

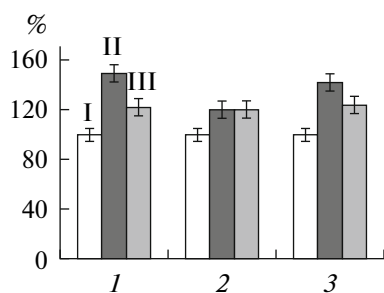
### МЕТОДИКА

Объектом исследований был штамм *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, выделенный из черноземной почвы Украины, активно мобилизирующий фосфор из труднорастворимых органических и неорганических соединений, а также типовой штамм *Bacillus subtilis* ATCC 115 [2, 5]. Стрептомицинустойчивый штамм *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 *str*<sup>+</sup> был получен методом спонтанного мутагенеза при пересевах исходного штамма *B. subtilis* ИМВ В-7023 на среды с возрастающими концентрациями антибиотика. В отличие от исходного штамма он способен расти в питательных средах, содержащих 1600 мкг/мл стрептомицина.

Культивирование бактерий проводили в периодических условиях при 28°C в течение 3 сут на качалке (240 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды следующего состава (г/л): глицерофосфат кальция — 2.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 0.5, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0.3, NaCl — 0.3, KCl — 0.3, FeSO<sub>4</sub> — 0.001, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O — 0.001, CaCO<sub>3</sub> — 5.0, pH 6.9–7.1. В экспериментах использовали различные варианты среды. В первом варианте глицерофосфат являлся единственным источником углеродного и фосфорного питания для бактерий. Во втором варианте в данную среду дополнительно вносили глюкозу (10.0 г/л). Среду инокулировали суспензией 1 сут культуры бацилл после роста на агаризованной среде. Начальная численность бактерий в среде составляла (2.8–5.6) × 10<sup>5</sup> кл./мл.

Интенсивность роста микроорганизмов оценивали по увеличению количества жизнеспособных клеток, численность которых определяли методом высева из серийных разведений на поверхность агаризованной картофельной среды и подсчетом выросших колоний. Концентрацию фосфата в среде определяли методом Фиске–Суббароу [9]. Антаго-





**Рис. 1.** Всхожесть семян растений после их обработки *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 str+: 1 – сахарная свекла, 2 – кукуруза сорта Титан, 3 – сосна обыкновенная; I – контроль, II – *B. subtilis* ИМВ В-7023, III – *B. subtilis* ИМВ В-7023 str+.

нистическую активность бактерий исследовали методом блоков [10]. Чувствительность *B. subtilis* ИМВ В-7023 и стрептомицинустойчивого штамма к антибиотикам определяли методом диффузии в агар с использованием стандартных бумажных дисков [10]. Всхожесть семян растений изучали согласно ДСТУ 4138-2002 Украины.

Жирнокислотный состав клеточных липидов исследовали после получения метиловых эфиров жирных кислот путем гидролиза бактериальной биомассы в метаноле, содержащем 1.5%  $H_2SO_4$ . Экстракцию метиловых эфиров проводили смесью диэтиловый эфир–гексан (1 : 1). Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили в хромато–масс–спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert (“Agilent Technologies”, США). Колонка капиллярная HP-5ms (“J&W Scientific”, USA), длина 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина фазы 0.25 мкм. Температурный режим – 150–250°C, градиент температуры 4°C/мин, газ–носитель–гелий, скорость потока через колонку 1.2 мл/мин. Температура испарителя 250°C с разделением потока 1 : 100. Обработку результатов проводили с помощью персонального компьютера и стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот (производитель “Supelco”, США).

Фосфатазную активность определяли колориметрическим методом, используя в качестве модельного субстрата фенолфталейнфосфат натрия. За единицу активности принимали количество фермента, которое содержалось в 1 г клеток (в пересчете на сухую массу) и катализировало превращение 1 мкМ субстрата за 1 ч [11].

Исследование электроповерхностных свойств бактерий проводили на установке для микроэлектрофореза [12]. Для этого выращенные клетки отмывали дважды в соответствующих буферных растворах (ионная сила 0.05), которые получали смешиванием растворов NaCl и HCl (диапазон pH 2.0–4.0) либо использовали фосфатный буфер (диапазон pH 5.0–8.0). В этих растворах измеряли скорость электрофореза пятидесяти клеток каждого варианта и рассчитывали их  $\zeta$ -потенциал [13].

Адгезию бактерий на корнях огурцов изучали известным методом [14]. Результаты обрабатывали статистически [15].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом спонтанного мутагенеза был получен штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 str+, резистентный к стрептомицину в концентрации 1600 мкг/мл. Этот штамм стабильно сохранял устойчивость к антибиотикам после 55 пассажей на картофельном агаре в течение 2 лет. Как исходный, так и стрептомицинустойчивый штаммы оказывали стимулирующее влияние на прорастание семян и развитие проростков разных видов растений. Так, при бактерилизации семян сахарной свеклы сорта Экстра, кукурузы сорта Титан и сосны обыкновенной суспензией *B. subtilis* ИМВ В-7023 их всхожесть была соответственно на 49, 23 и 57% выше контрольных (небактеризованные семена), а *B. subtilis* ИМВ В-7023 str+ – на 23, 14 и 25% (рис. 1). Положительное влияние обработки семян суспензиями клеток обоих штаммов наблюдали и при учете показателей длины проростков и корня. При этом также имело место снижение поражаемости семян и проростков микромицетами на 85–95% при использовании клеток исходного штамма и на 65–88% – стрептомицинустойчивого.

Показано, что оба штамма не отличались между собой по основным морфо–физиологическим свойствам: окраска по Граму, подвижность, ферментация источников углеродного питания и др. В то же время наблюдались незначительные различия скорости роста при выращивании на минеральной среде с глицерофосфатом и глюкозой. Так, количество клеток исходного штамма при выращивании на такой среде достигало максимума на 2 сут роста, а стрептомицинустойчивого – на 3 сут. Размеры клеток *B. subtilis* ИМВ В-7023 str+ были в 1.3 раза меньше *B. subtilis* ИМВ В-7023.

Одной из важных характеристик исходного штамма является его высокая антагонистическая активность к ряду фитопатогенов растений [4]. У стрептомицинустойчивого штамма эта активность была на 3–10% ниже, чем у исходного штамма, а к фитопатогену *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 80036b была утрачена (рис. 2).

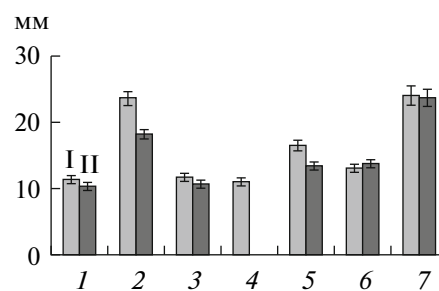
При определении чувствительности к ряду антибиотиков было показано, что клетки стрептомицинустойчивого штамма характеризовались более выраженной резистентностью к макролидам (олеандомицин и эритромицин), но становились более чувствительными к ампициллину, доксициклину, тетрациклину, гентамицину и цефтриаксону (табл. 1). Полученные результаты, по нашему мнению, необходимо учитывать при изучении поведения клеток обоих штаммов в агроэкосистемах.

Известно, что важным таксономическим показателем для бактерий является состав их кле-

точных жирных кислот [16]. Последние являются неотъемлемыми компонентами ряда макромолекул клеточных стенок и могут влиять на их структурные и функциональные особенности. С этой точки зрения представляло интерес изучение жирнокислотного состава липидов клеток исходного и стрептомицинустойчивого штаммов. Полученные данные свидетельствуют, что у исходного, *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 *str+*, а также типового штамма *Bacillus subtilis* 115 выявлены 12 типов насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с длиной углеродной цепи от C<sub>14</sub> до C<sub>18</sub>. В жирнокислотных спектрах исследованных бактерий преобладали: 12-метилтетрадекановая ( $\alpha$ -C<sub>15:0</sub>), 14-метилпентадекановая (i-C<sub>15:0</sub>), 13-метилтетрадекановая (i-C<sub>15:0</sub>), 12-метилтридекановая (i-C<sub>14:0</sub>), гексадекановая (C<sub>16:0</sub>), 14-метилгексадекановая ( $\alpha$ -C<sub>17:0</sub>), 15-метилгексадеценонная (i-C<sub>17:1</sub>) кислоты. В качестве минорных компонентов содержались также кислоты: тетрадекановая, пентадекановая, гептадекановая, октадекановая и цис-9-октадеценонная кислоты (табл. 2). Известно, что для представителей рода *Bacillus* характерно преобладание в жирнокислотном спектре кислот с разветвленной цепью (от 54 до 85% общего количества жирных кислот). У *Bacillus subtilis* отмечен высокий уровень  $\alpha$ -C<sub>17:0</sub> и i-C<sub>17:1</sub> кислот, а у *B. subtilis*, в частности,  $\alpha$ -C<sub>15:0</sub>, i-C<sub>15:0</sub>, а также i-C<sub>16:0</sub> жирных кислот [17]. Полученные нами результаты также подтвердили наличие этих кислот в клетках как типового, так и изучаемых штаммов *Bacillus subtilis* (табл. 2). Исследованные культуры отличались друг от друга, главным образом, количественным содержанием отдельных кислот. Так, клетки стрептомицинустойчивого штамма содержали пентадекановую кислоту в 1.6 раза, гексадекановую в 1.5 раза, 15-метилгексадеценонную — в 1.2 раза; 14-метилгексадекановую — в 1.4 раза больше, чем у *B. subtilis* ИМВ В-7023. В то же время количество 14-метилпентадекановой кислоты было в 1.2 раза меньше по сравнению с исходным штаммом (табл. 2), а также клетки маркированного штамма содержали в незначительной концентрации цис-9-октадеценонную кислоту.

Таким образом, типовая культура *B. subtilis* 115, исходный штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивый мутант существенно не отличались по качественному составу клеточных жирных кислот, что может служить одним из критериев идентификации этого вида *Bacillus subtilis* в агроэкосистемах.

Наиболее важной характеристикой исходного штамма является способность мобилизовать фосфат из труднорастворимых органических и неорганических соединений фосфора. Одним из таких соединений является глицерофосфат. Известно, что в минеральной среде с глюкозой и глицерофосфатом клетки с помощью фосфатазы отщепляют фосфат от молекулы глицерофосфата, используя его в качестве источника фосфора, а глюкозу — в качестве источника углерода [18]. Было показано, что при культивировании в таких условиях как исходного, так и стрепто-



**Рис. 2.** Антагонистическая активность *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+* к фитопатогенным бактериям: 1 — *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511, 2 — *P. fluorescens* 8573, 3 — *Agrobacterium tumefaciens* 6628, 4 — *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 80036b, 5 — *Pectobacterium caratovororum* 8982, 6 — *P. syringae* pv. *atropaciens* 912, 7 — *Clavibacter michiganensis* 10; I — *B. subtilis* ИМВ В-7023, II — *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+*.

мицинустойчивого штаммов в среде происходит накопление фосфата (рис. 3). При этом у *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+* отмечали незначительное снижение удельной скорости роста. Кроме того, наблюдали различия в показателях фосфатазной активности этих штаммов. Так, если у исходного штамма фосфатазная активность проявлялась уже после 9 ч выращивания, то у стрептомицинустойчивого штамма ее обнаруживали только после 20 ч культивирования. В зависимости от времени культивирования фосфа-

**Таблица 1.** Чувствительность к антибиотикам *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 *str+*.

Антибиотик	Диаметр зоны ингибирования роста клеток <i>Bacillus subtilis</i> антибиотиками, мм	
	<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023	<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023 <i>str+</i>
Цефтриаксон	34.0 ± 0.7	37.7 ± 0.4
Доксициклин	26.0 ± 0.7	31.3 ± 1.1
Ванкомицин	23.7 ± 0.8	24.0 ± 0.7
Гентамицин	27.3 ± 0.4	31.7 ± 1.1
Тетрациклин	22.0 ± 0.7	29.7 ± 0.4
Неомицин	18.7 ± 1.1	19.0 ± 1.9
Левомецетин	33.0 ± 1.9	35.3 ± 1.8
Линкомицин	26.0 ± 0.7	25.0 ± 0.7
Канамицин	26.5 ± 0.7	24.0 ± 0.7
Бензилпенициллин	25.5 ± 2.1	25.0 ± 1.4
Полимиксин	10.7 ± 1.5	9.3 ± 0.5
Олеандомицин	25.0 ± 0.7	11.0 ± 0.7
Ампициллин	8.7 ± 0.4	21.7 ± 1.1
Эритромицин	36.0 ± 0.7	25.3 ± 0.4
Стрептомицин	20.3 ± 1.8	—

**Таблица 2.** Жирнокислотный состав клеточных липидов *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИМВ В-7023 str+, % от общей площади пиков

Кислота	Условное обозначение кислоты	<i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023	<i>Bacillus subtilis</i> ИМВ В-7023 str+	<i>Bacillus subtilis</i> 115
12-метилтетрадекановая	i-C <sub>14:0</sub>	10.73	7.34	5.94
Тетрадекановая	C <sub>14:0</sub>	0.28	0.27	0.54
13-метилтетрадекановая	i-C <sub>15:0</sub>	12.71	11.96	17.84
12-метилтетрадекановая	α-C <sub>15:0</sub>	38.7	37.23	37.02
Пентадекановая	C <sub>15:0</sub>	0.85	1.36	0.81
14-метипентадекановая	i-C <sub>16:0</sub>	22.8	19.02	25.13
Гексадекановая	C <sub>16:0</sub>	6.49	10.05	3.51
15-метилгексадеценная	i-C <sub>17:1</sub>	2.54	2.99	1.62
14-метилгексадекановая	α-C <sub>17:0</sub>	4.80	6.79	6.76
Гептадекановая	C <sub>17:0</sub>	Сл.	0.27	—
Цис-9-октадеценная	C <sub>18:1</sub> -цис	—	1.90	—
Октадекановая	C <sub>18:0</sub>	Сл.	0.54	—

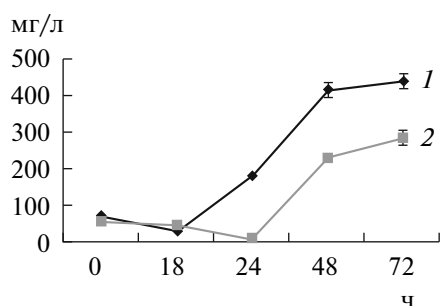
\* Сл. — следы кислоты, “—” не обнаружено.

тазная активность маркированного штамма была в 1.3–3.0 раза ниже, чем у исходного.

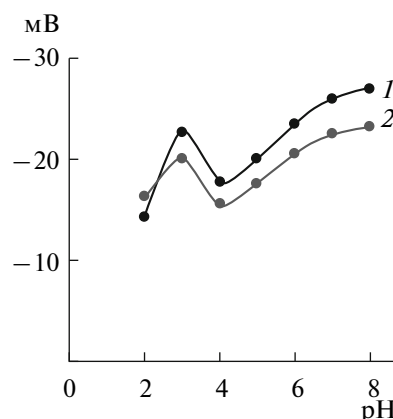
В природных экосистемах микроорганизмы функционируют в олиготрофных условиях. Поэтому представляло интерес исследовать возможность использования бактериями глицерофосфата как источника углерода и фосфора одновременно. Установлено, что при выращивании бактерий в таких условиях оба штамма использовали это вещество в качестве единственного источника углерода и фосфора, накапливая в среде фосфат. Следует отметить, что в этом варианте эксперимента фосфатазную активность у обоих штаммов не обнаруживали. Очевидно, в данном случае деструкция молекул глицерофосфата идет по пути преимущественного использования клетками углеродной его части, а

фосфат лишь частично ассимилируется ими и накапливается в среде, ингибируя в высоких концентрациях фосфатазную активность бактерий [18].

Основной вклад в реализации стимулирующего потенциала микробных препаратов принадлежит бактериям, способным колонизировать ризосферу растений. Первым этапом колонизации является адгезия бактерий на твердых поверхностях, а эффективность данного процесса детерминируется свойствами поверхности клеток. Установлено, что как исходный, так и стрептомицинустойчивый штаммы при выращивании в среде с одним глицерофосфатом (природный компонент почвы) характеризуются подобным типом поверхности (рис. 4). Это позволяет предположить, что клетки как *B. subtilis* ИМВ В-7023, так и *B. subtilis* ИМВ В-7023 str+ имеют равные воз-



**Рис. 3.** Зависимость концентрации фосфата от времени выращивания (ч) *B. subtilis* ИМВ В-7023 (1) и *B. subtilis* ИМВ В-7023str+ (2) в среде с глицерофосфатом и глюкозой.



**Рис. 4.** ζ-потенциал клеток (мВ) *B. subtilis* ИМВ В-7023 str+ (1) и *B. subtilis* ИМВ В-7023 (2), выращенных в среде с глицерофосфатом.

возможности участия в процессе колонизации ризосферы растений. Действительно, показано, что адгезия клеток исходного штамма бациллы на поверхности корней огурцов сорта Джерело составляла  $(1.6 \pm 0.2) \times 10^7$  кл./г корней, а стрептомицинустойчивого —  $(1.5 \pm 0.2) \times 10^7$  кл./г.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что стрептомицинустойчивый штамм характеризуется сходными биологическими свойствами с природным *B. subtilis* ИМВ В-7023 и может быть использован для мониторинга популяции этого вида бацилл в агроэкосистемах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курдиш И.К., Рой А.А., Чуйко Н.В., Белогубова Е.Н., Церковняк Л.С., Дыренко Д.И. // Материалы Всерос. конф. с междуна. участием "Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем" Саратов 25–27 сентября 2007 г. Саратов: Изд-во Научная книга, 2007. С. 11.
2. Патент Украины. 2003. № 54923.
3. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. Киев: КВЦ, 2001. 142 с.
4. Рой А.А., Залоило О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К. // Агрэкол. журнал. 2005. № 1. С. 50–55.
5. Рой А.А., Рева О.Н., Курдиш И.К., Смирнов В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 551–557.
6. Вязовая А.А., Лимещенко Е.В., Бурень В.М. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 689–695.
7. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Нехотяева Н.В., Ицкович Е.Л., Шакиров Е.В., Лецинская И.Б., Руденская Г.Н. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 1. С. 110–118.
8. Суховицкая Л.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 1. С. 87–90.
9. Унифицированные методы анализа вод / Ред. Ю.Ю. Лурье. М.: Химия, 1971. 207 с.
10. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М.: Изд-во МГУ, 1976. 307 с.
11. Калашникова Н.А., Родзевич В.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 1971. Т. 7. № 4. С. 446–450.
12. Глоба Л.И., Гордиенко А.С. // Медтехника. 1980. № 2. С. 50–51.
13. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. М.: Наука, 1976. 328 с.
14. Курдиш И.К., Бега З.Т., Гордиенко А.С., Дыренко Д.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 4. С. 442–447.
15. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1968. 24 с.
16. Stead D.A. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1992. V. 42. № 2. P. 281–295.
17. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Споробразующие аэробные бактерии — продуценты биологически активных веществ. Киев.: Наукова думка, 1982. 279 с.
18. Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Лецинская И.Б. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 410–413.

## Features of *Bacillus subtilis* IMB B-7023 and Its Streptomycin-Resistant Strain

A. A. Roi, I. P. Yatzenko, A. S. Gordienko, and I. K. Kurdish

Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences, Kiev, 03680 Ukraine

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

Received October 30, 2009

**Abstract**—Features of phosphate-mobilizing bacteria *Bacillus subtilis* IMB B-7023 and its streptomycin-resistant strain were investigated. While cultivated in medium with glucose and glycerophosphate, the growth rate of the antibiotic-marked strain was approximately similar to this parameter for *Bacillus subtilis* IMB B-7023 but cell sizes were 1.3-fold less. Both strains significantly stimulated the germinating of plant seeds, attached to their roots, and insignificantly differed in antagonistic activity toward phytopathogens and quantitative content of cell fatty acids and phosphatase activity. Streptomycin-resistant strain may be used for monitoring of *Bacillus subtilis* introduced to agroecosystem.

УДК 57+66.085.3

## ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ $TiO_2$ -ПЛЕНОК

© 2011 г. С. Н. Плескова\*, И. С. Голубева\*, Ю. К. Верёвкин\*\*, Е. А. Першин\*, В. Н. Буренина\*\*, В. В. Королихин\*\*

\*Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, Нижний Новгород, 603155  
e-mail: pleskova@mail.ru

\*\*Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород, 603150

Поступила в редакцию 22.09.2009 г.

Продемонстрировано снижение числа КОЕ грамположительных и грамотрицательных бактерий при инкубации их на поверхности  $TiO_2$ -пленок, облученных УФ-светом (380 нм). Отмечено снижение жизнеспособности бактерий после 15-минутной экспозиции для *Staphylococcus aureus* на 29%, для *Staphylococcus epidermidis* – на 45%, для *Escherichia coli* – на 47%. Впервые выявлено, что повторное использование  $TiO_2$ -пленок для тестирования жизнеспособности бактериальной суспензии, приводит к потере УФ-индуцированной бактерицидной активности. Однако отжиг  $TiO_2$ -пленок при температуре свыше 400°C вызывает восстановление фотоиндуцированной биоцидности до исходного уровня.

Важной задачей прикладной микробиологии является создание и исследование “самостерилизующихся” поверхностей, т.е. тех, на которых происходит инактивация и уничтожение бактерий, разложение органических загрязнений и т.д. [1]. В разработке антимикробных покрытий активно используется явление фотокатализа, где в качестве дезинфицирующего начала выступают активные формы кислорода: супероксид анион-радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксил-радикал ( $OH^{\bullet}$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), выделяемые с поверхности нанопленок. Обладающие такими свойствами поверхности могут быть использованы для решения экологических проблем (фотокаталитическая очистка воздуха, питьевой и промышленных сточных вод), в решении проблем, связанных с созданием высококачественных помещений (операционные, лаборатории), в применении упаковки и консервирования пищевых продуктов [2]. Для покрытия поверхностей с целью придания им требуемых свойств лучше всего подходят  $TiO_2$ -пленки [3]. Золь-гель-технология позволяет нанести  $TiO_2$ -пленки заданной структуры и свойств практически на любые поверхности [4]. В статье Армеало Л. и соавт. [5] приводятся сведения о подавлении роста бактерий в результате пребывания их на поверхности  $TiO_2$ -пленок, в которых под действием ультрафиолета индуцируется образование активных форм кислорода. Однако в данном исследовании зарегистрирована УФ-индуцированная бактерицидная активность  $TiO_2$ -пленок только для одного штамма. Существенным недостатком работы следует считать

и отсутствие сведений о воспроизводимости результатов при многократном использовании пленок.

Цель работы – определение бактерицидных свойств  $TiO_2$ -пленок под действием УФ (380 нм) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и определение условий, в которых реализуется это свойство.

### МЕТОДИКА

Исследуемыми объектами были штаммы: золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus* 956), эпидермальный стафилококк (*S. epidermidis* 1061), кишечная палочка (*Escherichia coli* 321-5). Культуры выделены на базе бактериологической лаборатории клинической инфекционной больницы № 2 – г. Нижнего Новгорода.

**Получение  $TiO_2$ -пленок.**  $TiO_2$ -пленки наносили на поверхность стекла химическим методом из растворов гидролизующихся соединений (золь-гель-технология). В качестве пленкообразующего вещества использовали 5%-ный тетрабутоксититан  $Ti(OC_4H_9)_4$  в изопропиловом спирте. Катализатор и стабилизатор – соляная кислота. Раствор наносили на поверхность вращающейся чашки Петри. На стекле появлялся однородный по толщине прозрачный слой полимеризованной титановой кислоты. Последующая термическая обработка (400°C, 5 ч) приводила к завершению реакций разложения промежуточных продуктов гидролиза и к полному удалению растворителя. После испарения остается прозрачная пленка  $TiO_2$ , прочно связанная с поверхностью стекла [6, 7].

**Таблица 1.** Число КОЕ бактерий после инкубации их под ультрафиолетовым светом (380 нм) в течение 15 мин на поверхности стекла (контроль) и стекла, покрытого  $\text{TiO}_2$ -пленками (опыт)\*

Штамм	Поверхность стекла (контроль)	Поверхность $\text{TiO}_2$ -пленок (опыт)
<i>S. aureus</i> 956	115.8 ± 10.7	82.5 ± 6.5
<i>S. epidermidis</i> 1061	153.2 ± 24.6	84.0 ± 17.0
<i>E. coli</i> 321-5	279.0 ± 34.5	148.3 ± 27.8

\* Различия между контролем и опытом статистически значимы ( $p < 0.05$ ).

**Получение бактериальной суспензии.** Штаммы выращивали на ГМФ-агаре (ЗАО “НИЦ фармакотерапии”, Санкт-Петербург) 20 ч при 37°C. Со скошенного агара делали смыв стерильным физиологическим раствором (ОАО “Биохимик”, г. Саранск), дважды отмывали физиологическим раствором (рН 7.2) и доводили коэффициент поглощения микробной суспензии до 0.269 на КФК-2МП (Россия) (670 нм). Это соответствовало 10 МЕ стандарта мутности. Из полученной суспензии готовили серию разведений, для того чтобы добиться получения на ГМФ-агаре роста изолированных колоний в количестве около 200 КОЕ. В сериях предварительных экспериментов это разведение составило для: *S. aureus* 956 – 1 : 200000, *S. epidermidis* 1061 – 1 : 100000, *E. coli* 321-5 – 1 : 200000. Каждое разведение тестировали на поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленок.

**Исследование бактерицидной активности  $\text{TiO}_2$ -пленок.** В эксперименте нанесенную на  $\text{TiO}_2$ -пленки бактериальную суспензию облучали УФ-светом (380 нм) 15 мин. Плотность мощности светопотока УФ-лампы (ВАО-2, Украина), оцененная измерителем энергии излучения (ИМО-2Н, Россия) составила 4.5 мВт/см<sup>2</sup>. Для отсечения “короткого” ультрафиолета, обладающего собственной бактери-

цидной активностью ( $\lambda < 365$  нм) использовали светофильтр УФС-6. В положительном контрольном эксперименте в тех же условиях облучали бактериальную суспензию, нанесенную на поверхность стерильного стекла. В дальнейшем снижение жизнеспособности бактерий на поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленок оценивали относительно этого контроля. В отрицательном контроле бактериальную суспензию инкубировали как на поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленок, так и без нее (поверхность стекла), в темноте. Поскольку отрицательный контроль демонстрировал отсутствие различий в образовании КОЕ у бактерий, инкубированных как на поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленок, так и на поверхности стекла, он был использован только в первых сериях экспериментов, а в дальнейшем был исключен. После инкубации под УФ-светом в течение 15 мин бактериальную суспензию стерильно, дозатором (0.05 мл) переносили на поверхность ГМФ-агара в чашки Петри и шпателем равномерно распределяли суспензию. Посевы инкубировали 20 ч при 37°C, после чего производился подсчет КОЕ.

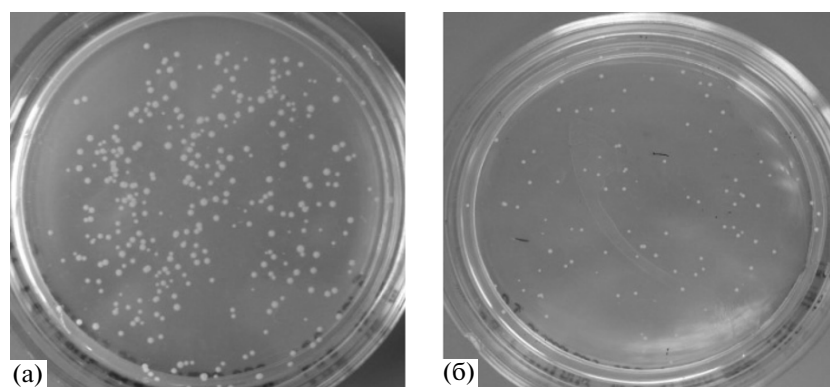
**Статистическая обработка.** Проводилась в пакете Origin 7.0 Server. Определяли значения средних и среднее квадратичное отклонение. Для анализа статистически значимых различий двух выборок использовали критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование УФ-индуцированной бактерицидности  $\text{TiO}_2$ -пленок показало существенное снижение жизнеспособности как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (табл. 1).

Особенно существенное снижение жизнеспособности в результате пребывания на поверхности УФ-активированных  $\text{TiO}_2$ -пленок отмечено для грамотрицательных бактерий (*E. coli* 321-5): число КОЕ снизилось практически в 2 раза (рис. 1).

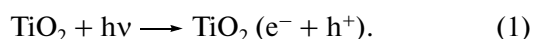
Согласно данным литературы, снижение числа КОЕ, вероятнее всего, происходит в результате



**Рис. 1.** Снижение числа КОЕ штамма *E. coli* 321-5 после инкубации в течение 15 мин на поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленок: а – контроль (инкубация под УФ-светом без  $\text{TiO}_2$ -пленки); б – опыт (инкубация под УФ-светом на поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленок).



гибели бактерий, обусловленной нарушением целостности клеточной стенки. Такое явление наблюдается вследствие окисления клеточной стенки активными формами кислорода, образуемыми на поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленок [5]. Для начального звена, генерирующего запуск цепной реакции по образованию активных форм кислорода необходима энергия, превышающая величину запрещенной зоны  $\text{TiO}_2$ . В наших экспериментах – кванты света с  $\lambda < 390$  нм. Согласно исследованиям Лынькова Л.М. и соавт. [8], при поглощении кванта света в пленке  $\text{TiO}_2$  формируются межзельные центры  $\text{Ti}^{3+}$  (дырки), свободные гидроксильные радикалы ( $\text{OH}^\bullet$ ) и супероксид анион-радикалы ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Разделение зарядов в  $\text{TiO}_2$ -пленках с формированием электронов ( $e^-$ ) и дырок ( $h^+$ ) происходит по следующему механизму:



Формирование активных форм кислорода Лыньков и соавт. доказали методом ЭПР [8]. Активные формы кислорода окисляют не только основные структуры бактериальных мембран и клеточных стенок, но и модифицируют азотистые основания ДНК, вызывая разрывы молекулы и инактивируют основные группы бактериальных ферментов [9, 10]. Сочетание различных механизмов биоцидности АФК приводило к значительному снижению жизнеспособности бактерий в наших экспериментах.

Однако исследование воспроизводимости результатов при повторном использовании  $\text{TiO}_2$ -пленок привело к неожиданному результату. После отмывания пленок от бактериальной суспензии и их последующей стерилизации ( $180^\circ\text{C}$ , 60 мин) они не проявляли фотокаталитической и бактерицидной активности (табл. 2). Увеличение времени экспозиции бактериальной суспензии под УФ-светом до 30 мин также не приводило к реверсии фотоиндуцированной бактерицидности  $\text{TiO}_2$ -пленок.

Объяснением наблюдаемых результатов может являться феномен супергидрофильности: дырка, образуемая в результате отрыва электрона, реагирует с водой, вследствие чего поверхность  $\text{TiO}_2$ -пленки становится гидрофильной (рис. 2) [3]. Реализа-

**Таблица 2.** Число КОЕ бактерий после инкубации под ультрафиолетовом светом (380 нм) в течение 30 мин на поверхности стекла (контроль) и стекла, покрытого повторно используемыми  $\text{TiO}_2$ -пленками (опыт)\*

Штамм	Поверхность стекла (контроль)	Поверхность повторно используемых $\text{TiO}_2$ -пленок (опыт)
<i>S. aureus</i> 956	$459.2 \pm 23.8$	$425.0 \pm 46.7$
<i>S. epidermidis</i> 1061	$536.3 \pm 37.1$	$521.0 \pm 90.7$
<i>E. coli</i> 321-5	$162.2 \pm 33.4$	$126.4 \pm 18.5$

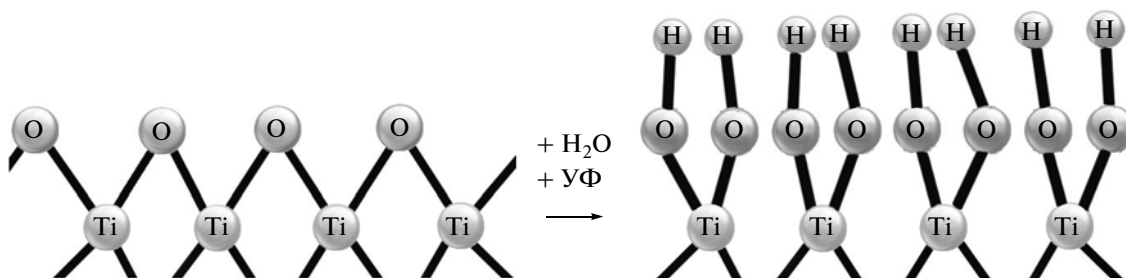
\* Статистически значимые различия не обнаружены ни в одном из опытов ( $p > 0.05$ ).

ция феномена супергидрофильности высоковероятна и в серии наших экспериментов, поскольку мы наносили на поверхность  $\text{TiO}_2$ -пленок водные бактериальные суспензии.

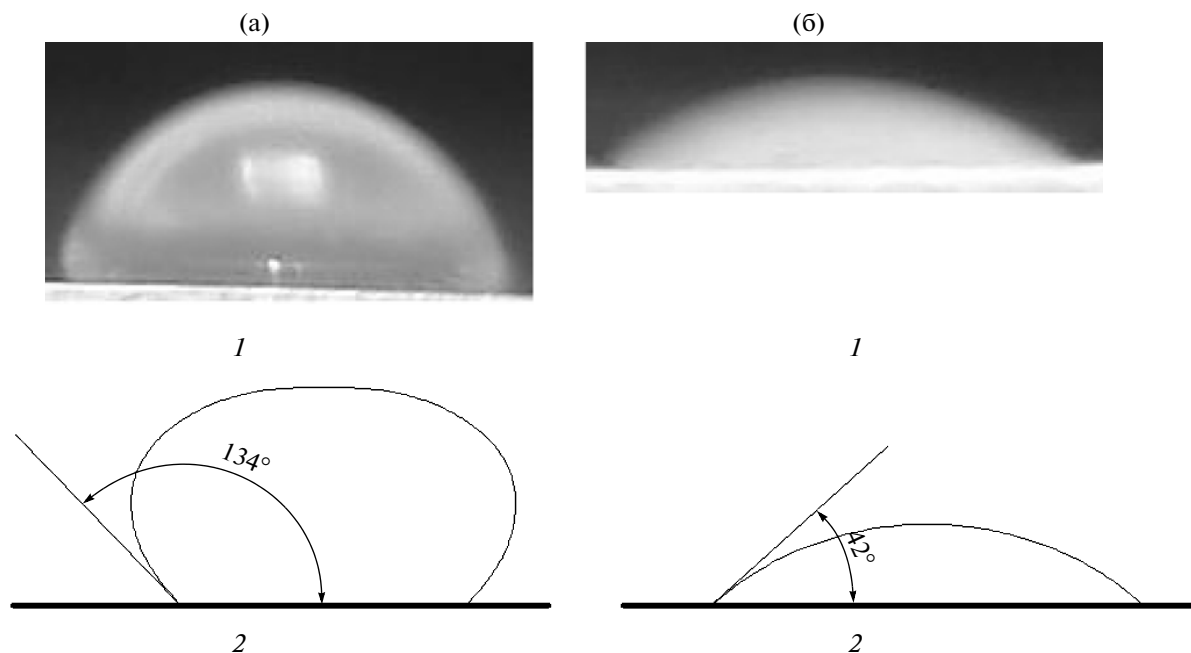
Для доказательства факта изменения свойств поверхности с гидрофобных (исходная пленка) на гидрофильные (повторно используемая пленка) после облучения УФ-светом в присутствии жидкости проводили опыты с каплей дистиллированной воды. Капля воды на поверхности первично нанесенных  $\text{TiO}_2$ -пленок проявляет достаточно выраженную гидрофобность поверхности первично нанесенных  $\text{TiO}_2$ -пленок (рис. 3), поскольку краевой угол составляет  $134^\circ$ . После облучения капли УФ-светом (380 нм) она растекалась по поверхности  $\text{TiO}_2$ -пленки, что проявлялось в снижении краевого угла до  $42^\circ$ .

Таким образом, на поверхности первично нанесенных  $\text{TiO}_2$ -пленок протекает параллельно два фотохимических процесса: образование активных форм кислорода и гидрофилизация поверхности. При повторном использовании пленок гидроксильрованная поверхность полностью утрачивает фотокаталитическую активность, поскольку не способна больше быть донором электронов.

Были предприняты попытки реверсии свойства фотоиндуцированной бактерицидной активности  $\text{TiO}_2$ -пленок. Для этого необходимо было избавиться от гидроксильных радикалов на поверхности пленки. Это достигалось повторным отжигом  $\text{TiO}_2$ -



**Рис. 2.** Схема гидрофилизации  $\text{TiO}_2$ -пленки под действием УФ-света: O – кислород; Ti – титан; H – водород.



**Рис. 3.** Изменение свойств поверхности с гидрофобных (а) на гидрофильные (б) после облучения TiO<sub>2</sub>-пленок УФ-светом (380 нм) в течение 5 мин: 1 – микрофотография капли на поверхности TiO<sub>2</sub>-пленки; 2 – схематическое изображение капли с измерением угла наклона.

пленок при 400°C в течение 5 ч. Проведенные эксперименты показали практически полное восстановление изначальных свойств TiO<sub>2</sub>-пленок (табл. 3).

Для исключения возможности влияния на жизнеспособность бактериальных клеток изменяющегося pH среды проводили измерение кислотности бактериальной суспензии перед нанесением на поверхность TiO<sub>2</sub>-пленок и после 15-минутной инкубации под действием ультрафиолета. Водородный потенциал не изменялся и в обоих случаях равнялся 7.0. Следовательно, влияния pH на бактериальные штаммы в данных экспериментах не обнаружено.

Таким образом, в представленной работе зафиксирована УФ-индуцированная бактерицидная активность одного из классов наноматериалов – TiO<sub>2</sub>-

пленок в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Однако при исследовании бактериальных суспензий, взвешенных в жидкостях (физиологический раствор), стерилизующая активность проявлялась лишь при однократном использовании, поскольку под действием УФ-излучения происходило изменение свойств самой поверхности. Она становится гидрофильной, о чем свидетельствует изменение краевого угла тестируемой капли в 3 раза. Свойство гидрофильности поверхности многими авторами расценивается как позитивное, поскольку с гидрофилизированных поверхностей происходит механический смыл различного рода микроорганизмов и других органических загрязнений. Но если это свойство поверхности может удовлетворять строительную и автомобилестроительную отрасли, то для медицинской, пищевой и экологической микробиологии его недостаточно, поскольку первостепенной задачей этих областей исследования является не механическое удаление, а полное уничтожение бактерий, т.е. стерилизация. Для того чтобы вернуть поверхности ее бактерицидные свойства, нами предложен метод повторного отжига TiO<sub>2</sub>-пленок. В этом случае УФ-индуцированная бактерицидность в отношении всех исследуемых штаммов восстанавливалась. Однако такой способ нельзя назвать удовлетворительным, поскольку условия отжига являются достаточно жесткими (высокая температура – 400°C и длительная экспозиция – 5 ч) и по этой причине не могут быть реализованы в медицинских учреждениях. По мере разрешения этой

**Таблица 3.** Число КОЕ бактерий после инкубации под ультрафиолетовым светом (380 нм) в течение 30 мин на поверхности стекла (контроль) и стекла, покрытого TiO<sub>2</sub>-пленками, повторно отожженными (400°C, 5 ч) (опыт)\*

Штамм	Поверхность стекла (контроль)	Поверхность повторно отожженных TiO <sub>2</sub> -пленок (опыт)
<i>S. aureus</i> 956	142.8 ± 15.8	79.2 ± 9.1
<i>S. epidermidis</i> 1061	44.8 ± 9.9	12.8 ± 7.7
<i>E. coli</i> 321-5	87.0 ± 14.0	36.0 ± 15.9

\* Различия между контролем и опытом статистически значимы ( $p < 0.05$ ).

трудности TiO<sub>2</sub>-пленки станут перспективным материалом для покрытия медицинского инструментария, емкостей в пищевой промышленности и т.д., поскольку позволят стерилизовать поверхности в короткие временные интервалы.

Представленная работа выполнена при финансовой поддержке гранта Комиссии Европейского сообщества ЕС FP-6 IST-4 №027976 и гранта Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 27 “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Makowski A., Wardas W. // Current topics of biophysics. 2001. V. 25. № 1. P. 19–21.
2. Wu Y., Jia W., An Q., Liu Y., Chen J., Li G. // Nanotechnology. 2009. V. 20. № 24. P. 245101–245109.
3. Fujishima A., Rao T.N., Tryk D.A. // J. Photochem. Photobiol. 2000. V. 1. № 1. P. 1–21.
4. Gutierrez J., Tercjak A., Garcia I., Peponi L., Mondragon I. // Nanotechnology. 2008. V. 19. № 15. P. 155607–156907.
5. Armealo L., Barreca D., Bottaro G., Gasparotto A., Maccato C., Maragno C., Tondello E., Štancar U. L., Bergant M., Mahne D. // Nanotechnology. 2007. № 18. P. 375709–375715.
6. Masuda H., Hasegawa F., Ono S. // J. Electrochem. Soc. 1997. V. 144. P. 127–130.
7. Суйковская Н.В. Химические методы получения тонких прозрачных пленок. М.: Химия, 1971. 198 с.
8. Лыньков Л.М., Молодечкина Т.В., Богуц В.А. // Докл. БГУИР. 2004. Т. 2. № 1. P. 73–84.
9. Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. // Mutat. Res. 2004. V. 567. № 1. P. 1–61.
10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press. 2007. P. 187–267.

## Photoinduced Bactericidal Activity of TiO<sub>2</sub> Films

S. N. Pleskova<sup>a</sup>, I. S. Golubeva<sup>a</sup>, Yu. K. Verevkin<sup>b</sup>, E. A. Pershin<sup>a</sup>,  
V. N. Burenina<sup>b</sup>, and V. V. Korolichin<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Alexeev Nizhniy Novgorod State Technical University, Nizhniy Novgorod, 603155 Russia  
e-mail: pleskova@mail.ru

<sup>b</sup> Institute of Applied Physics, Russian Academy of Sciences, Nizhniy Novgorod, 603150 Russia

Received September 22, 2009

**Abstract**—A decline in CFU of gram-positive and gram-negative bacteria on the surface of UV illuminated TiO<sub>2</sub> films (wavelength of 380 nm) is shown. A 29, 45, and 47% decrease in bacterial viability of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Escherichia coli*, respectively, was seen following a 12-min exposition. It was first discovered that the reuse of TiO<sub>2</sub> films to test a bacterial suspension for viability removes UV-induced bactericidal activity. However, annealing of TiO<sub>2</sub> at a temperature above 400°C restores the photoinduced bactericidal activity to its initial state.

УДК 577.154.33+577.352.135

## ИЗМЕНЕНИЕ pH И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА СРЕДЫ В ПРОЦЕССЕ РОСТА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ: ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЕЙ И ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ

© 2011 г. Д. Согомонян, К. Акопян, А. Трчунян

Ереванский государственный университет, биологический факультет, Ереван, 0025 Армения

e-mail: Trchounian@ysu.am

Поступила в редакцию 09.07.2009 г.

При выращивании *Lactobacillus salivarius* 1588 и 3823, а также *L. acidophilus* 101E и *Lactococcus lactis* 3690 в анаэробных условиях в среде с глюкозой наблюдали уменьшение pH и падение окислительно-восстановительного потенциала. Эти параметры и протонная проводимость мембраны бактерий ( $C_M^{H^+}$ ) изменялись в средах с разным pH. Окислитель феррицианид и восстановитель DL-дитиотреитол влияли на показатели роста бактерий и величину  $C_M^{H^+}$ , а также изменяли выведение  $H^+$  из клеток и поглощение  $K^+$  клетками в экспериментальных условиях. Предлагается использование окислителей и восстановителей для регуляции роста и сопряженного с переносом  $H^+$  транспорта ионов у молочнокислых бактерий.

Молочнокислые бактерии растут в анаэробных условиях, осуществляя сбраживание сахара (глюкоза) с образованием преимущественно молочной [1] и других органических кислот. При этом происходит закисление среды, изменяется протондвижущая сила  $\Delta\mu_{H^+}$  [2, 3], что обусловлено падением pH среды, изменением протонной проницаемости или активности транспортных и ферментных систем клеточной мембраны.

В то же время известно, что для роста бактерий в анаэробных условиях более благоприятны нейтральный pH и более восстановленная среда [4–10]. При снижении pH, по-видимому, происходит падение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) у молочнокислых бактерий. Показано, что изменение ОВП в суспензии бактерий отражает процессы на поверхности клеток [11]. Предполагается, что значение ОВП может определять пути переноса электронов и транспорт  $H^+$  через мембраны бактерий, генерацию  $\Delta\mu_{H^+}$  и другие процессы [9, 10]. Например, от окисленного или восстановленного состояния тиоловых групп белков определяемого ОВП может зависеть активность некоторых транспортных систем и мембраносвязанных ферментов [9, 10].

На *Escherichia coli* и других бактериях, растущих в анаэробных условиях, была выявлена роль ОВП, различных окислителей и восстановителей при их росте [4, 7–10, 12]. Действие этих соединений связано либо с изменением величины ОВП, особенно в случае непроницающих веществ, таких, как, напри-

мер, феррицианид, либо с их непосредственным взаимодействием с поверхностью клетки и последующим влиянием на внутриклеточные процессы. Можно предполагать, что восстановители должны стимулировать рост бактерий, однако DL-дитиотреитол (ДТТ), как недавно показано для *E. coli* [13], ингибирует их рост, а при относительно высоких концентрациях становится токсичным [9].

Изучение изменений pH и ОВП в различных условиях, а также эффектов окислителей и восстановителей на показатели роста молочнокислых бактерий и сопряженные с переносом  $H^+$  процессы могут иметь важное значение в механизмах регуляции роста, в оценке функциональных процессов в кишечнике животных и человека, применении этих бактерий в технологических целях.

Цель работы – поиск корреляции между величиной pH и значением ОВП среды для выращивания некоторых молочнокислых бактерий и динамикой их роста в анаэробных условиях, а также установление действия окислителей и восстановителей.

### МЕТОДИКА

**Бактерии и их выращивание.** В работе использовали молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus* 101, *L. salivarius* 1588 и 3823, *Lactococcus lactis* 3690, которые были предоставлены Ф. Асатрянном (кафедра технологии молока и молочных продуктов Армянского государственного аграрного университета, г. Ереван, Армения).

Выращивание бактерий проводили в анаэробных условиях в среде с глюкозой (начальный pH

Динамика ОВП и  $\mu$  при росте молочнокислых бактерий при различных значениях рН

Бактерия	рН	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	ОВП, мВ	
			в начале лог-фазы	в середине лог-фазы
<i>L. acidophilus</i> 101	6.5	0.70	+17	-380
	8.0	0.71	+15	-382
<i>L. lactis</i> 3690	6.5	0.75	+16	-300
	8.0	0.76	+17	-310
<i>L. salivarius</i> 1588	6.5	1.03	+50	-234
	8.0	1.05	+40	-235
<i>L. salivarius</i> 3823	6.5	0.75	+28	-266
	8.0	0.76	+18	-281

6.5 или как отмечено в тексте), при 40°C [2, 3]. Начальный рН среды определяли с помощью чувствительного рН-метра с соответствующим селективным электродом (“Hanna Instruments”, Португалия) и регулировали с помощью NaOH и HCl. В среду вносили феррицианид или ДТТ в концентрациях от 1 до 5 мМ. За ростом бактерий следили по изменению оптической плотности (ОП) суспензии с помощью фотоэлектрического фотометра КФК-3 (Загорский оптико-механический завод, Россия) при длине волны 650 нм. Продолжительность лаг-фазы определяли графически, как время до начала логарифмической фазы (лог-фаза, пересечение касательных к кривым роста) [14, 15]. Удельную скорость роста ( $\mu$ ) определяли, как частное от деления  $0.693 (\ln 2)$  на время удвоения ОП в интервале, когда изменение логарифма ОП во времени носило линейный характер (логарифмическая фаза роста) [14, 15];  $\mu$  выражали в ч<sup>-1</sup> или мин<sup>-1</sup>. Значения ОП линейно зависели от количества бактерий в единице объема, определяемого методом разведений с помощью таблиц Мак-Креди [16]. Размеры и форму клеток бактерий изучали с помощью микроскопа БиоЛАМ с окуляр-микрометром типа МОВ-1-15х4 (“ЛОМО”, Россия) и водной иммерсии [2]: они были практически одинаковы для каждого вида бактерий при росте в средах с рН 6.5 или 8.0 (не приведено). Реактивы, использованные в работе, не приводили к агрегации клеток.

**Определение ОВП.** Величину ОВП суспензии бактерий измеряли с помощью платиновых электродов ( $E_h$ ) типа ЭПВ-01 (Гомельский завод измерительных приборов ГЗИП, Беларусь) или типа РТ42ВНС (“Hanna Instruments”, Португалия), как описано ранее [4–8]. Поскольку ОВП отражает соотношение окисленных и восстановленных веществ в среде [10, 17], то его величина мало зависит от количества бактерий в единице объема: при увеличении такого количества бактерий в 2 раза значе-

ние ОВП возрастает лишь на 25–27 мВ, что нами не учитывалось.

При использовании платинового электрода в паре с титан-силикатным ( $E_h'$ ) типа ЭО-021 (“ГЗИП”, Беларусь), который в отличие от платинового нечувствителен к молекулярному кислороду или молекулярному водороду [7, 8, 14, 18], регистрировали существенные различия в показаниях электродов. Выделение  $H_2$  в суспензии бактерий определяли также химическим методом, основанным на обесцвечивании 0.2 мМ раствора перманганата калия в 1 н.  $H_2SO_4$  в присутствии  $H_2$  [18].

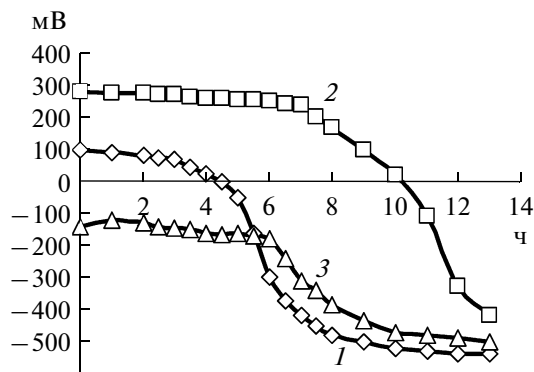
**Определение протонной проводимости мембраны бактерий ( $C_m^{H^+}$ ).**  $C_m^{H^+}$  определяли путем регистрации потока  $H^+$  через мембрану до установления равновесия при введении в среду малых порций HCl (кислотный удар), как описано ранее [19, 20].

О достижении электрохимического равновесия в распределении  $H^+$  по обе стороны мембраны судили по отсутствию изменений рН при введении протонофора карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона (2 мкМ) через 30 с после кислотного удара. Изменение буферной емкости при кислотном ударе было мало и практически не влияло на величину потока  $H^+$ . Увеличение проницаемости мембраны для других ионов с помощью валиномицина и использования растворов с высоким содержанием  $K^+$  приводили к резкому падению градиента их концентрации через мембрану. Наличие проникающих анионов в среде обеспечивало прохождение  $H^+$  через мембрану.

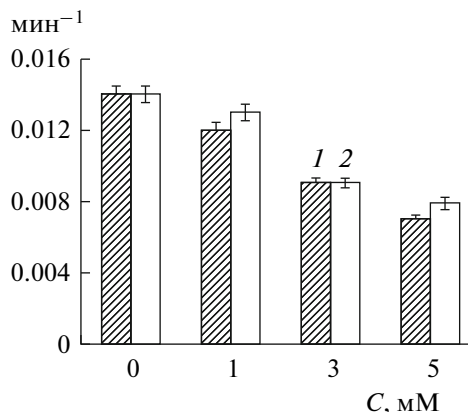
$C_m^{H^+}$  выражали в количестве переносимых  $H^+$  в единицу времени (мкмоль/с) в пересчете на единицу рН и единицу сухой массы бактерий. Сухую массу бактерий определяли взвешиванием суспензии после выдерживания при 60°C в течение 3 ч и более (до постоянного веса) [8, 14, 18].

**Определение потока протонов и ионов калия через мембрану бактерий.** Потоки  $H^+$  и  $K^+$  через мембрану бактерий определяли с помощью соответствующих селективных электродов, как описано [2, 3, 7, 8], в экспериментальных условиях, когда бактерии отмывали в дистиллированной воде и переносили в 150 мМ трис-фосфатный буфер (рН 7.5), содержащий 0.4 мМ  $MgSO_4$ , 1 мМ NaCl и 1 мМ KCl, и затем добавляли экзогенный источник энергии (глюкоза). Изменение показаний электродов калибровали с помощью малых количеств 0.1 н. HCl и 0.1 М KCl.

**Другие методы.** Все измерения проводили в закрытой термостатируемой камере, в которой анаэробные условия оценивали по появлению синей окраски экспериментального буфера при добавлении 1.5 мМ метилвиологена и его титрования с помощью 0.1 М дитионита. Реактивы, использованные



**Рис. 1.** Падение ОВП, регистрируемое с помощью платинового электрода ( $E_h$ ), в процессе анаэробного роста *L. salivarius* 1588 в слабокислой среде (рН 6.5): 1 – контроль, без феррицианида или ДТТ; 2 – в присутствии 1 мМ феррицианида; 3 – в присутствии 1 мМ ДТТ. Феррицианид или ДТТ вводили в ростовую среду непосредственно перед инокуляцией бактерий.



**Рис. 2.** Изменение скорости роста *L. salivarius* 1588 в присутствии феррицианида или ДТТ различных концентраций: 1 – феррицианид; 2 – ДТТ. Другие условия те же, что и на рис. 1.

в работе, не влияли на показания селективных электродов.

В работе приведены данные по средним арифметическим 2–3 независимых измерений, стандартная ошибка которых не превышала 5%.

**Реактивы.** В исследованиях применяли D-глюкозу (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь), бактериологический агар-агар, дрожжевой экстракт, триптон, трис (“Carl Roth GmbH & Co”, Германия), валиномицин, N,N'-дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД), DL-дитиотреитол (ДТТ), дитионит, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (КХФГ), метилвиологен (“Sigma”, США) и другие реактивы аналитической чистоты.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Закисление среды и падение ОВП при росте молочнокислых бактерий.** Молочнокислые бактерии, изученные в настоящей работе, росли с высокой скоростью в анаэробных условиях при сбраживании глюкозы как в слабокислой (рН 6.5), так и в щелочной (рН 8.0) среде (таблица). При этом в стационарной фазе роста в обоих средах наблюдалось закисление на 1–1.5 единицы рН от исходной величины (не приведено) и одновременное падение ОВП до низких отрицательных значений ( $E_h$ , регистрируемое с помощью платинового электрода, таблица). Такое падение  $E_h$  при росте, например, *L. salivarius* 1588, имело место от положительных ( $+50 \pm 7$  мВ) в начале лог-фазы до отрицательных (до  $-565 \pm 23$  мВ) значений (рис. 1) с переходом культуры в стационарную фазу (10–12 ч); такое падение больше в слабокислой среде (не приведено).

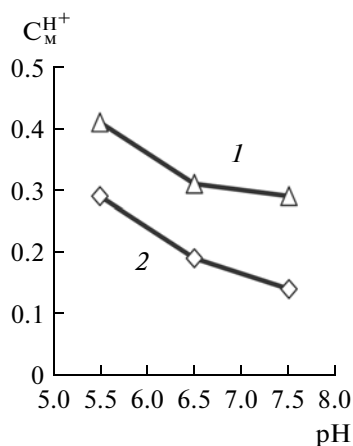
При росте бактерий выделялись кислоты и другие продукты брожения [1], которые определяют закисление среды и падение ОВП, показанные для разных

бактерий [3–8, 10]. Связь между изменением этих величин в бактериальных средах представляется неоднозначной [10], хотя теория окислительно-восстановительных процессов для относительно простых окислительно-восстановительных систем предполагает разнонаправленность изменения рН и ОВП [10, 17]. Динамика изменений этих величин указывает на важность восстановительных условий для роста бактерий и позволяет допустить, что падение ОВП определяет рост культуры и его последующий переход в стационарную фазу. В позднюю стационарную фазу (через 22–24 ч) величина  $E_h$  несколько повышается (на  $125 \pm 12$  мВ), что указывает на усиление окислительных процессов в культуре.

Окислитель феррицианид, плохо проникающий в клетку и поддерживающий положительные значения ОВП ( $+280 \pm 10$  мВ, рис. 1), влиял на рост *L. salivarius*, увеличивая почти в 2 раза продолжительность лаг-фазы и уменьшая скорость роста (рис. 2). Такое влияние наблюдалось при рН среды 6.5, но не 8.0 (не приведено) и зависело от концентрации окислителя в диапазоне от 1 до 5 мМ (рис. 2). При этом закисление среды уменьшалось, а падение  $E_h$  до отрицательных значений (до  $-490$  мВ) наблюдалось значительно позднее – уже в логарифмическую фазу роста. В присутствии феррицианида (3 мМ) падение ОВП более выражено (почти до  $-200$  мВ) при рН 8.0, нежели при рН 6.5.

ДТТ известен как восстановитель тиоловых групп белков [9, 13, 20]. Этот реагент, понижающий величину ОВП до отрицательных значений ( $-160$  мВ при концентрации ДТТ в 1 мМ, рис. 1), также влиял на рост бактерий, уменьшая скорость роста в зависимости от концентрации ДТТ (от 1 до 5 мМ, рис. 2). Такой эффект наблюдался при рН 6.5 и не отличался от действия ДТТ на параметры роста *E. coli* [5, 9]. Однако при щелочном рН ДТТ (1 мМ),





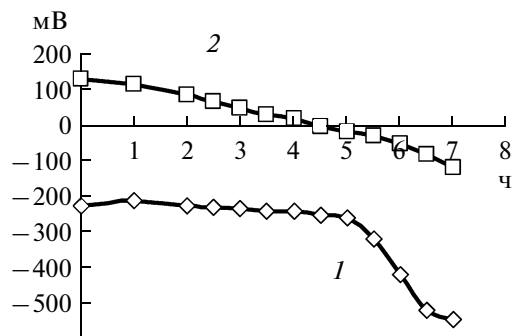
**Рис. 3.**  $C_M^{H^+}$  у *L. acidophilus* 101 (1) и *L. salivarius* 1588 (2), выращенных в средах с различным рН. По оси ординат –  $C_M^{H^+}$ , мкмоль  $H^+$ /мг сух. массы/ед. рН. Другие условия те же, что и на рис. 1.

понижающий ОВП до отрицательных значений, несколько стимулировал рост молочнокислых бактерий. Возможно, что восстановление тиоловых групп мембранных белков на поверхности бактерий с помощью ДТТ более выражено в щелочной среде.

Таким образом, можно отметить, что при достижении стационарной фазы роста молочнокислых бактерий ОВП падает до низких отрицательных значений, однако природа такого падения не ясна.

**Изменение протонной проводимости мембраны при росте бактерий в разных условиях.**  $C_M^{H^+}$  молочнокислых бактерий может служить показателем состояния мембраны. Этот параметр играет роль в процессах трансформации энергии, связанных с трансмембранным переносом  $H^+$ . Он претерпевает заметные изменения при росте *L. acidophilus*, *L. salivarius* (рис. 3) и других молочнокислых бактерий (не приведено) в средах с разным рН. Значения  $C_M^{H^+}$  весьма различны у разных молочнокислых бактерий и их штаммов:  $C_M^{H^+}$  у *L. salivarius* 3823 выше, чем у *L. salivarius* 1588, почти в 1.3–1.6 раз в зависимости от рН.

Значение  $C_M^{H^+}$  увеличивалось почти в 1.4–2.1 раза (в зависимости от вида бактерий) при понижении рН от слабощелочных до кислых (рис. 3), что показано и у других бактерий [19–21]. Разные значения  $C_M^{H^+}$  могли быть связаны с изменением липидного и белкового состава мембраны при росте бактерий в различных средах [22]. Изменения  $C_M^{H^+}$  коррелировали с падением ОВП.

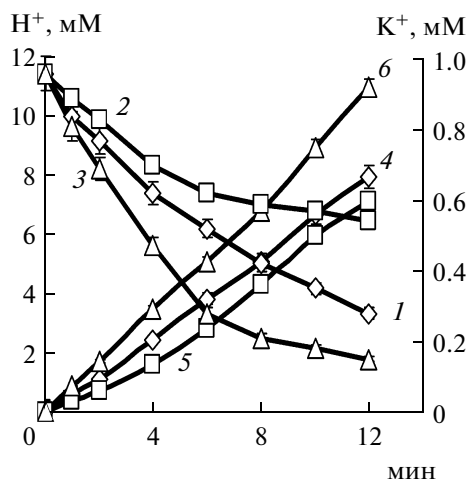


**Рис. 4.** Динамика ОВП, определяемого с помощью пары электродов – платинового и титан-силикатного в процессе роста *L. salivarius* 1588: 1 – показания платинового электрода ( $E_h$ ); 2 – показания титан-силикатного электрода ( $E_h'$ ). Другие условия те же, что и на рис. 1.

Более того, феррицианид и ДТТ вызывали разнонаправленные изменения  $C_M^{H^+}$  у *L. salivarius* 1588, уменьшая в 1.2 и увеличивая в 1.3 раза ее значения при рН 6.5. Такие эффекты окислителя и восстановителя приводят, возможно, к сдвигам в величинах потока ионов через мембрану бактерий и могут лежать в основе изменений в росте бактерий. Последнее предположение согласуется с тем, что протонофоры и слабые кислоты, приводящие к увеличению  $C_M^{H^+}$ , подавляют рост бактерий [23, 24].

**Изменения ОВП, регистрируемые разными электродами.** Весьма интересным оказалось использование пары окислительно-восстановительных электродов – платинового и титан-силикатного (см. Методику). Падение  $E_h'$ , регистрируемое с помощью титан-силикатного электрода у *L. salivarius* (рис. 4), происходило с меньшей скоростью, при этом наблюдалась заметная разница в величинах ОВП в логарифмическую фазу роста. Такая разница регистрировалась и в присутствии ДТТ (рис. 4). Возможно, это свидетельствует о выделении  $H_2$  [7, 8, 18], что может быть результатом смешанного брожения [25], однако такой тип брожения у молочнокислых бактерий не описан [1]. Выделение  $H_2$  было подтверждено и химическим методом, а также показано у других видов бактерий [26, 27], хотя наши данные не согласуются с результатами работы Вигнаса и Биллуда [28], согласно которым гидрогенная активность в молочнокислых бактериях отсутствует.

**Влияние окислителя и восстановителя на транспорт ионов через мембраны бактерий.** Молочнокислые бактерии в экспериментальных условиях в



**Рис. 5.** Кинетика выделения  $H^+$  (1–3) и поглощения  $K^+$  (4–6) бактериями *L. salivarius* 1588. 1, 4 – контроль, без феррицианида или ДТТ; 2, 5 – в присутствии 1 мМ феррицианида; 3, 6 – в присутствии 1 мМ ДТТ. Концентрация глюкозы – 20 мМ. Количество бактерий было равно  $10^9$  кл./мл.

среде с глюкозой, действительно, осуществляют  $H^+$ – $K^+$ -обмен (рис. 5). Такой обмен хорошо изучен [2, 3]: он имеет устойчивую стехиометрию ДЦКД-чувствительных потоков  $H^+$  к  $K^+$  и, возможно, осуществляется посредством  $H^+$ -транслоцирующей  $F_0F_1$ -АТФазы и калиевой транспортной системы, объединенными в  $H^+$ – $K^+$ -насос. Представление о  $H^+$ – $K^+$ -насосе подробно обосновано на других бактериях [26, 27]. При этом перенос энергии внутри насоса может осуществляться через дитиол-дисульфидные переходы, зависящие от ДТТ [5, 9].

Феррицианид уменьшал, а ДТТ, наоборот, усиливал потоки  $H^+$  и  $K^+$  через мембрану *L. salivarius* (рис. 5). Такое воздействие этих соединений может объясняться как непосредственным действием реагента на одну или обе транспортные системы одновременно, или же опосредованно – на состояние тиоловых групп этих белков, изменяя дитиол-дисульфидный переход между ними [26, 27]. Такие переходы могут приводить к конформационным изменениям в соответствующих белках. Нельзя исключить возможность конформационных изменений в белках за счет изменения величины ОВП (рис. 2), других изменений, приводящих к сдвигам в  $C_m^{H^+}$  (см. выше) и  $\Delta\mu_{H^+}$ .

Таким образом, результаты указывают на связь изменений рН и ОВП среды в процессе роста бактерий и их роль в регуляции транспортных процессов у молочнокислых бактерий.

Окислители и восстановители могут быть использованы для регуляции роста в лабораторных и опытно-промышленных условиях и транспорта

ионов у этих бактерий. Эти реагенты, приводящие к направленным изменениям ОВП, могут быть использованы для оценки процессов роста и метаболизма бактерий в кишечнике животных и человека.

Авторы благодарны Ф. Асатрянцу за предоставление молочнокислых бактерий, а также Г. Киракосян за советы и помощь в проведении измерений.

Работа выполнена в рамках тем (0167-2005 и 1012-2008), финансируемых Министерством образования и науки Республики Армения, и гранта Армянского национального фонда образования и науки (США).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука, 1975. 384 с.
2. Трчунян А.А., Оганджян Е.С., Мартirosов С.М. // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 292–294.
3. Trchounian A.A., Ogandjanian E.S., Martirosov S.M. // Bioelectrochem. Bioenerg. 1987. V. 17. P. 503–508.
4. Киракосян Г., Баграмян К., Трчунян А. // Биофизика. 2001. Т. 46. С. 245–251.
5. Киракосян Г., Баграмян К., Трчунян А. // Биофизика. 2005. Т. 50. С. 1095–1099.
6. Breznak J.A., Costilow R.H. // Methods for General and Molecular Bacteriology / Eds. Gerhardt P., Nurrey R.G., Wood W.A., Krieg N.R. Washington DC.: ASM Press, 1994. P. 137–155.
7. Bagramyan K., Trchounian A. // Bioelectrochem. Bioenerg. 1997. V. 43. P. 129–134.
8. Bagramyan K., Galstyan A., Trchounian A. // Bioelectrochemistry. 2000. V. 51. P. 151–156.
9. Kirakosian G., Bagramyan K., Trchounian A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 325. P. 803–806.
10. Васильян А., Трчунян А. // Биофизика. 2008. Т. 53. С. 281–293.
11. Баграмян К., Карагулян Э., Саргсян Г., Трчунян А. // Биол. журн. Армении. 1988. Т. 41. С. 394–398.
12. Kirakosyan G., Trchounian A. // Bioelectrochemistry 2007. V. 70. P. 58–63.
13. Riondet C., Cachon R., Wache Y., Alcaez G., Divies C. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 262. P. 595–599.
14. Mnatsakanyan N., Bagramyan K., Trchounian A. // Cell Biochem. Biophys. 2004. V. 41. P. 357–366.
15. Mirzoyan N., Pepoyan A., Trchounian A. // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 254. P. 81–86.
16. Кох А. // Методы общей бактериологии / Ред. Герхард Ф. М.: Мир, 1983. Т. 1. С. 442–511.
17. Bagramyan K., Mnatsakanyan N., Poladian A., Vassilian A., Trchounian A. // FEBS Lett. 2002. V. 516. P. 172–178.
18. Дэвис Е.А. Количественные проблемы биохимии. М.: Мир, 1980. 376 с.
19. Акопян К., Захарян Э., Киракосян Г., Мнацаканян Н., Баграмян К., Трчунян А. // Биофизика. 2002. Т. 47. С. 1064–1067.

20. Akopyan K., Trchounian A. // Cell Biochem. Biophys. 2006. V. 46. P. 201–208.
21. Акопян К., Трчунян А. // Биофизика. 2005. Т. 50. С. 680–683.
22. Yohannes E., Barnhart D.M., Slonczewski J.L. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 192–199.
23. Nakano S., Onoda T. // J. Basic. Microbiol. 1989. V. 29. P. 163–169.
24. Kurdi P., Kawanishi K., Mizutani K., Yokota A. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. P. 1979–1986.
25. Sawers G., Bock A. // In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology / Ed. Neidhardt C. Washington DC.: ASM Press, 1996. P. 262–282.
26. Trchounian A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 315. P. 1051–1057.
27. Мнацаканян Н., Захарян Э., Баграмян К., Василян А., Поладян А., Трчунян А. // Биологические мембраны. 2002. Т. 19. С. 181–190.
28. Vignais P.M., Billoud B. // Chem. Rev. 2007. V. 107. P. 4206–4272.

## pH and Oxidation-Reduction Potential Change of Environment during a Growth of Lactic Acid Bacteria: Effects of Oxidizers and Reducers

D. Sogomonyan, K. Akopyan, and A. Trchounian

Yerevan State University, Biological Faculty, ul. Manukyan 1A, Yerevan, 0025 Armenia  
e-mail: trchounian@ysu.am

Received July 9, 2009

**Abstract**—Decrease of pH and dropping of oxidation–reduction potential have been observed during growing *Lactobacillus salivarius* 1588 and 3823, *Lactobacillus acidophilus* 101E, and *Lactococcus lactis* 3690 in anaerobic conditions in medium with glucose acidification. These parameters and membrane proton permeability of bacteria ( $C_M^{H^+}$ ) changed in the mediums with different pH. Oxidizer ferricyanide and reducer DL-dithiothreitol affected the bacterial growth and their changed  $H^+$  extrusion from the cells and  $K^+$  uptake by the cells in experiment conditions. Application of oxidizers and reducers are suggested for regulation of growth related with  $H^+$  ion transport in lactic acid bacteria.

УДК 579.66/577.18

## ЭКСПРЕССИЯ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ *Trigonopsis variabilis* В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Pichia pastoris*

© 2011 г. В. А. Редо, Е. К. Новикова, М. А. Эльдаров

Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: eldarov@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 13.11.2009 г.

Получены эффективные рекомбинантные штаммы *Pichia pastoris*, продуцирующие с высоким выходом функционально-активный гибрид оксидазы D-аминокислот *Trigonopsis variabilis*, слитой с хитин-связывающим доменом хитиназы A1 *Bacillus circulans* (DAOcbd). Исследована зависимость уровней продукции DAOcbd от числа копий “кассеты экспрессии”, интегрированных в АОХ1 локус рекомбинантных штаммов. Показано, что синтезируемая DAOcbd может быть легко очищена и иммобилизована на хитиновых сорбентах и обладала высокой удельной активностью. Созданные штаммы, методы их культивирования, выделения DAOcbd могут быть использованы для разработки технологий получения биокатализаторов в технологических процессах получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты.

Оксидазы D-аминокислот (ОДА, КФ 1.4.3.3), выделенные из дрожжей *Trigonopsis variabilis*, *Rhodotorula gracilis* – промышленные ферменты, широко используемые в современных биокаталитических технологиях получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты – исходного соединения-предшественника для производства полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков 2–4-го поколений [1, 2].

Усовершенствование известных методов получения препаратов этих ферментов, в том числе с помощью технологий рекомбинантных ДНК, представляет несомненный практический интерес. К настоящему времени известны рекомбинантные плазмидные ДНК, направляющие синтез функционально-активных ферментов ОДА *T. variabilis* [3], *R. gracilis* [4] в клетках бактерий [5–7] или дрожжей [8, 9].

Необходимо отметить, что сверхпродукция ОДА токсична для распространенных хозяйских штаммов *Escherichia coli*, поскольку сопряжена с высвобождением токсичного соединения – перекиси водорода и подавлением синтеза клеточной стенки из-за истощения внутриклеточного пула D-аминокислот [5, 6].

Перспективной альтернативой клеткам бактерий как системы экспрессии ОДА являются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* [10] и *Hansenula polymorpha* [11]. Использование мощных регулируемых промоторов генов утилизации метанола этих дрожжей позволяет легко проводить оптимизацию процессов ферментации рекомбинантных штаммов-продуцентов ОДА, а токсичность экспрессируемых оксидаз может быть устранена за счет локализации синтезируемых ферментов в пероксисомы дрожжевых клеток, содержащих также значительное количество каталазы, нейтрализующей токсичное действие перекиси водорода. В то же время хорошо известно, что используемые в составе биокатали-

заторов препараты ОДА должны быть свободны от примесей каталазы и других посторонних белков, снижающих эффективность биоконверсии цефалоспоринона С. Необходимость получения высокоочищенных препаратов ОДА значительно затрудняет их выделение из биомассы штаммов метилотрофных дрожжей. Этот недостаток, впрочем, может быть легко преодолен за счет создания систем экспрессии вариантов ОДА, модифицированных присоединением различных аффинных доменов, например, олигогистидиновых остатков, и очистки синтезируемых гибридных белков с помощью аффинной хроматографии [9].

Ранее нами была сконструирована рекомбинантная плазмидная ДНК, направляющая в клетках *E. coli* синтез модифицированной ОДА *T. variabilis* слитой с последовательностью хитинсвязывающего домена хитиназы A1 *B. circulans* [12]. Синтезируемый гибридный белок DAOcbd сохранял полную энзиматическую активность ОДА, мог быть легко очищен и иммобилизован на доступных и недорогих хитиновых сорбентах, отличающихся биологической инертностью, экономичностью и стабильностью.

Цель работы – разработка системы экспрессии белка DAOcbd в метилотрофных дрожжах *P. pastoris*.

### МЕТОДИКА

**Материалы.** Эндонуклеазы рестрикции, T4 ДНК-лигаза, Taq-полимераза, Pfu-ДНК-полимераза производства “МВІ Fermentas” (Вильнюс, Литва), “Сибэнзим” (Новосибирск, Россия), микробиологические среды – фирмы “Difco” (США), изопропил-β-D-тио-галактозид, реагенты для электрофореза, другие реактивы – фирмы “Sigma-Aldrich” (США), магнитные хитиновые гранулы для иммобилизации белков с хи-

тин-связывающим доменом – фирмы “New England Biolabs” (США).

**Штаммы микроорганизмов.** Для конструирования рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* XLI-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F*<sup>proAB lacIqZ?M15 Tn10 (Tetr)</sup>] (фирма “Stratagene”, США). Экспрессию DAOcbd осуществляли в штамме *P. pastoris* GS115 his4[mut+] (“Invitrogen”, США).

**ДНК манипуляции и компьютерные программы.** Для конструирования вектора экспрессии гена гибридного белка DAOcbd в *P. pastoris* использовали плазмиду pVR1, обеспечивающую в клетках *E. coli* синтез гибридного белка DAOcbd под контролем T7 промотора и терминатора экспрессионного вектора pET23a [12], и плазмиду pPicVR2, содержащую каскету экспрессии гетерологичных генов для *P. pastoris*, включающую промотор AOX1 *P. pastoris* и терминатор TEF1 *Ashbya gossypii*. Плаزمида pPicVR2 также несет маркерный ген *Sh-ble* из *Streptoalloteichus hindustanus* под контролем промотора гена TEF1 и терминатора гена *CYC1 Saccharomyces cerevisiae*, определяющий устойчивость к зеоцину рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, трансформированных плазмидой pPicVR2 и ее производными.

Выделение РНК и геномной ДНК из дрожжей, плазмидной ДНК, ПЦР-амплификацию, конструирование плазмид и их анализ проводили с использованием известных методов генетической инженерии [13]. Определение нуклеотидных последовательностей ПЦР-фрагментов и плазмид проводили путем автоматического секвенирования с помощью набора ABIPrizm 3100 DNA Sequencer с использованием набора Applera “Fluorescent Big Dye Cycle Sequencing Kit”. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью пакета программ VectorNTI8 [14] (“Invitrogen”, США).

**Конструирование вектора для экспрессии DAOcbd в *P. pastoris*.** Для конструирования вектора pVR2, обеспечивающего многокопийную интеграцию метанол-индуцируемой каскеты экспрессии гена гибридного белка DAOcbd в *P. pastoris* NdeI/XhoI фрагмент размером 1000 п.н. плазмиды pVR1, кодирующий нужный ген, встраивали в NdeI/XhoI вектор pPicVR2.

**Трансформация *P. pastoris*.** Мультикопийные интегративные трансформанты *P. pastoris* получали путем электропорации клеток штамма GS115 линейризованной плазмидой pVR2 с последующей селекцией вариантов на чашках с различными концентрациями зеоцина. Приготовление электрокомпетентных клеток и саму процедуру электропорации осуществляли как описано [15]. После электропорации клетки инкубировали 1 ч при 30°C в 1 мл 1 М сорбитола и высевали на чашки с твердой средой, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы и 1 М сорбитола, а также различные концентрации зеоцина (100, 500, 1000 и 2000 мкг/мл). Отбор мультикопийных

интегрантов и селекцию Mut+ клонов проводили в соответствии с рекомендациями фирмы Invitrogen [15].

**Культивирование трансформантов.** Индивидуальные клоны трансформантов и исходный реципиентный штамм *P. pastoris* GS115 культивировали в 25 мл среды, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 6.0, 1.34% дрожжевых азотистых оснований [15] в колбах на 250 мл в течение 16 ч при 29°C до ОП ~ 3–5 ед. Клетки собирали центрифугированием при 3000 g 5 мин и ресуспендировали в 100 мл этой же среды с добавлением 1% метанола [15], доводя оптическую плотность культур (ОП<sub>600</sub>) до 1.0. Дальнейшее культивирование проводили в 1 л колбах 72 ч, добавляя через каждые 24 ч в среду 1 мл метанола для поддержания стабильной индукции с периодическим отбором проб для оценки уровня экспрессии DAOcbd.

**Селекция трансформантов.** Отобранные Mut+ трансформанты штамма GS115, устойчивые к зеоцину, анализировали на наличие вставки гена DAOCBD методом ПЦР-скрининга [15] с праймерами DAO1 5'-GGCCGCTAAAGGTTTGGAC-3' и DAO2 5'-TCCAGGATTGTCCACGATGA-3'.

Качественный анализ экспрессии DAOcbd в отобранных клонах проводили путем определения активности ОДА в неочищенных экстрактах клеток, выращенных в условиях индукции индивидуальных трансформантов с помощью теста, основанного на детекции перекиси водорода [16]. Для этого осажденные в микроцентрифужных пробирках клетки из 2 мл культуры ресуспендировали в 500 мкл буфера, содержащего 50 мМ натрий-фосфата, pH 7.4; 1 мМ фенил-метил-сульфонил фторида; 1 мМ ЭДТА; 5% глицерина и разрушали путем интенсивного встряхивания на вортексе с равным объемом стеклянных бус (0.5 мм) с периодическим охлаждением проб в ледяной бане. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 14000 g, 10 мин, +4°C. Осветленный супернатант инкубировали в течение часа при интенсивном встряхивании на холоду с 50 мкл суспензии покрытых хитином магнитных гранул, предварительно двукратно промытых в 500 мкл буфера СВ (500 мМ NaCl; 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0; 1 мМ ЭДТА; 0.5% Тритон X-100). Гранулы осаждали магнитом, промывали трехкратно буфером СВ и добавляли 1 мл насыщенного кислородом буфера для определения активности ОДА, содержащего 200 мМ D-аланина, 0.86 мМ дианизидина, 50 мМ фосфатный буфер, pH 8.0, пероксидазу хрена 0.5 мг/мл. Быстрое развитие бордового окрашивания свидетельствует о наличии иммобилизуемой на хитиновых магнитных частицах функционально-активной ОДА.

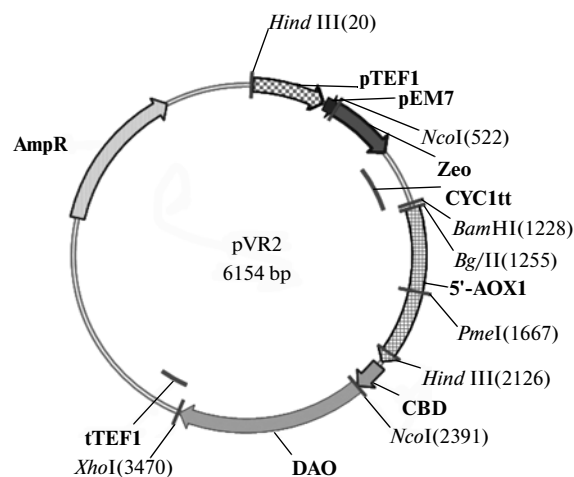
**Определение активности DAOcbd в ходе роста культуры.** Динамику накопления активности ОДА у “положительных” клонов исследовали с помощью теста, основанного на определении концентрации кетокислоты [16]. Для этого 50 мкл грубых экстрак-

тов, полученных из клеток, отобранных на разных стадиях культивирования, инкубировали с 250 мкл 10 mM D-аланина в 50 mM фосфатном буфере, pH 8.0, в течение 15 или 30 мин, реакцию останавливали добавлением 100 мкл насыщенного раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 н. HCl и через 5 мин к раствору добавляли 300 мкл 3 M NaOH и 2.5 мл дистиллированной воды. После инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре измеряли поглощение раствора при 550 нм, которое сравнивали с калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных концентраций пириновидной кислоты.

Оценку уровня продукции DAOcbd проводили, пересчитывая известное из данных определения удельной активности содержание DAOcbd на общее содержание белка во фракции грубых экстрактов, определенное по модифицированному методу Брэдфорд [17].

**Определение копийности вставок у трансформантов *P. pastoris*.** Оценку числа копий интегрированной плазмиды pVR2 в полученных трансформантах осуществляли методом Саузерн-гибридизации. Выделенные по стандартной методике [18] препараты геномной ДНК гидролизовали совместно рестриктазами BamHI и XhoI. Разделенные в 1% агарозном геле образцы переносили на мембрану HybondN+ и гибридизовали с меченым  $\alpha^{32}$  дАТФ с помощью набора DecaLabel™ DNA Labeling Kit (“MBI Fermentas”, Литва) BamHI/XhoI фрагментом 2000 п.н. плазмиды pVR2, содержащим промотор AOX1 и ген *DAOcbd*. Мембрану сканировали с помощью прибора Typhoon™ 9400 (GE Healthcare, США) и проводили количественную оценку интенсивности сигналов гибридизации с помощью программы Image Quant.

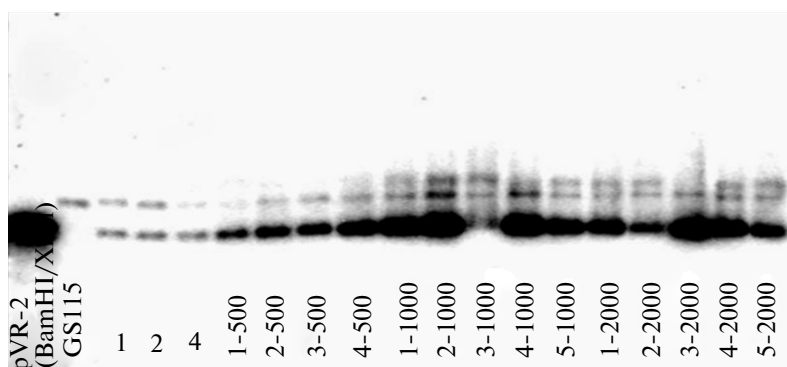
**Анализ уровней мРНК гена *DAOcbd*.** Выделение суммарной РНК из дрожжевых клеток проводили путем обработки экстрактов клеток кислым фенолом в присутствии гуанидин тиоцианата [19]. Ана-



**Рис. 1.** Физическая и генетическая карта вектора pVR2. Обозначено положение кодирующих областей доменов гена *DAOcbd* (CBD и DAO), промотора гена алкогольоксидазы *P. pastoris* (5'-AOX1); терминатора транскрипции гена *TEF1 A. gossypii* (tTEF1); гена устойчивости к зеоцину (zeo) промотора гена *TEF1 S.cerevisiae* (pTEF1), маркерного гена устойчивости к ампициллину (*Amp*) и некоторых уникальных сайтов рестрикции.

лиз полученных препаратов проводили с помощью Нозерн-блоттинга при использовании денатурирующего фореза в агарозном геле, содержащем формальдегид (2.2 M), по стандартной методике [19]. Мембрану гибридизовали с мечеными ПЦР фрагментами, соответствующими кодирующим последовательностям генов *GPD P. pastoris* и *DAO*, полученными с использованием праймеров GPD1 5'-GCATTGGAGACAATGTTCAAGTCAG-3' и GPD2 5'-AGATTATTGGAAACCACCAGAATCG-3' (ген *GPD P. pastoris*) и DAO1/DAO2 (см. выше, ген *DAO T. variabilis*).

**Электрофорез белков.** Анализ белковых экстрактов рекомбинантных штаммов дрожжей и фракции



**Рис. 2.** Саузерн-гибридизация препаратов геномной ДНК трансформантов *P. pastoris*. Обозначения дорожек – pVR2(BamHI/XhoI) – 2000 п.н. фрагмент плазмиды pVR2, включающий промотор AOX1 и ген *DAOcbd*, GS115 – препарат геномной ДНК штамма GS115, далее – номера клонов, отобранных на чашках с различной концентрацией зеоцина: 1–4 – 100 мкг/мл, 1–4-500 – 500 мкг/мл, 1–5-1000 – 1000 мкг/мл, 1–5-2000 – 2000 мкг/мл.

**Таблица 1.** Копийность интегративных трансформантов *P. pastoris* GS115/pVR2

№ клона	Число копий вставки pVR2	№ клона	Число копий вставки pVR2
GS115	0	2-1000	23
1	2	3-1000	3
2	3	4-1000	31
4	3	5-1000	28
1-500	5	1-2000	25
2-500	10	2-2000	6
3-500	9	3-2000	24
4-500	15	4-2000	21
1-1000	20	5-2000	11

белков, полученные на различных стадиях очистки DAOcbd, проводили с помощью электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [20]. Окраску гелей осуществляли с помощью красителя PageBlue (“MBI Fermentas”, Литва).

Количественное определение белка DAOcbd, продуцируемое различными клонами трансформантов *P. pastoris*, определяли также с помощью Вестерн-блоттинга [13]. Перенесенные на мембрану Immobilon P белки инкубировали с мышиными моноклональными антителами против хитин-связывающего домена хитиназы A1 (New England Biolabs, США), за-

тем инкубировали со вторичными антителами кролика против иммуноглобулинов мыши, меченными пероксидазой хрена (“Promega L”, США). Связавшиеся с антителами белки визуализировали с помощью набора ECL и проводили оценку интенсивности сигналов с помощью прибора Typhoon™ 9400 (GE Healthcare, США).

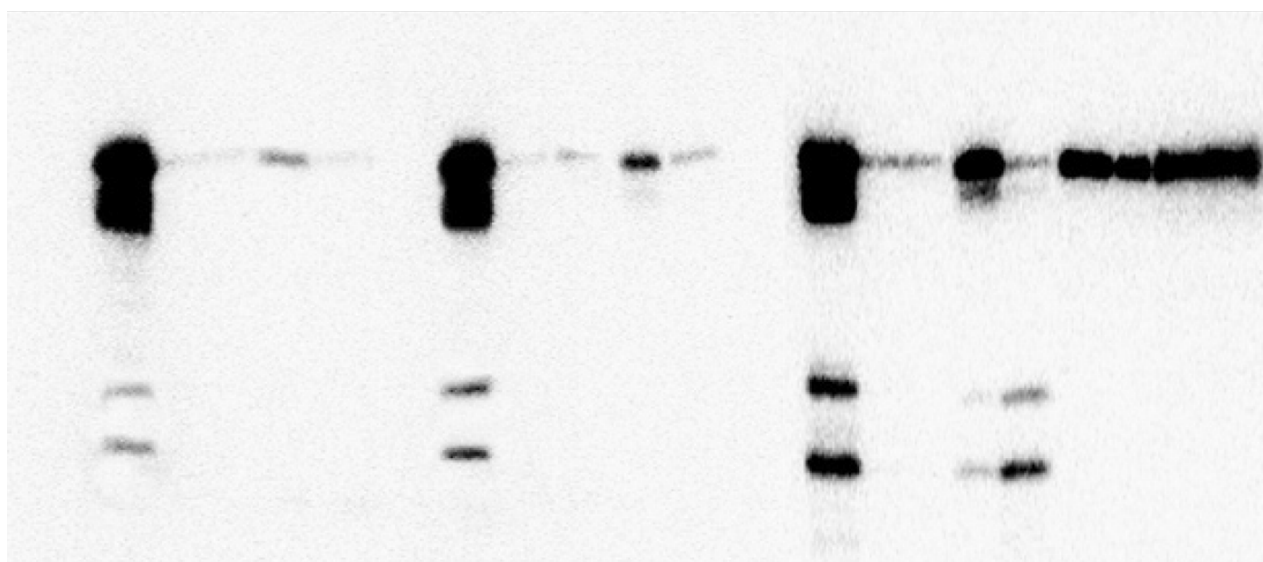
В качестве стандарта использовали разведения аффинно-выделенного белка DAOcbd.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Селекция трансформантов *P. pastoris*.** Плазмида pVR2 (рис. 1) содержит ген гибридного белка DAOcbd под контролем промотора AOX1 *P. pastoris*, терминатора TEF1 *A. gossypii*, а также “кассету экспрессии” гена *Sh-Ble*, обеспечивающего устойчивость к зеоцину рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, трансформированных pVR2. Линеаризованная по расположенному в промоторе AOX1 уникальному сайту PmeI плазмида pVR2 должна интегрироваться в AOX1 locus с образованием моно- и мультикопийных tandemных интегрантов. Мультикопийные интегранты при этом могут быть отобраны путем селекции на чашках, содержащих повышенную концентрацию зеоцина.

Отобранные из коллекции трансформантов штамма *P. pastoris* GS115 плазмидой pVR2 mut+ клоны, устойчивые к различным концентрациям зеоцина, анализировали на наличие нужной вставки методом ПЦР-скрининга. Отобранные клоны далее исследо-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



**Рис. 3.** Вестерн блот анализ динамики экспрессии гена *DAOcbd* в трансформантах *P. pastoris*/pVR2. Дорожки: 1, 7, 13 – штамм GS115 (отрицательный контроль), 2, 8, 14 – клон № 4; 3, 9, 15 – клон № 4-2000; 4, 10, 16 – клон № 3-2000; 5, 11, 17 – клон № 1-500; 6, 12, 18 – клон № 2-1000.

По времени индукции, дорожки 1–6 – 24 ч, 7–12 – 48 ч, 13–18 – 72 ч. Дорожки 19–22 – аффинно-очищенная DAOcbd, выделенная из штамма *E. coli* – продуцента, 3, 1, 2 и 4 мкг соответственно.

вали на способность к экспрессии функционально-активной DAOcbd в качественном тесте, основанном на детекции выделяемой в процессе оксидазной реакции перекиси водорода (см. “Методику”).

Отобранные “положительные” трансформанты подвергали дальнейшему анализу для исследования структуры локуса AOX1 и числа копий “кассеты экспрессии”.

**“Копийность” трансформантов *P. pastoris*.** Генномную ДНК полученных клонов гидролизовали по сайтам BamHI/XhoI и после разделения в геле и переноса на фильтр образцы гибридизовали с меченой пробой, соответствующей промотору гена AOX1, слитому с геном DAOcbd. Использование такой пробы позволяет оценить копийность вставки по интенсивности сигнала гибридизации от “векторного” фрагмента AOX1–DAOcbd по отношению к внутреннему контролю, которым в нашем случае является хромосомный ген AOX1.

Результаты гибридизации (рис. 2) позволили детектировать во всех образцах два характерных фрагмента разной интенсивности, что свидетельствует о тандемной организации вставки. Проведенная с помощью программы Image Quant оценка копийности вставки плазмиды pVR2 показала, что она колеблется в широких пределах – от 2–3 до 21–23 копий на геном (табл. 1).

**Динамика экспрессии DAOcbd.** Отобранные трансформанты выращивали в колбах в условиях индукции промотора AOX1, определяя при этом плотность культуры и активность оксидазы для выявления зависимости между числом копий интегрированной плазмиды pVR2, параметрами культивирования и уровнем продукции DAOcbd.

Электрофоретический анализ неочищенных белковых экстрактов полученных штаммов показал, что синтезируемая DAOcbd является мажорным белком растворимой фракции в экстрактах клонов с “низкой” и “средней” копийностью. Проведенный с помощью Вестерн-блоттинга (рис. 3) количественный анализ уровня продукции с DAOcbd в полученных трансформантах позволил установить (табл. 2), что “высококопийные” клоны отличались относительно низким уровнем оксидазной активности, а наибольшей продуктивностью обладали клоны с количеством копий pVR2 от 3 до 5 на геном.

Эти данные хорошо коррелировали с динамикой накопления активности DAOcbd в ходе культивирования (рис. 4). Удельная активность выделенных из полученных экстрактов на хитиновом сорбенте препаратов DAOcbd составила около 87 Е/мг, что соответствует известной из литературных данных удельной активности нативной ОДА *T. variabilis*.

Для выяснения возможных причин сниженной экспрессии в клонах с “высокой” копийностью мы оценили уровни мРНК DAOcbd в различных штаммах. Уровни мРНК гена DAOcbd у мультикопийных и низкокопийных трансфор-

**Таблица 2.** Уровень продукции DAOcbd (% от растворимого белка клетки) у трансформантов *P. pastoris* с различной “копийностью” вставки (по данным Вестерн-блот анализа\*)

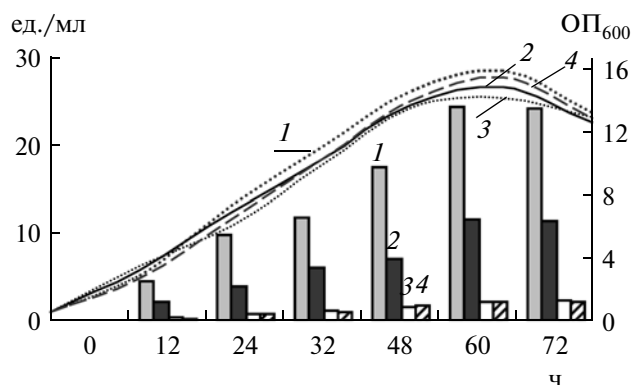
№ клона	DAOcbd, %	№ клона	DAOcbd, %
GS115 (1)	0	2-1000 (2)	0.60
4 (1)	4.55	3-2000 (2)	0.60
1-500 (1)	1.25	4-2000 (2)	0.55
2-1000 (1)	0.15	GS115 (3)	0
3-2000 (1)	0.25	4 (3)	12.40
4-2000 (1)	0.10	1-500 (3)	7.20
GS115 (2)	0	2-1000 (3)	1.20
4 (2)	6.70	3-2000 (3)	1.00
1-500 (2)	2.65	4-2000 (3)	1.15

\* (1), (2) и (3) – пробы, отобранные через 24, 48 и 72 ч инкубации.

мантов оказались одинаково высокими (рис. 5). Их сопоставление с уровнями мРНК конститутивного гена GAPDH показало, что увеличение копийности вставки в нашем случае приводит лишь к незначительному увеличению уровней мРНК гена DAOcbd.

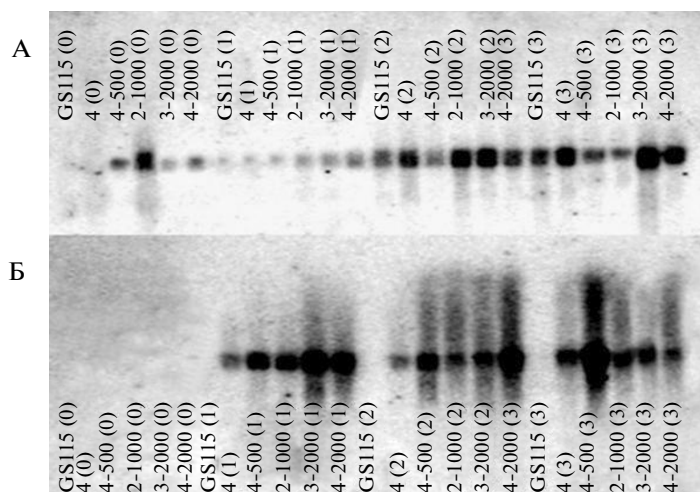
\*\*\*

В настоящей работе получены эффективные штаммы *P. pastoris* GS115, продуцирующие с высоким выходом функционально-активный гибридный белок оксидазы D-аминокислот *T. variabilis*,



**Рис. 4.** Динамика роста биомассы и активности ОДА в ходе культивирования трансформантов *P. pastoris*/pVR2 с различной “копийностью”. Гистограмма – активность фермента (ед./мл), график – накопление биомассы (ОП<sub>600</sub>): 1 – клон № 4; 2 – клон № 1-500; 3 – клон № 2-1000; 4 – клон № 4-2000.





**Рис. 5.** Нозерн-блот анализ динамики экспрессии гена *DAOcbd* в трансформантах *P. pastoris*/pVR2. Обозначения – GS115 – реципиентный штамм, № 4, № 4-500, № 2-1000, № 3-2000, № 4-2000 – клоны трансформантов, отобранных на чашках с разной концентрацией зеоцина. Пробы отбирали до начала индукции (0), и через 24 (1) 48 (2) и 72 ч (3) после начала индукции: а – гибридизация с зондом GPD, б – с зондом *DAOcbd*.

слитой с хитинсвязывающим доменом хитиназы A1 *B. circulans*. Выход *DAOcbd* при культивировании в колбах составил 45000 Е (или 500 мг) на литр культуры при уровне продукции целевого фермента порядка 10% от растворимого белка рекомбинантного штамма. Таким образом, по своей эффективности полученные штаммы заметно превосходят полученные другими авторами штаммы *P. pastoris*, продуцирующие варианты ОДА *T. variabilis* [9].

Возможные причины более эффективной экспрессии белка *DAOcbd* в полученных нами штаммах достаточно разнообразны и могут заключаться как в особенностях конструкции вектора экспрессии, так и в повышенной устойчивости белка *DAOcbd* к протеолитической деградации за счет стабилизирующего влияния N-концевого СВД-домена.

Нам не удалось обнаружить прямой зависимости между копийностью вставки и уровнем синтеза *DAOcbd* в полученных штаммах. Более того, в штаммах с высокой копийностью уровень синтеза *DAOcbd* был заметно ниже, чем в штаммах со средней копийностью. Известно, впрочем, что увеличение копийности вставки зачастую [21–23], но отнюдь не всегда [24], позволяет повысить уровень продукции целевых белков в рекомбинантных штаммах *P. pastoris*.

Тем не менее, уже полученные штаммы *P. pastoris* достаточно перспективны для отработки методов их культивирования в больших объемах и получения иммобилизованных препаратов гибридного фермента для непосредственного использования в технологических процессах получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Роснауки (Госконтракт 02.512.11.2211).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хороненкова С.В., Тушков В.И. // Успехи биол. химии. 2008. Т. 48. С. 359–376.
2. Riethorst W., Reichert A. // *Chimia*. 1999. V. 53. P. 600–607.
3. Serizawa N., Nakagawa K., Haneishi T., Kamimura S., Naito A. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1980. V. 33. P. 585–590.
4. Pilone M.S., Pollegioni L., Casalin P., Curti B., Ronchi S. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 180. P. 199–204.
5. Lin L., Chien H.R., Wang W., Hwang T., Fu H., Hsu W. // *Enzyme Microbial. Technol.* 2000. V. 27. P. 482–491.
6. Molla G., Vegezzi C., Pilone M.S., Pollegioni L. // *Protein Expr. Purif.* 1998. V. 14. P. 289–294.
7. Khang Y.H., Kim I.W., Hah Y.R., Hwangbo J.H., Kang K.K. // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 82. P. 480–488.
8. Isoai A., Kimura H., Reichert A., Schorgendorfer K., Nikaido K., Tohda H., Giga-Hama Y., Mutoh N., Kumagai H. // *Biotechnol. Bioeng.* 2002. V. 80. P. 22–32.
9. Zheng H., Wang X., Chen J., Zhu K., Zhao Y., Yang Y., Yang S., Jiang W. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 70. P. 683–689.
10. Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. // *Mol. Biotechnol.* 2000. V. 16. P. 23–52.
11. Houard S., Heinderyckx M., Bollen A. // *Biochimie*. 2002. V. 84. P. 1089–1093.
12. Редо В.А., Эльдаров М.А., Жгун А.А., Хатунцева С.А., Зейналов О.А., Скрябин К.Г. Патент РФ № 2310688. 2007.

13. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 999 p.
14. Lu G., Moriyama E.N. // Brief Bioinform. 2004. V. 5. P. 378–388.
15. EasySelect Pichia Expression Kit. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ $\alpha$  in *Pichia pastoris*. 1997–2001, Invitrogen Corp. 95 p.
16. Nagata Y., Shimojo T., Akino T. // J. Biochem. 1988. V. 20. P. 1235–1238.
17. Zor T., Selinger Z. // Anal. Biochem. 1996. V. 236. P. 302–308.
18. Scorer C.A., Clare J.J., McCombie W.R., Romanos M.A., Sreekrishna K. // Biotechnology. 1994. V. 12. P. 181–184.
19. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156–159.
20. Laemli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
21. McGrew J.T., Leiske D., Dell B., Klinke R., Krasts D., Wee S.F., Abbott N., Armitage R., Harrington K. // Gene. 1997. V. 187. P. 193–200.
22. Clare J.J., Romanos M.A., Rayment F.B., Rowedder J.E., Smith M.A., Payne M.M., Sreekrishna K., Henwood C.A. // Gene. 1991. V. 105. P. 205–212.
23. Vassileva A., Chugh D.A., Swaminathan S., Khanna N. // Protein Expr. Purif. 2001. V. 21. P. 71–80.
24. Hohenblum H., Gasser B., Maurer M., Borth N., Mattanovich D. // Biotechnol. Bioeng. 2004. V. 85. P. 367–375.

## Expression of Modified Oxidase of D-aminoacids of *Trigonopsis variabilis* in Methylophilic Yeasts *Pichia pastoris*

V. A. Redo, E. K. Novikova, and M. A. Eldarov

Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

e-mail: eldarov@biengi.ac.ru

Received November 13, 2009

**Abstract**—Effective recombinant strains *Pichia pastoris* that produce functionally active hybrid of *Trigonopsis variabilis* D-aminoacids bond with chitin-connecting domain of chitinase A1 of *Bacillus circulans* (DAOcbd) were obtained. The dependence of DAOcbd production levels from production of the number of copies of “expression cassette” integrated in the AOX1 locus of recombinant strains was studied. It was indicated that synthesized DAOcbd may be easily purified and immobilized on chitin sorbents and possessed high specific activity. Produced strains and methods of their cultivation and DAOcbd extraction may be used for development of technologies of obtaining of biocatalyzers in technological processes of obtaining of 7-aminocephalosporane acid.

УДК 582.288.45:576.8.097.29

## БИОСИНТЕЗ 4,15-ДИАЦЕТИЛНИВАЛЕНОЛА

### *Fusarium sambucinum* var. *minus*

© 2011 г. Г. Д. Соколова\*, В. Н. Вознесенский\*\*

\*Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии Россельхозакадемии,  
Московская обл., Большие Вяземы 143050  
e-mail: makeev@vniif.rosmail.com

\*\*Институт химической физики РАН, Москва, 119991

Поступила в редакцию 19.10.2009 г.

Изолят *Fusarium sambucinum* Fuckel var. *minus* продуцировал нетипичный для вида *Fusarium sambucinum* Fuckel трихотеценовый метаболит — 4,15-диацетилниваленол (9 мг/л) в условиях глубинного культивирования на среде Миро. Вещество идентифицировано с использованием методов ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии. Из других трихотеценов обнаружены 4-ацетилниваленол (3 мг/мл) и ниваленол (1 мг/л). Предполагается, что такая особенность изученного изолята связана с наличием дополнительного гена, кодирующего цитохром P450-оксигеназы, которые катализируют введение кето-группы в положение С-8 и гидроксильной группы в положение С-7 трихотеценовой структуры.

*Fusarium sambucinum* Fuckel — распространенный почвенный сапрофит, являющийся для ряда растений фитопатогеном, нередко обнаруживается в составе фузариозных фитопатогенных комплексов, сопряженных с гнилью проростков и фузариозом колоса зерновых культур [1, 2]. Он известен, как один из основных возбудителей сухой гнили клубней картофеля. В инфицированной *F. sambucinum* сельскохозяйственной продукции могут накапливаться опасные для здоровья потребителей микотоксины.

В литературе отмечена способность изолятов *F. sambucinum* продуцировать трихотеценовые микотоксины типа А, в большинстве случаев неоксигенированный в С-7- и С-8-положениях 4,15-диацетоксисцирпенол (4,15-диацетокси-3 $\alpha$ -гидрокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен; ДАС) [3], иногда Т-2-токсин, неосоланиол и др. (рис. 1), содержащие в положении С-8 замещенную или незамещенную гидроксигруппу [4]. Случаи обнаружения среди метаболитов *F. sambucinum* трихотеценов типа В (8-кетотрихотеценов) весьма редки [5, 6] (рис. 1).

При отборе лабораторной коллекции изолятов *F. sambucinum* на способность продуцировать трихотеценовые микотоксины нами был обнаружен изолят *F. sambucinum* var. *minus*, в культуре которого по предварительным данным присутствовали трихотецены типа В.

Цель работы — идентификация метаболитов, продуцируемых изолятом *F. sambucinum* var. *minus*.

### МЕТОДИКА

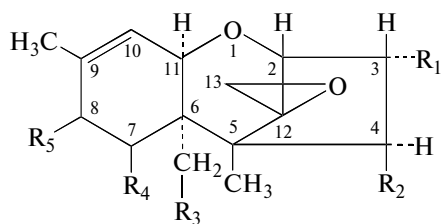
Изолят гриба был выделен Л.Л. Дорофеевой из листьев яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на

опытном поле ВНИИ фитопатологии (Раменка, Московской обл.) и идентифицирован как *Fusarium sambucinum* Fuckel 1869 var. *minus* [7]. Гриб хранили в лабораторной коллекции при 4°C в пробирках на косяках с агаром Чапека с добавкой (1% по массе) кукурузного экстракта и поддерживали путем ежегодного пересева.

Для опытов культуру гриба пересевали в пробирки на косяки с агаризованной средой Чапека и выращивали 7–10 сут в термостате при 26°C. Смывом с пробирок засеивали в качалочные колбы (750 мл), содержащие 100 мл жидкой питательной среды состава (г/л): сахароза — 20, пептон — 3, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> — 0,5, MgSO<sub>4</sub> — 0,2, и перемешивали на ротационной качалке при 220 об/мин в течение 1сут при 26°C.

Полученную культуру использовали в качестве посевной для инокуляции среды (колбы 750 мл) с питательной средой Миро (100 мл) состава (г/л): сахароза — 40, глицерин — 10, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> — 1, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> — 3, MgSO<sub>4</sub> — 2, NaCl — 5. Изолят гриба культивировали при перемешивании на качалке при 220 об/мин в течение 7 сут при 26°C в темноте. По окончании инкубации биомассу гриба отфильтровывали и взвешивали после сушки до постоянного веса в термостате при 90°C.

Культуральный фильтрат (рН 2.5) из 4 качалочных колб объединяли и экстрагировали метаболиты гриба этилацетатом. Экстракт сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, этилацетат отгоняли в вакууме роторного испарителя при температуре бани не выше 65°C, остаток растворяли в 10 мл смеси ацетонитрил–вода (84 : 16) и с целью очистки пропускали через колонку с 0,2 г активированного угля ОУ-А, 0,2 г целита 545 (80–100 меш) и 1,2 г нейтрального Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Колонку промывали 10 мл той же смеси. Объединенный элюат



Вещество	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Тип А					
ДАС	ОН	ОС(О)СН <sub>3</sub>	ОС(О)СН <sub>3</sub>	Н	Н
Неосоланиол	ОН	ОС(О)СН <sub>3</sub>	ОС(О)СН <sub>3</sub>	Н	ОН
Т-2-токсин	ОН	ОС(О)СН <sub>3</sub>	ОС(О)СН <sub>3</sub>	Н	ОС(О)СН <sub>2</sub> СН(СН <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Тип В					
НИВ	ОН	ОН	ОН	ОН	=О
4-АсНИВ	ОН	ОС(О)СН <sub>3</sub>	ОН	ОН	=О
4,15-диАсНИВ	ОН	ОС(О)СН <sub>3</sub>	ОС(О)СН <sub>3</sub>	ОН	=О
ДОН	ОН	Н	ОН	ОН	=О
15-АсДОН	ОН	Н	ОС(О)СН <sub>3</sub>	ОН	=О

Рис. 1. Структура трихотеценовых микотоксинов.

фильтровали через бумажный фильтр и отгоняли растворитель досуха.

Остаток растворяли в 0.5 мл метанола, и полученный раствор использовали для анализа на трихотеценовые микотоксины с применением методов ТСХ, ГЖХ и ВЭЖХ. В качестве стандартов использовали образцы 4-дезоксиниваленола (ДОН), 15-ацетилдезоксиниваленола (15-АсДОН), ниваленола (НИВ), 4-ацетилниваленола (4-АсНИВ, фузаренон-Х) и ДАС фирмы “Sigma” (США).

ТСХ проводили на пластинках Silufol (“Kavalier”, Чехия) без флуоресцирующей добавки. Вещества проявляли путем опрыскивания хроматограмм 10%-ным раствором AlCl<sub>3</sub> в этаноле с последующим прогреванием при 95°C в течение 8 мин в термостате, или обработкой 10%-ным раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в этаноле с 2-минутным нагреванием при 95°C. Хроматограммы просматривали в УФ-свете (254 и 365 нм).

Для ГЖХ использовали хроматограф Tracor 570 (США) с набивной колонкой (3% SE-30 на Gas-Chrom W-HP, 0.125–0.150 мм) и детектором акцептора электронов. Температуру колонки программировали: 170°C – 1 мин, далее повышали температуру со скоростью 10°C/мин до 220°C, при которой выдерживали 1 мин, затем повышали температуру со скоростью 20°C/мин до 260°C и выдерживали 2 мин. Анализируемый образец перед введением в хроматограф трансформировали гептафторбутирилимидазолом [8].

ВЭЖХ проводили на хроматографе системы Waters 1525 Breeze (США) с детектором Waters 2487, колонкой Waters Symmetry C18 (5 мкм; 4.6 × 150 мм) при 25°C. Подвижная фаза – ацетонитрил–вода (1 : 2.2 по

объему), скорость потока – 0.5 мл/мин, объем инъекционной иглы 5 мкл. Детектирование проводили при 224 нм.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Трихотецены типа А, в отличие от трихотеценов типа В, не образуют комплексов с AlCl<sub>3</sub> и поэтому не проявляются на тонкослойных хроматограммах при обработке спиртовым раствором AlCl<sub>3</sub>. Они обычно обнаруживаются опрыскиванием хроматограмм раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. При ТСХ исследуемого раствора в смеси: этилацетат–гексан–метанол (6 : 4 : 1) обработка хроматограмм H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> не выявила наличия трихотеценов типа А. При проявлении AlCl<sub>3</sub> в УФ-свете (365 нм) обнаружены 3 голубых пятна. По хроматографической подвижности (R<sub>f</sub>) в сравнении со стандартами одно пятно совпадало с НИВ (R<sub>f</sub> 0.15), другое – с 4-АсНИВ (R<sub>f</sub> 0.40), а третье, наиболее интенсивное, было примерно на уровне 15-АсДОН (R<sub>f</sub> 0.55). ТСХ в смеси: этилацетат–гексан (3 : 1) позволила более четко установить неидентичность этого пятна (R<sub>f</sub> 0.6) со стандартом 15-АсДОН (R<sub>f</sub> 0.5).

Используя препаративный вариант ТСХ, вещества были выделены в хроматографически чистом виде. Анализ методами ГЖХ и ВЭЖХ показал совпадение двух веществ со стандартными образцами НИВ и 4-АсНИВ, что подтвердило результаты ТСХ. Поведение третьего вещества отличалось от использованного набора стандартов. Предположительно, это могло быть одно из диацетильных производных ДОН или НИВ.

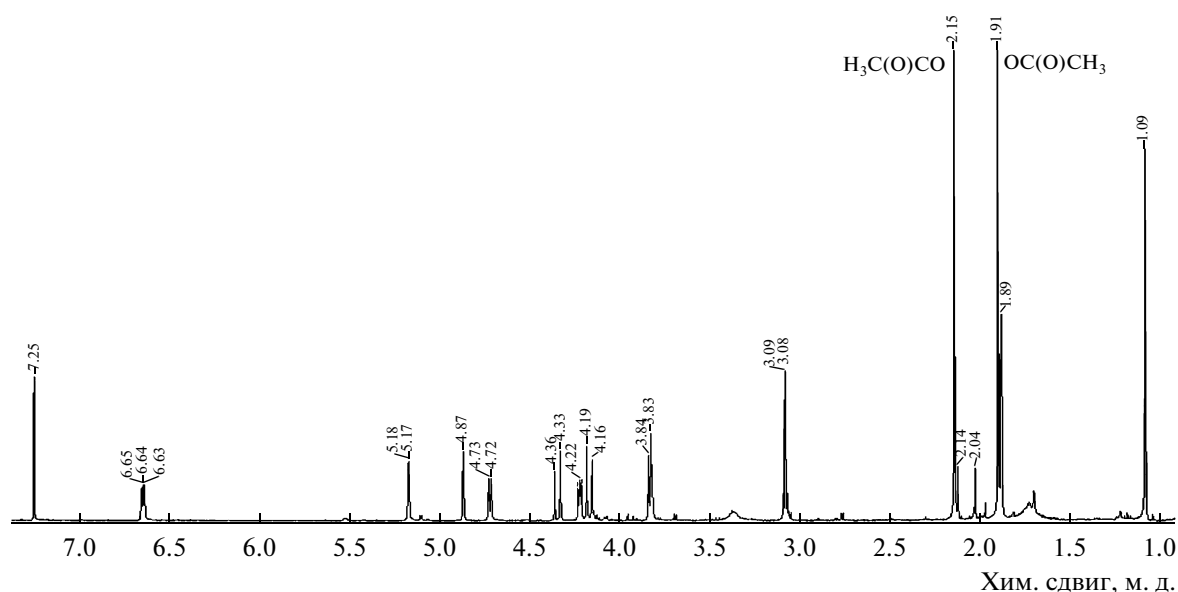


Рис. 2.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр 4,15-диацетилниваленола. Цифрами у пиков указаны значения химических сдвигов.

Для получения дополнительной информации вещество гидролизовали в 0.05 н. растворе КОН в смеси метанол–вода (9 : 1) при комнатной температуре в течение 15 мин. Продукты гидролиза подвергали ТСХ в смеси хлороформ–метанол (5 : 1) и в смеси гексан–изопропанол–вода (10 : 10 : 1). Анализ хроматограмм показал, что продуктом гидролиза является НИВ. ГЖХ- и ВЭЖХ-анализ подтвердил наличие НИВ. Остался открытым вопрос о количестве ацетильных групп и месте их расположения в исходной молекуле.

Повторная ферментация позволила выделить и очистить с помощью ТСХ 13 мг твердого белого вещества, кристаллизующегося из метанола в виде длинных игл. Протонный ЯМР-спектр вещества в растворе  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (м.д. относительно тетраметилсилана): 1.09 (3H,  $\text{CH}_3$ -14), 1.89 (3H,  $\text{CH}_3$ -16), 1.91 (3H,  $\text{CH}_3$ -15 Ac), 2.16 (3H,  $\text{CH}_3$ -4 Ac), 3.08 (2H, H-13), 3.4 (1H, 3-OH), 3.83 (1H, 7-OH), 3.84 (1H, H-2,  $J = 4.9$  Гц), 4.18 и 4.36 (2H, H-15,  $J = 12.2$  Гц), 4.23 (1H, H-3,  $J = 4.9$  Гц,  $J = 3.1$  Гц), 4.73 (1H, H-11,  $J = 5.8$  Гц), 4.88 (1H, H-7), 5.18 (1H, H-4,  $J = 3.1$  Гц), 6.65 (1H, H-10,  $J = 5.8$  Гц) подтвердил предположение о наличии двух ацетильных групп в молекуле (рис. 2). При этом сигнал водорода при С-4 (H-4) более сдвинут в область слабого поля, чем сигнал H-3, что свидетельствовало о наличии ацетильной группы в положении при С-4 и ее отсутствие при С-3. Кроме того, полученный спектр оказался идентичен спектру 4,15-диацетильного производного ниваленола (**4,15-диАсНИВ**), приведенному в работе [9].

Таким образом было показано, что исследуемый изолят *F. sambucinum* var. *minus* продуцировал 4,15-диАсНИВ в качестве основного трихотеценового метаболита (9 мг/л или 2 мг/г сухой биомассы гри-

ба), с примесью 4-АсНИВ (3 мг/л) и НИВ (1 мг/л) в условиях глубинного культивирования на среде Миро.

По своей структуре 4,15-диАсНИВ отличается от ДАС – типичного метаболита *F. sambucinum* наличием кето-группы в положении С-8 и гидроксильной группы в положении С-7 (рис. 1). Оксигенирование указанных положений требует наличия специфических цитохром Р450-оксигеназ [10]. Можно предположить, что продуцент 4,15-диАсНИВ содержит дополнительный ген, кодирующий необходимые оксигеназы. Вероятно, этот ген будет иметь более высокую гомологию с геном *LH1* (*FgTri1*), выделенным из изолята *F. graminearum* – продуцента 15-АсДОН [10], чем с геном *FsTri1*, выделенным из изолята *F. sporotrichioides* – продуцента Т-2-токсина [11].

Следует отметить, что обнаруженный нами изолят *F. sambucinum* var. *minus* – один из немногих, описанных в литературе [9] изолятов грибов рода *Fusarium*, образующих 4,15-диАсНИВ в качестве доминанты, хотя в качестве минорного метаболита это вещество, вероятно, может присутствовать среди метаболитов ряда грибов-продуцентов НИВ [12].

Острая летальная токсичность для мышей ( $\text{LD}_{50}$  внутрибрюшинно) 4,15-диАсНИВ (от 1.21 до 9.6 мг/кг) и НИВ (7.4 мг/кг) выше, чем ДОН (70 мг/кг). Несмотря на то, что 4,15-диАсНИВ в урожае зерновых культур обнаруживают реже, чем ДОН или НИВ [13], необходимо оценивать вероятность присутствия этого метаболита в зерне.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иващенко В.Г., Шупилова Н.П., Кирицели И.Ю. // Микология и фитопатология. 1997. Т. 31. № 2. С. 64–69.
2. Иващенко В.Г., Шупилова Н.П., Нефедова Л.И., Гагкаева Т.Ю., Назаровская Л.А., Хлопунова Л.Б. // Микология и фитопатология. 1997. Т. 31. № 2. С. 58–63.
3. Desjardins A.E., Plattner R.D. // J. Agric. Food Chem. 1989. V. 37. № 2. P. 388–392.
4. Altomare C., Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A., Evidente A. // Mycopathologia. 1995. V. 129. № 3. P. 177–181.
5. El-Banna A.A., Scott P.M., Lau P.-Y., Sakuma T., Platt H.W., Campbell V. // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 47. № 5. P. 1169–1171.
6. Bosch U., Mirocha C.J., Abbas H.K., Menna M. // Mycopathologia. 1989. V. 108. № 2. P. 73–79.
7. Билай В.И. Фузариин. Киев: Наукова Думка, 1977. С. 190.
8. Scott P.M., Lau P.-Y., Kanhere S.S. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981. V. 64. № 6. P. 1364–1371.
9. Lauren D.R., Ashley A., Blackwell B.A., Greenhalgh R., Miller J.D., Neish G.A. // J. Agric. Food Chem. 1987. V. 35. № 6. P. 884–889.
10. McCormick S.P., Harris L.J., Alexander N.J., Ouellet T., Saparno A., Allard S., Desjardins A.E. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 4. P. 2044–2051.
11. Meek I.B., Peplow A.W., Ake C.Jr., Phillips T.D., Beremand M.N. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 7. P. 1607–1613.
12. Moss M.O., Thrane U. // Toxicol. Lett. 2004. V. 153. P. 23–28.
13. Kim J.-C., Kang H.-J., Lee D.-H., Lee Y.-W., Yoshizawa T. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 11. P. 3798–3802.

## Production of 4,15-Diacetylnivalenol by *Fusarium Sambucinum* Fuckel var. *minus*

G. D. Sokolova<sup>a</sup> and V. N. Voznesenskii<sup>b</sup>

<sup>a</sup> All-Russia Research Institute of Phytopathology, Russian Academy of Agricultural Sciences,  
Moscow region, Bolshie Vyazemy, 143050 Russia  
e-mail: makeev@vniif.rosmail.com

<sup>b</sup> Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

Received October 19, 2009

**Abstract**—*Fusarium sambucinum* Fuckel var. *minus* isolate produced unusual for *F. sambucinum* Fuckel trichothecene metabolite 4,15-diacetylnivalenol (9 mg/l) in conditions of deep cultivation on Myro medium. This compound was identified by TLC, GLC, HPLC, and <sup>1</sup>NMR spectroscopy. Other trichothecenes, 4-acetylnivalenol (3 mg/l) and nivalenol (1 mg/l), were also found in the culture. The observed feature of the studied isolate is assumed to be due to the presence of an additional gene, which encodes cytochrome P450 oxygenase responsible for the introduction of keto group at C8 and hydroxyl group at C7 of the trichothecene structure.

УДК 547.92;579.222

## ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ СТЕРОИДОВ МИЦЕЛИЕМ *Curvularia lunata* В ПРИСУТСТВИИ МЕТИЛ- $\beta$ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА

© 2011 г. В. А. Андрюшина, А. В. Дружинина, В. В. Ядерец, Т. С. Стыщенко, Н. Е. Войшвилло

Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: verayaderetz@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.09.2009 г.

С помощью мицелия *Curvularia lunata*, суспендированного в фосфатном буфере с метил- $\beta$ -циклодекстрином (МЦД), трансформировано 16  $\Delta^5$ - $\beta$ -гидрокси- и  $\Delta^4$ -3-кетостероидов ряда андростана и прегна-на. Выделено 20 моногидрокси- и дигидроксипродуктов, структура которых установлена с помощью спектров протонно-магнитного резонанса и масс-спектров. Гидроксилирование  $\Delta^5$ - $\beta$ -гидроксистероидов осуществлялось преимущественно в положение  $7\alpha$ , тогда как гидроксилирование  $\Delta^4$ -3-кетостероидов – в положение  $11\beta$ . Исключение составили андрост-4-ен-3,17-дион,  $9\alpha$ -гидроксиандростендион и андроста-1,4-диен-3,17-дион, гидроксилирование которых происходило в основном в положение  $14\alpha$ . При трансформации прогестерона и гидроксиметилпрегнадиенона, помимо основных  $11\beta$ -производных, выделены  $6\beta$ - и  $7\beta$ -гидроксипроизводные с выходом 10 и 30% соответственно. МЦД использовали в отношении к трансформируемому стероиду 1 : 1 (моль/моль). При максимальной концентрации кортексолона 20 г/л и ацетата андростенолона 10 г/л в присутствии МЦД получены соответственно гидрокортизон и  $7\alpha$ -гидроксиандростенолон с выходом 55 и 77%. В отсутствие МЦД наблюдались адсорбция стероидов на мицелии, более низкая скорость их трансформации, невысокие концентрации модифицируемых субстратов и низкий выход соответствующих гидроксипроизводных.

В промышленном синтезе лекарственных препаратов стероидной природы необходимыми этапами являются модификации стероидной молекулы с помощью микроорганизмов (гидроксилирование, 1,2-дегидрирование, расщепление боковой цепи стероидов и др.) [1–4]. Их преимущество перед химическими реакциями заключается в высокой регио- и стереоспецифичности и экологичности. Однако при проведении указанных биотрансформаций, вследствие ничтожной растворимости стероидов в водной среде (несколько мг/л), существует проблема повышения доступности стероидных субстратов к микробной клетке и увеличения их содержания в реакционной среде [1–3].

Способ диспергирования стероидов в культуральной жидкости с помощью смешивающихся с водой органических растворителей лишь частично решает проблему и только при трансформации так называемых “гидрофильных” стероидов. По сравнению с ним способ применения стероидов в виде

водной суспензии с размером частиц не более 10 мкм дает возможность увеличить содержание стероидных субстратов до 50 г/л [1, 2]. Но этот способ не пригоден для процессов, в которых стероидный субстрат или продукт его трансформации токсичны для микроорганизма. Например, андростадиендион (АДД), образуемый при отщеплении боковой цепи стероидов, токсичен для бактерий в концентрации выше 0.8 г/л [5].

Высоких концентраций стероидных субстратов удается достичь, используя способ, предложенный в 1981 г. учеными фирмы Геден Рихтер (“Gedeon Richter”, Венгрия), а именно, трансформации стероидов, солюбилизованных в водных средах с помощью макроциклических  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -циклодекстринов [6, 7]. Указанные циклодекстрины, главным образом  $\beta$ -циклодекстрин (ЦД), образуют со стероидами растворимые в воде комплексы, что позволяет увеличить содержание стероидов в трансформационной среде до 10 г/л [8]. Наличие ЦД в реакциях гидроксилирования, 1,2-дегидрирования, восстановления 17-кетогруппы стероидов и окисления  $\Delta^5$ - $\beta$ -гидроксистероидов в  $\Delta^4$ -3-кетостероиды, катализируемых свободными или иммобилизованными клетками бактерий и грибов, в 2 раза сокращало время трансформации, способствовало повышению выхода продуктов реакции и в некоторых случаях изменяло их соотношение [9–15].

При замене ЦД его химически модифицированными производными – метил-ЦД (МЦД), гидрокс-

**Сокращения:** АД – андростендион, АДД – андростадиендион, ДЭА – дегидроэпиандростерон (андростенолон), АДЭА – ацетат ДЭА, ДГА –  $3\beta,17\beta$ -дигидроксиандрост-5-ен, ТГА –  $3\beta,7\alpha,17\beta$ -тригидроксиандрост-5-ен,  $\Delta^5$ -ПГ – прегненолон,  $\Delta^4$ -ПГ – прогестерон, 17-ОН- $\Delta^4$ -ПГ –  $17\beta$ -гидроксипрогестерон, 16,17-эпокси- $\Delta^4$ -ПГ –  $16\alpha,17\alpha$ -эпоксипрогестерон, в-во “S” – кортексолон (вещество “S” Рейхштейна), в-во “F” – гидрокортизон (вещество “F” Кендалла), MAR и TAR – моно- и триацетат вещества “R” Рейхштейна, ГМЦД – 21-гидрокси-20-метилпрегна-1,4-диен-3-он, ЦД –  $\beta$ -циклодекстрин, МЦД – метил- $\beta$ -циклодекстрин, ГПЦД – гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин.

сипропил-ЦД (ГПЦД) и др. – содержание стероидов в водной среде составило не менее 20 г/л. При такой нагрузке с помощью актинобактерий осуществлены 1,2-дегидрирование гидрокортизона и андростендиона, а также отщепление боковой цепи стероидов [16–18]. Данные гидроксилирования стероидов грибами в присутствии химически модифицированных циклодекстринов в литературе отсутствуют [1–4, 6, 19].

Цель работы – гидроксилирование с помощью штаммов гриба *Curvularia lunata*  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидрокси- и  $\Delta^4$ -3-кетостероидов ряда андростана и прегнана в виде комплексов с метил- $\beta$ -циклодекстрином.

### МЕТОДИКА

Трансформации  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов выполняли с помощью гриба *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 [20], трансформации  $\Delta^4$ -3-кетостероидов – с помощью *Curvularia lunata* ВКПМ F-988 [21]. Для солиubilизации трансформируемых стероидов использовали  $\beta$ -циклодекстрин (ЦД), метилированный по случайным положениям  $\beta$ -циклодекстрин (МЦД) и гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин – (ГПЦД), Китай. Отношение циклодекстринов к трансформируемому стероиду составляло 1 : 1 (моль/моль).

Культивирование и трансформацию стероидов проводили в конических колбах объемом 750 мл, при 28°C, на качалке – 220 об/мин; культивирование – в 100 мл питательной среды, трансформацию – в 75 мл 1/15 М фосфатного буфера. Штамм F-981 выращивали на среде (г/л): сахароза – 30.0, дрожжевой автолизат – 2.5, NaNO<sub>3</sub> – 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 3.0, KCl – 0.55, MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O – 0.5, pH 6.0–6.3 (среда I). Штамм F-988 выращивали на среде (г/л): глюкоза – 20.0, пептон – 5.0, дрожжевой экстракт – 5.0, соевая мука – 10.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 4.0, pH 6.0–6.3 (среда II).

Среды засеивали суспензией спор грибов, выращенных в течение 7–10 сут на скошенном агаре, приготовленном на основе среды для штамма F-981. Культивирование 1 генерации осуществляли 3 сут и использовали в качестве посевного материала, который вносили в свежую среду (I или II). Через 32–34 ч роста мицелий отделяли от среды и суспендировали в буферном растворе в количестве 9.5–19.0 г/л (в пересчете на вес сухой биомассы), в который предварительно вносили циклодекстрин и микрокристаллический стероид. Полученную суспензию распределяли в несколько колб. Через определенные интервалы инкубации отбирали пробы в количестве не менее 5 мл, которые экстрагировали этилацетатом.

**Анализ продуктов трансформации.** Качественный анализ продуктов трансформации проводили с помощью ТСХ, для чего использовали пластинки Silufol UV 254 (“Kavalier”, Чехословакия) и Sorbfil (“Imid Ltd”, Россия). Разделение стероидных со-

единений проводили в системе растворителей ацетон–хлороформ (7 : 3). После разделения продуктов трансформации  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов хроматограммы проявляли 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном растворе водной хлорной кислоты; визуальную оценку продуктов трансформации  $\Delta^4$ -3-кетостероидов проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Для определения содержания исходных  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов и продуктов их трансформации этилацетатный экстракт упаривали досуха, взвешивали и определяли процентное содержание стероидов в пробах с помощью спектра протонно-магнитного резонанса. Содержание в реакционной смеси  $\Delta^4$ -3-кетостероидных субстратов и продуктов их трансформации оценивали с помощью ВЭЖХ [20].

**Выделение продуктов гидроксилирования.** После окончания трансформации мицелий отделяли и проверяли его на наличие стероидных соединений. При их отсутствии экстрагировали этилацетатом только водную фракцию до полного извлечения стероидов. Экстракт упаривали. Если мицелий содержал продукты трансформации, его также экстрагировали этилацетатом. Экстракты объединяли и упаривали в вакууме. Полученный остаток промывали эфиром и отфильтровывали кристаллические продукты, выход (В) которых рассчитывали по формуле:  $V = 100 \times M_{\text{п}}/M_{\text{с}} \times (M_{\text{пр}}/M_{\text{сб}})$ , где M<sub>п</sub> – масса выделенного кристаллического продукта, M<sub>с</sub> – количество взятого в реакцию субстрата, M<sub>пр</sub> – молекулярная масса продукта, M<sub>сб</sub> – молекулярная масса субстрата.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Гидроксилирование  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов.** На схеме (рис. 1) видно, что все  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероиды (дегидроэпиандростерон (ДЭА), ацетат ДЭА (АДЭА), 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -дигидроксиандрост-5-ен (ДГА) и его 3 $\beta$ -ацетат, прегненолон ( $\Delta^5$ -ПГ), 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -эпокси-прегненолон (16,17-эпокси- $\Delta^5$ -ПГ), моноацетат и триацетат вещества “R” Рейхштейна (MAR и TAR) после трансформации с помощью мицелия *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 содержат 7 $\alpha$ -гидроксигруппу.

Хорошо известна способность различных штаммов *C. lunata* к 11 $\beta$ -гидроксилированию и к 14 $\alpha$ -гидроксилированию некоторых  $\Delta^4$ -3-кетостероидов [1–4, 22], но способность этого вида к селективному 7 $\alpha$ -гидроксилированию  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов показана нами впервые [20].

**Трансформация дегидроэпиандростерона (ДЭА).** При нагрузке ДЭА или АДЭА в количестве 2 г/л, внесенных в буферный раствор в виде мелкокристаллической суспензии, полная конверсия в 7 $\alpha$ -гидрокси-ДЭА происходила с помощью 10 г/л мицелия (в пересчете на вес сухой биомассы) за 24 и 20 ч соответственно (рис. 2); 7 $\alpha$ -гидроксилирова-



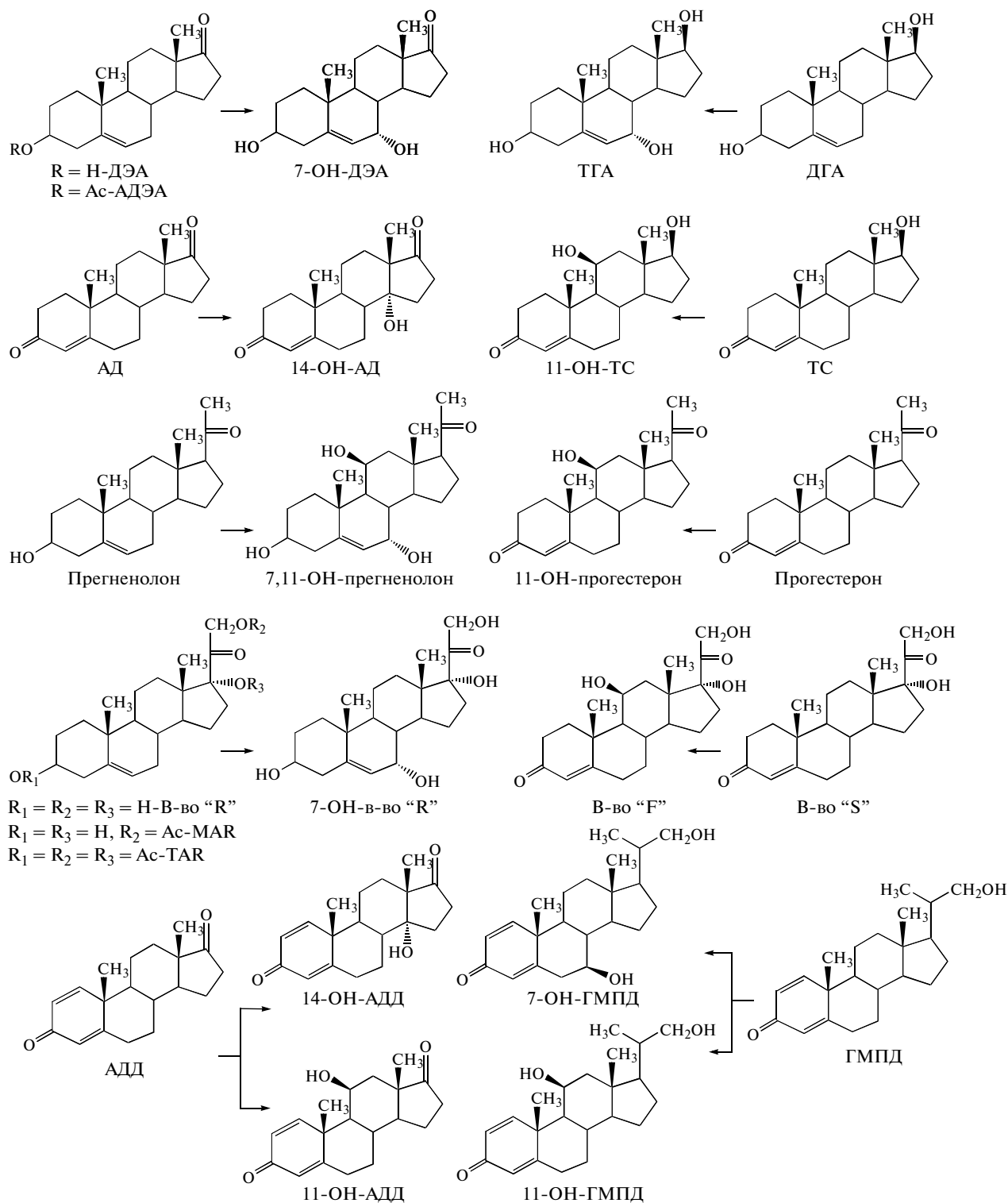
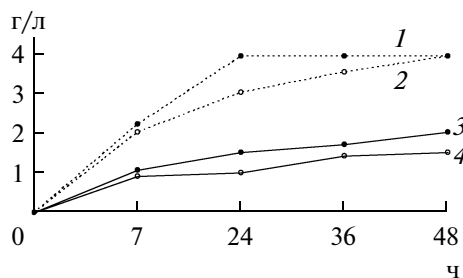


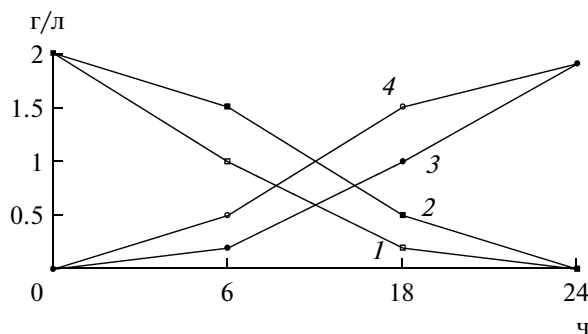
Рис. 1. Схема гидроксилирования стероидов штаммами *Curvularia lunata*.

ние протекало с образованием незначительного количества продукта восстановления 17-кетогруппы —  $3\beta,7\alpha,17\beta$ -тригидроксиандрост-5-ена (ТГА). ТГА представляет интерес в качестве перспективного

соединения для синтеза стероидных препаратов, но в данной реакции являлся побочным продуктом [23]. При увеличении содержания микрокристаллов АДЭА в реакционной смеси до 5 г/л наблюда-



**Рис. 2.** Скорость образования 7α-ОН-ДЭА в зависимости от количества мицелия и присутствия МЦД при содержании АДЭА 5 г/л: 1 – комплекс АДЭА с МЦД, биомасса 18.5 г/л, 2 – комплекс АДЭА с МЦД, биомасса 10 г/л, 3 – микрокристаллы АДЭА, биомасса 18.5 г/л, 4 – микрокристаллы АДЭА, биомасса 10 г/л.



**Рис. 3.** Трансформация 3β,17β-дигидроксиандрост-5-ена в количестве 2 г/л (биомасса 9.5 г/л): 1 – субстрат ДГА в комплексе с МЦД; 2 – микрокристаллы ДГА; 3 – продукт ТГА из микрокристаллического субстрата; 4 – продукт ТГА в присутствии МЦД.

лось ингибирование трансформации, и количество 7α-гидрокси-ДЭА не превысило 1 г/л. На его выход не повлияло увеличение массы биокатализатора до 18.5 г/л (рис. 2).

Существенное влияние на скорость конверсии АДЭА и выход 7α-гидрокси-ДЭА оказало присутствие в реакционной среде МЦД в сочетании с двойным количеством мицелия (рис. 2). Содержание 7α-гидрокси-ДЭА при трансформации 5 г/л АДЭА в виде комплекса с МЦД уже через 24 ч составило 85%.

Результаты гидроксилирования 10 г/л АДЭА в комплексе с ЦД, МЦД и ГПЦД при молярном отношении АДЭА-циклодекстрин 1 : 1, представлены в табл. 1. Трансформация продолжалась 44 ч. За этот период в присутствии МЦД достигнута максимальная степень конверсии АДЭА в 7α-гидрокси-ДЭА, который выделен с выходом 77%. Высокое содержание 7α-гидрокси-ДЭА в реакционной смеси (90%) наблюдалось также при использовании ГПЦД. Однако ГПЦД по сравнению с МЦД образовывал более прочный комплекс с 7α-гидрокси-ДЭА, что затруднило выделение продукта, и вследствие чего он был получен с меньшим выходом – 65% (табл. 1). В присутствии как МЦД, так и ГПЦД, наблюдалось минимальное образование побочного ТГА (в контроле без солюбилизатора – 15%, в опыте с МЦД – 3%). При солюбилизации АДЭА с помощью ЦД содержание 7α-гидрокси-ДЭА в реакционной массе не превышало 50%. Кроме того, ЦД образовывал с ним еще более прочный комплекс, чем ГПЦД, вследствие чего выход выделенного продукта составил лишь 20.5% (табл. 1).

*Трансформация 3β,17β-дигидроксиандрост-5-ена (ДГА).* Результаты трансформации ДГА и его ацетата в количестве 2–5 г/л аналогичны результатам гидроксилирования ДЭА и АДЭА. При трансформации ДГА в количестве 2 г/л (в виде микрокристаллов либо в виде комплекса с МЦД) полная конверсия в ТГА (содержание в реакционной смеси 70 и 75% соответственно) наблюдалась через 20–24 ч инкубации.

Скорость гидроксилирования в виде комплекса с МЦД лишь незначительно увеличивалась по сравнению с контролем (рис. 3). Трансформация 5 г/л ДГА в виде комплекса с МЦД заканчивалась за 30 ч, причем содержание ТГА в реакционной смеси составило 80% (табл. 2), тогда как конверсия 5 г/л ДГА в виде микрокристаллов даже через 48 ч была неполной и количество 7α-гидроксипродукта не превышало 20%.

*Трансформация прегненолона (Δ<sup>5</sup>-ПГ), 16α,17α-эпоксипрегнонолона (16,17-эпокси-Δ<sup>5</sup>-ПГ), моноацетата и триацетата в-ва “R” (MAR и TAR).* В указанные субстраты мицелий *S. lunata* вводил гидроксигруппу не только в 7α-положение, но и в 11β-положение, причем трансформация Δ<sup>5</sup>-ПГ происходила с образованием 7α,11β-дигидроксипродукта, а не моногидроксисоединений (табл. 2). В отличие от ДЭА и ДГА, а также их ацетатов, получить практически значимый выход гидроксипроизводных указанных Δ<sup>5</sup>-стероидов (за исключением 16,17-эпоксис-Δ<sup>5</sup>-ПГ), даже при низкой нагрузке 2 г/л оказалось возможным лишь в присутствии МЦД (табл. 2). В отсутствие солюбилизатора через 27 ч трансформации Δ<sup>5</sup>-ПГ и 23 ч трансформации MAR и TAR общий выход выделенных стероидов составил не более 10–25%, по-ви-

**Таблица 1.** Влияние циклодекстринов на трансформацию АДЭА при нагрузке 10 г/л

Полимер	Содержание стероидов в реакционной смеси, %			Выход 7α-ОН-ДЭА, %
	АДЭА	ТГА	7α-ОН-ДЭА	
ЦД	45	5	50	20.5
МЦД	5	3	92	77
ГПЦД	10	следы	90	65
Контроль*	70	15	15	9

\* Трансформация без полимера.

**Таблица 2.** Продукты гидроксирования стероидов ряда андростана (1–7) и прегнана (8–16) мицелием *Curvularia lunata*, образуемые в присутствии МЦД и в отсутствие солилизатора (контроль)

№	Стероидный субстрат	Содержание, г/л	Продукты трансформации	Содержание гидроксистероидов в реакционной смеси, %	
				МЦД	контроль*
С19-стероиды					
1	ТС	4.0	11 $\beta$ -гидрокси-ТС	75	35
2	АД	4.0	14 $\alpha$ -гидрокси-АД	70	25
			11 $\beta$ ,14 $\alpha$ -дигидрокси-АД	15	10
3	9-ОН-АД	2.0	9 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -дигидрокси-АД	55	50
4	АДД	3.0	14 $\alpha$ -гидрокси-АДД	70	5
5	ДГА	5.0	7 $\alpha$ -гидрокси-ДГА	80	20
6	ДЭА	4.0	7 $\alpha$ -гидрокси-ДЭА	85	10
7	АДЭА	10.0	7 $\alpha$ -гидрокси-ДЭА	95	15
С21-стероиды					
8	$\Delta^5$ -ПГ	2.0	7 $\alpha$ ,11 $\beta$ -дигидрокси- $\Delta^5$ -ПГ	70	10
9	$\Delta^4$ -ПГ	2.0	11 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ	40	10
			7 $\alpha$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ	35	15
			6 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ	10	–
10	17-ОН- $\Delta^4$ -ПГ	2.0	11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -дигидрокси- $\Delta^4$ -ПГ	85	70
11	16,17-эпокси- $\Delta^5$ -ПГ	2.0	7 $\alpha$ -гидрокси-16,17 $\alpha$ -эпокси- $\Delta^5$ -ПГ	80	75
12	16,17-эпокси- $\Delta^4$ -ПГ	1.0	11 $\beta$ ,14 $\alpha$ -дигидрокси-16,17 $\alpha$ -эпокси- $\Delta^4$ -ПГ	50	10
13	MAR	2.0	В-во "R"	30	–
			7 $\alpha$ -гидрокси-"R"	30	15
			11 $\beta$ -гидрокси-"R"	25	10
14	TAR	1.0	В-во "R"	60	–
			7 $\alpha$ -гидрокси-в-во "R"	20	10
			11 $\beta$ -гидрокси-в-во "R"	15	5
15	В-во "S"	10.0	В-во "F"	65	55
			14 $\alpha$ -гидрокси-в-во "S"	30	40
С22-стероиды					
16	ГМПД	4.0	11 $\beta$ -гидрокси-ГМПД	60	–
			7 $\beta$ -гидрокси-ГМПД	30	–
			7 $\beta$ ,11 $\beta$ -дигидрокси-ГМПД	–	15

димому, вследствие интенсивной деструкции как исходного субстрата, так и продуктов реакции.

**Гидроксирование  $\Delta^4$ -3-кетостероидов.** Условия трансформации  $\Delta^4$ -3-кетостероидов, которую осуществляли с помощью *Curvularia lunata* ВКПМ F-988, отличающегося от предыдущего штамма наличием маркера резистентности к антибиотику генетицину "G-418", были те же, что и в выше приведенных примерах, но мицелий для трансформации выращивали в среде, в которой минеральный источник азота был заменен на органический. Для оценки гидроксильной активности гриба в отношении солилизированных с помощью МЦД  $\Delta^4$ -3-кетостерои-

дов выбраны андростаны – тестостерон (ТС), андростендион (АД), 9 $\alpha$ -гидрокси-АД (9-ОН-АД), андростадиендион (АДД) и прегнаны – прогестерон ( $\Delta^4$ -ПГ), 17 $\alpha$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ (17-ОН- $\Delta^4$ -ПГ), 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -эпокси-прогестерон (16,17-эпокси- $\Delta^4$ -ПГ), кортексолон (в-во "S") и его ацетат, 21-гидрокси-20-метилпрегна-1,2-диен-3-он (ГМПД) (рис. 1). Выбор этих стероидов обусловлен тем, что ТС, АД,  $\Delta^4$ -ПГ, 16,17-эпокси- $\Delta^4$ -ПГ и ацетат в-ва S являются  $\Delta^4$ -3-кетоаналогами ДГА, ДЭА,  $\Delta^5$ -ПГ, 16,17-эпокси- $\Delta^5$ -ПГ и MAR соответственно. Кроме того, АД, а также 9-ОН-АД и АДД, представляли ин-

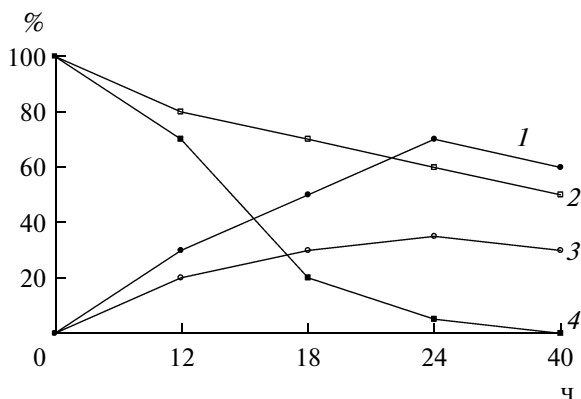


Рис. 4. Динамика трансформации (%) 4 г/л ТС (биомасса 12 г/л): 1 – 11β-ОН-ТС в присутствии МЦД; 2 – микрокристаллы ТС; 3 – 11β-ОН-ТС из микрокристаллического ТС, 4 – ТС в комплексе с МЦД.

терес еще как субстраты для гидроксилирования в 14α-положение в присутствии МЦД.

**Трансформация тестостерона (ТС).** Установлено, что *S. lunata* вводит гидроксигруппу в ТС также, как в стероиды ряда прегнана в 11β-положение. Динамика 11β-гидроксилирования ТС при нагрузке 4 г/л в виде комплекса с МЦД и в его отсутствие показана на рис. 4. В присутствии МЦД конверсия ТС в 11β-гидрокси-ТС протекала без накопления побочных продуктов и заканчивалась за 24 ч. За это время в реакционной жидкости образовалось до 75% 11β-гидрокси-ТС, тогда как без солюбилизатора накопилось только 35% продукта (табл. 2), после чего началась его деструкция.

**Трансформация андростенов АД, 9-ОН-АД, АДД.** Основными продуктами трансформации указанных 17-кетостероидов были 14α-гидроксипроизводные. В отсутствие МЦД 14α-гидрокси-АД (14-ОН-АД) получен с выходом 55–60% за 24–26 ч только при содержании АД не выше 2 г/л. В присутствии МЦД за такое же время была закончена полная конверсия 4 г/л АД в 14-ОН-АД, содержание которого в реакционной смеси составило 70%

(табл. 2). Выделено 62% 14-ОН-АД и в качестве побочного соединения 15% 11β,14α-дигидрокси-АД.

Поскольку дальнейшее повышение разовой дозы АД, даже в виде комплекса с МЦД, оказалось нежелательным вследствие увеличения количества побочных продуктов, были проведены 2 повторных цикла трансформации в водной фазе, полученной после отделения мицелия и экстракции продуктов трансформации. Оба цикла проводили с 4 г/л АД с использованием свежего мицелия (10–11 г/л), но без регенерации и добавления новой порции МЦД. При полной конверсии АД через 24 ч содержание 14-ОН-АД в водной фазе второго и третьего циклах трансформации составляло 60%. Таким образом, при использовании МЦД в количестве, рассчитанном на 4 г/л АД, в результате повторного применения этой же порции МЦД 12 г АД было конвертировано в 14-ОН-АД. Однако в 4 цикле гидроксилазная активность мицелия была низкой.

Трансформация 2 г/л 9-ОН-АД в 9α,14α-дигидрокси-АД и 1 г/л АДД в 14α-гидрокси-АДД проходила с высоким выходом при использовании как микрокристаллических, так солюбилизированных с МЦД субстратов, но в последнем случае в 2 раза быстрее. Однако гидроксилирование АДД при содержании 3 г/л в отсутствие МЦД сопровождалось восстановлением 17-кетогруппы и деструкцией продукта восстановления – 1,2-дегидро-ТС.

Преобладание 14α-гидроксилазной активности по отношению к Δ<sup>4</sup>-3,17-дикетоандростенам отличает *S. lunata* от других видов грибов. Например, мицелий *Gongronella butleri* проявлял 7α-гидроксилазную активность не только при трансформации ДЭА, но и АД, образуя в качестве основных продуктов 7α-гидрокси-АД (27%) и 14-ОН-АД (22%), а также 6β- и 7β-гидрокси-АД в качестве побочных соединений [24].

**Трансформация прегненов Δ<sup>4</sup>-ПГ, 17-ОН-Δ<sup>4</sup>-ПГ, ГМПД, в-ва "S" и 21-ацетата в-ва "S".** Основным процессом трансформации указанных соединений было 11β-гидроксилирование. За исключением 17-ОН-Δ<sup>4</sup>-ПГ, даже при минимальном содержании остальных стероидов 1–2 г/л получить максимальный выход 11β-гидроксипроизводных оказалось

Таблица 3. Трансформация кортексолона с помощью мицелия *S. lunata* ВКПМ F-988

Нагрузка кортексолона, г/л	Массовое отношение стероид/метилциклодекстрин	Время трансформации, ч	Общее содержание продуктов трансформации, %		Выход кристаллического гидрокортизона, %
			в водной фазе	в мицелии	
10.0	–	46	48.8	42.6	43.2
10.0	1/5	22	91.5	следы	58.0
15.0	1/5	24	96.0	следы	56.4
20.0	1/5	48	98.0	следы	55.0
20.0	1/3	50	76.6	10.5	52.0

возможным лишь в присутствии МЦД (табл. 2). Только из солюбилизованного ГМПД был получен 11 $\beta$ -гидрокси-ГМПД с выходом 50%.

На основании данных работы [25], гидроксипроизводные ГМПД могут представлять практический интерес. В указанной работе показано, что ГМПД и его 1,2-дигидроаналог являются лучшими индукторами 11 $\beta$ -гидроксилазы в мицелии *Cochliobolus lunatus* среди 24 исследованных стероидов.

В отличие от  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -гидроксистероидов, положение и ориентация вводимых в  $\Delta^4$ -3-кетостероиды побочных гидроксигрупп (6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -, 14 $\alpha$ -) зависели от структуры заместителей при С-17. Причем побочный продукт трансформации  $\Delta^4$ -ПГ — 7 $\alpha$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ выделен почти в равном количестве с основным 11 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^4$ -ПГ как в присутствии, так и в отсутствие МЦД (табл. 2). Побочными продуктами трансформации в-ва "S" и ГМПД были соответственно 14 $\alpha$ - и 7 $\beta$ -гидроксипроизводные. Полученные результаты согласуются с литературными данными о способности штаммов вида *C. lunata* к образованию в качестве побочных продуктов 6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -, 7 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -гидроксистероидов [1–4, 26].

Высокая эффективность МЦД как солюбилизатора в-ва "S" — исходного соединения в синтезе большого количества лекарственных препаратов стероидной природы — показана в табл. 3. Введение 11 $\beta$ -гидроксигруппы в в-во "S", используемое в виде комплекса с МЦД в оптимальном отношении 1 : 1 (моль/моль) протекало при концентрации субстрата до 20 г/л в течение 48 ч без деструкции стероидов. В этом случае на мицелии отсутствовали продукты трансформации, что значительно упрощало выделение чистого гидрокортизона из водной фазы.

Анализ результатов гидроксилирования 16 стероидов в виде комплексов с химически модифицированными циклодекстринами дает основание считать последние более эффективными солюбилизаторами в реакции гидроксилирования, чем  $\beta$ -циклодекстрин. В частности, с помощью МЦД удалось увеличить содержание трансформируемых субстратов в реакционной среде до 10–20 г/л и ускорить их конверсию в целевые гидроксистероиды в 2 раза, а также повысить выход этих продуктов за счет отсутствия деструкции и уменьшения количества побочных соединений.

Следует также отметить, что в присутствии МЦД эффективно протекал ферментативный гидролиз. Как видно на примерах трансформации АДЭА, MAR и TAR в отсутствие МЦД, скорость гидролиза ацетоксигрупп была низкой.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sedlaczek L.* // CRC Crit. Rev. Biotechnol. 1988. V. 7. № 3. P. 187–236.
2. *Ахрем А.А., Тумов Ю.А.* // Стероиды и микроорганизмы. М.: Наука, 1970. 526 с.
3. *Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S.* // Enzyme Microb. Technol. 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
4. *Mahato S.B., Garai S.* // Steroids. 1997. V. 62. № 4. P. 332–345.
5. *Srivastava S.K., Srivastava R.A.K., Mathur S.N.* // J. Appl. Bacteriol. 1985. V. 59. № 5. P. 399–402.
6. *Szejtli J.* // Pure Appl. Chem. 2004. V. 76. № 10. P. 1825–1845.
7. *Udvardy E.N., Bartho I., Hantos G., Trinn M., Vida Z., Szejtly J., Stadler A., Haben I., Balazs M.* UK Patent Appl. 1983. № 2108965.
8. *Суходольская Г.В., Донова М.В., Николаева В.М., Кощенико К.А., Довбня Д.В., Гулевская С.А.* Патент РФ. 2000. № 2156302.
9. *Алехина Т.М., Рыжкова В.М., Кураков В.В., Клубничкина Г.А.* // Хим.-фарм. журн. 1993. Т. 4. № 2. С. 59–62.
10. *Чинчокар С.Б., Суходольская Г.В., Баклашова Т.Г., Кощенико К.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. № 6. С. 685–693.
11. *Fokina V.V., Karpov A.V., Sidorov I.A., Andrijushina V.A., Arinbasarova A.Yu.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 47. № 6. P. 645–649.
12. *Singer Y., Shity H., Bar R.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 35. № 6. P. 731–737.
13. *Hesselink P.G.M., Van-Vliet S., De Vries H., Witholt B.* // Enzyme Microb. Technol. 1989. V. 11. № 7. P. 398–404.
14. *Schlosser D., Irrgang S., Schmauder H.-P.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 39. № 1. P. 6–20.
15. *Lu W.* // Food Bioprod. Proc. 2007. V. 85. № 1. P. 63–72.
16. *Донова М.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 1–14.
17. *Jadoun J., Bar R.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 40. № 4. P. 477–482.
18. *Alexander D.L., Fischer J.F.* // Steroids. 1995. V. 60. № 3. P. 290–294.
19. *Del Valle E.M.* // Process Biochem. 2004. V. 39. № 9. P. 1036–1046.
20. *Андрюшина В.А., Дружинина А.В., Ядерец В.В., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 78–83.
21. *Андрюшина В.А., Войшвилло Н.Е., Дружинина А.В., Стыценко Т.С., Ядерец В.В., Скрябин К.Г.* // Патент РФ. 2008. № 2377309 // Бюл. Изобр. 2009. № 36.
22. *Шувалова С.Д., Габинская К.Н., Попова Е.В., Савинова Т.С., Андрюшина В.А.* // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. № 5. С. 44–46.
23. *Chouhary M.I., Ali Shah S.A., Musharraf S.G., Shaheen F., Atta-Ur-Rahman* // Nat. Prod. Res. 2003. V. 17. № 3. P. 215–220.
24. *Kollerov V.V., Shutov A.A., Fokina V.V., Suhodolskaya G.V., Donova M.V.* // J. Mol. Cat. B: Enz. 2008. V. 55. № 1. P. 61–68.
25. *Undisz K., Groh H., Stopsack H., Horhold-Schubert C.* // J. Steroid Biochem. 1992. V. 43. № 6. P. 547–547.
26. *Charney W., Herzog H.L.* // Microbial Transformation of Steroids. New York: Acad. Press, 1967. 728 p.

## Hydroxylation of Steroids by *Curvularia lunata* Mycelium in the Presence of Methyl- $\beta$ -cyclodextrine

V. A. Andrushina, A. V. Druzhinina, V. V. Yaderets, T. S. Stitsenko, and N. E. Voishvillo

*Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

Received September 18, 2009

**Abstract**—Transformation of 16  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy- and  $\Delta^4$ -3-ketosteroids of androstane and pregnane classes was carried out using *Curvularia lunata* mycelium suspended in phosphate buffer with methyl- $\beta$ -cyclodextrine (MCD). As the result, 20 monohydroxy- and dihydroxy-metabolites, whose structure was determined using specters of proton magnetic resonance and mass-specters, have been isolated. Hydroxylation of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxy-steroids occurred mostly in the C-7 $\alpha$  position whereas hydroxylation of  $\Delta^4$ -3-ketosteroids was in the C-11 $\beta$  position. Only androst-4-en-3,17-dione, 9 $\alpha$ -hydroxyl-androstenedione, and androsts-1,4-diene-3,17-dione were hydroxylated at C-14 $\alpha$  position. Besides main 11 $\beta$ -derivatives, the 6 $\beta$ - and 7 $\beta$ -hydroxy-derivatives with yield 10 and 30%, respectively, were isolated during transformation of progesterone and hydroxymethyl pregnadienon. The ratio of MCD to transforming steroid was 1 : 1 (mol/mol). Hydroxycortisone and 7 $\alpha$ -hydroxyandrosthenolone with the yield 55 and 77%, respectively, were obtained at the maximal concentrations of cortexolone 20 g/l and androsthenolone acetate 10 g/l in the presence of MCD. Absorption of steroids on mycelium, lower speed of their transformation, low concentrations of modifying substrates, and low yield of hydroxyderivatives have been observed in the absence of MCD.

UDC 582.28:577.154.3

## A NOVEL SCREENING METHOD OF CELLULASE-PRODUCING BACTERIA BASED ON *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

© 2011 W. Wang, P. Wang, R. Hu

College of Bioengineering, Chongqing University of Technology,  
Yangjiaping, Chongqing, 400050, China  
e-mail: hmwwn@yahoo.com.cn

Received February 10, 2010

Cellulase is the key to utilize the renewable and abundant cellulose resource, cellulase-producing microorganism is an important source of cellulase. The traditional screening method of cellulase-producing microorganism is low efficacy and not macroscopic. The screening method in this study was based on the interactive culture character between cellulase-producing bacteria and *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* on plates, the results indicated that the inhibition zone and cellulase activity of bacterial strains are conformity on the whole, so the screening method is very quickly and apparent.

Cellulose biomass is a renewable and abundant resource with great potential for bioconversion to value-added bioproducts, the development of more efficient utilization of biomass has received increased attention in recent years [1–4]. However, the biorefining process remains economically unfeasible due to a lack of biocatalysts that can overcome cost hurdles, cellulases play an important role in processing biomass through advanced biotechnological approaches [5].

Cellulase-producing bacteria is a new source of cellulose [6, 7]. The traditional method is to analyze the enzyme activity after isolating a lot of bacteria. Screening for bacterial cellulase activity of microbial isolates was typically performed on carboxymethylcellulose (CMC) containing plates. This method can not be timely and zones of hydrolysis are not easily discernible. It is costed a lot of works, and the researcher can not directly know the results of enzyme activity [8].

Efficient plate-screening methods are a prerequisite which give a more rapid and highly discernible result [9–11].

An investigation of nine different species of *Phytophthora* has been made in order to determine the composition and structural pattern of the mycelium. A basic skeleton of chitin was found to have superimposed upon it a mixture of two forms of cellulose. The presence of a hexose was indicated, no pectic compounds were present. When viewed in polarized light, the same appearance is presented by young and old cultures of typical species of *Phytophthora* [12]. It was reported that the thickened and the cellulose-enriched hyphae cell wall of *Phytophthora* could be penetrated by *Pythium oligandrum*, which produced large amounts of cellulolytic enzymes [13].

This method was applied in the present study was that screening cellulase-producing bacteria was based on *P. parasitica* var. *nicotianae*. The cellulose of *P. parasitica* var. *nicotianae* was considered as objective sub-

strate of cellulase from bacteria, and the results of experiments were direct and apparent.

### MATERIALS AND METHODS

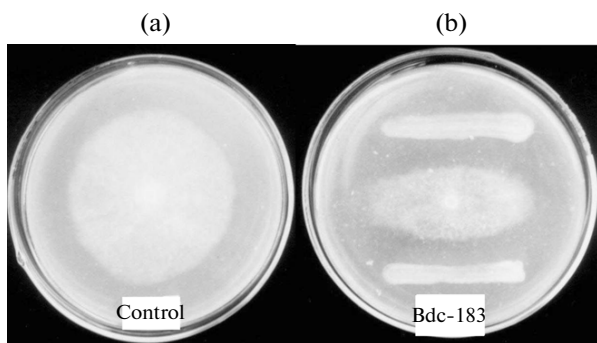
**Experiment strains and mediums.** *P. parasitica* var. *nicotianae* (wild type, Wang W. et al. [14]). Sesame medium [14]: sesame – 30 g, and sucrose – 15 g, deionized H<sub>2</sub>O to 1000 ml, adjust the pH to 6.5. Screening medium (g/l deionized H<sub>2</sub>O): sesame – 30, sucrose – 15, tryptone – 10, adjust the pH to 6.5. LB medium (Luria-Bertani medium) (g/l deionized H<sub>2</sub>O): tryptone – 10, yeast extract – 5, NaCl – 10, adjust the pH to 7.0. Sterilize by autoclaving.

**Isolation of candidate cellulase-producing bacteria.** Soil samples were collected from the Chongqing University of Technology. Bacteria strains were isolated from soil samples with LB medium by traditional plate-isolating methods [15], which were cultivated at 28°C, the purified strains were conserved for further research.

**Screening of cellulase-producing bacteria.** The experiments were performed on the screening medium flat plates. The 0.4 cm diameter mycelial clump of *P. parasitica* var. *nicotianae* was inoculated on the center of the flat plate, and the candidate cellulase-producing bacteria were inoculated on both sides of *P. parasitica* var. *nicotianae*, the distance between them was 2 cm. They were cultured at 28°C for 3 days. The candidate bacteria with inhibition zones would be further examined their cellulase activities.

**Assay of cellulase activity of the cellulase-producing bacteria.** The culture fluid of candidate cellulase-producing bacteria were analyzed by dinitrosalicylic acid (DNS) and carboxymethylcellulose (CMC) containing plates standard method.

The strains were grown under aerobic conditions in LB at 28°C, followed by centrifugation at 4500 g for



**Fig. 1.** Inhibition zone of bacterial strain Bdc-183; (a) control *P. parasitica* var. *nicotiana*; (b) *P. parasitica* var. *nicotiana* was on the center, Bdc-183 were on the both sides.

20 min, the supernatants were collected and adjusted to pH 5.3 with citric acid buffer for further experiments.

Supernatant was applied to analysis by DNS method [16]. 20 ml supernatant was dropped on the CMC containing plates, which were stained with Congo Red in 36 h [17–19].

**Investigation of the hypha morphous of *P. parasitica* var. *nicotiana* by microscope.** The sterilized glass slide was covered by screening medium for 1 mm thickness, the *P. parasitica* var. *nicotiana* and Bdc-183 were inoculated on it, and the distance between them was 1.5 cm, they were cultured at 28°C for 48 h, and tested under microscope, the photomicrograph of anterior extremity hypha of *P. parasitica* var. *nicotiana* was taken.

## RESULTS

**Culture properties of strains on screening medium.** 386 strains were isolated from soil samples, and 23 strains of which can inhibit the growth of *P. parasitica* var. *nicoti-*



**Fig. 2.** The hydrolysis circle of bacterial strain Bdc-183 on CMC containing plate.

*anae*, for example, the inhibition zone between *P. parasitica* var. *nicotiana* and strain Bdc-183 was 10.3 mm, the inhibition zone between *P. parasitica* var. *nicotiana* and strain Bdc-53 was 3.5 mm (Fig. 1, table).

**Analysis of cellulase activity of bacteria.** The fermentation liquid of strain was analyzed by DNS method, and it indicated that the tested cellulase-producing bacteria with inhibition zones had different cellulase activities, and the cellulase activity of Bdc-183 was 13.50 U/ml, the cellulase activity of Bdc-53 was 5.43 U/ml.

The hydrolysis zones were very obvious on CMC containing plates, the diameter of hydrolysis circle of Bdc-183 was 0.98 cm (Fig. 2), the diameter of hydrolysis circle of Bdc-53 was 0.46 cm (results not shown). It were the same as DNS experiments.

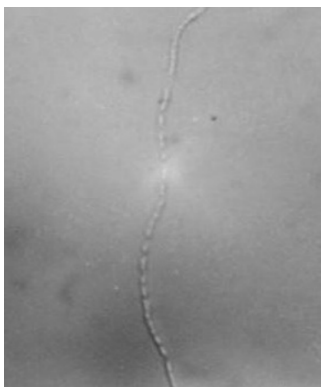
The inhibition zone and cellulase activity of bacterial strains are conformity on the whole (table).

**The hypha morphous of *P. parasitica* var. *nicotiana* hydrolyzed by Bdc-183.** The anterior extremity hypha of *P. parasitica* var. *nicotiana* was hydrolyzed by bacterial strain Bdc-183, and the hypha was destructed into small pieces (Fig. 3, photomicrograph, 16 × 40). It was indicat-

### Inhibition zone and cellulase activity of bacterial strains

Bacterial strains	Inhibition zone, mm	Cellulase activity, U/ml	Bacterial strains	Inhibition zone, mm	Cellulase activity, U/ml
Bdc-3	3.0	5.21	Bdc-183	10.3	13.50
Bdc-8	2.3	3.80	Bdc-189	4.0	5.68
Bdc-13	4.0	5.87	Bdc-197	2.5	4.42
Bdc-17	5.6	6.60	Bdc-231	1.5	2.41
Bdc-18	7.6	8.71	Bdc-243	2.8	4.86
Bdc-20	1.5	2.20	Bdc-308	3.8	5.36
Bdc-53	3.5	5.43	Bdc-345	8.5	9.27
Bdc-83	2.0	3.20	Bdc-367	1.8	3.22
Bdc-95	2.4	4.56	Bdc-369	4.5	5.96
Bdc-96	5.0	6.28	Bdc-372	5.0	6.68
Bdc-104	6.3	7.93	Bdc-381	1.0	1.98
Bdc-126	7.0	8.11			





**Fig. 3.** The hypha of *P. parasitica* var. *nicotiana* was hydrolyzed by bacterial strain Bdc-183 (photomicrograph, 16 × 40).

ed that the cellulase produced by Bdc-183 can decompose the hypha of *P. parasitica* var. *nicotiana* for its cellulose construction.

### DISCUSSION

Efficient screening methods of cellulase-producing bacteria were constantly explored, which the course would be more rapid and the results would be highly discernible.

*P. parasitica* is a soilborne oomycete pathogen capable of infecting a wide range of plants, including many solanaceous plants. *P. parasitica* var. *nicotianae* is the pathogen of tobacco black shank [14], and it has the characteristic of *Phytophthora*, which is composed of hexose.

In this research, the composition characteristic of *P. parasitica* var. *nicotianae* was utilized, the *P. parasitica* var. *nicotianae* and cellulase-producing bacteria were cultivated correspondingly on screening medium plates, if the bacteria can produce cellulase, the *P. parasitica* var. *nicotiana* were restrained, the phenomenon can be easily detected, the screening efficiency will be greatly improved.

From the results described in the present study, it seems clear that the inhibition zone and cellulase activity of bacterial strains are conformity on the whole (see table). The inhibition zone and the cellulase of strain Bdc-53 were 3.5 mm and 5.43 U/ml, which of Bdc-183 were 10.3 mm and 13.50 U/ml, and which of Bdc-3 were 3.0 mm and 5.21 U/ml. It indicated that the results of the present study method and the classic method were conformity.

The mechanisms of antagonism between the bacteria and the fungus were investigated, the hypha of *P. parasitica* var. *nicotianae* was destructed by cellulase-producing bacteria for the cellulase.

Cellulose-produced bacteria inhibited the *P. parasitica* var. *nicotianae* on agar media, the aim bacteria can be easily detected by eyes, no need by instrument for further

analysis. The method was rapid, simple and efficacy to identify cellulase-producing bacteria in a high throughput, and it is helpful to utilizing cellulose.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Natural Science Foundation of the Chongqing Science and Technology Commission (NO: CSTC, 2004CC36) and The Doctor Foundation (NO: 2009ZD05). We acknowledge the intellectual support of the colleagues in our laboratory.

### REFERENCES

1. Dashtban, M., Schraft, H., and Qin, W., *Int. J. Biol. Sci.* 2009, vol. 5, № 6, pp. 578–595.
2. Fujii, K. and Shintoh, Y., *J. Appl. Microbiol.*, 2006, vol. 101, № 5, pp. 1169–1176.
3. Geib, S.M., Jimenez-Gasco, M.M., Carlson, J.E., Tien, M., and Hoover, K., *Environ. Entomol.*, 2009, vol. 38, № 3, pp. 686–699.
4. Romano, R.T., Zhang, R., Teter, S., and McGarvey, J.A., *Bioresour Technol.*, 2009, vol. 100, № 20, pp. 4564–4571.
5. Sakai, S., Ito, S., Ogushi, Y., Hashimoto, I., Hosoda, N., Sawae, Y., and Kawakami, K., *Biomaterials.*, 2009, vol. 30, № 30, pp. 5937–5942.
6. Waeonukul, R., Kyu, K.L., Sakka, K., and Ratanakhanokchai, K., *J. Biosci. Bioeng.*, 2009, vol. 107, № 6, pp. 610–614.
7. Maki, M., Leung, K.T., and Qin, W., *Int. J. Biol. Sci.*, 2009, vol. 5, № 5, pp. 500–516.
8. Han, Y.W. and Srinivasan, V.R., *Appl. Microbiol.*, 1968, vol. 16, pp. 1140–1145.
9. Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.E., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, vol. 33, № 1, pp. 178–183.
10. Kim, Y.S., Jung, H.C., and Pan, J.G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, № 2, pp. 788–793.
11. Shimokawa, T., Ishida, M., Yoshida, S., and Nojiri, M., *Bioresour Technol.*, 2009, vol. 100, № 24, pp. 6651–6654.
12. Thomas, R.C., *Ohio J. Sci.* 1943, vol. 43, pp. 135–138.
13. Picard, K., Tirilly, Y., and Benhamou, N., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, № 10, pp. 4305–4314.
14. Wanneng, W., Xuejun, Q., and Chonggang, X., *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, vol. 22, № 4, pp. 426–431.
15. Eichorst, S.A., Breznak, J.A., and Schmidt, T.M., *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, vol. 73, pp. 2708–2717.
16. Michael J. Bailey, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1988, vol. 2, № 5, pp. 494–496.
17. Ghose, T.K., *Pure Appl. Chem.*, 1987, vol. 59, № 2, pp. 257–268.
18. Li, X.H., Bhaskar, R., Yang, H.J., Wang, D., and Miao, Y.G., *Curr. Microbiol.*, 2009, vol. 59, № 4, pp. 393–399.
19. Criquet, S., *J. Microbiol. Methods*, 2002, vol. 50, № 2, pp. 165–173.

UDC 600

## STRAIN IMPROVEMENT FOR ENHANCED PRODUCTION OF CELLULASE IN *Trichoderma viride*

© 2011 F. Xu\*, J. Wang\*, S. Chen\*, W. Qin\*\*, Z. Yu\*\*\*, H. Zhao\*\*\*\*, X. Xing\*\*\*\*, H. Li\*\*\*\*\*

\*State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

e-mail: chensf@cau.edu.cn

\*\*Biorefining Research Initiative and Department of Biology, Lakehead University, Thunder Bay, ON, Canada P7B 5E1

e-mail: wqin@lakeheadu.ca

\*\*\*Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China

e-mail: zlyu@ipp.ac.cn

\*\*\*\*Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China, e-mail: xhxing@tsinghua.edu.cn

\*\*\*\*\*Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China, e-mail: liheping@tsinghua.edu.cn

Received January 18, 2010

The filamentous fungi *Trichoderma* species produce extracellular cellulase. The current study was carried out to obtain an industrial strain with hyperproduction of cellulase. The wild-type strain, *Trichoderma viride* TL-124, was subjected to successive mutagenic treatments with UV irradiation, low-energy ion beam implantation, atmospheric pressure non-equilibrium discharge plasma (APNEDP), and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine to generate about 3000 mutants. Among these mutants, *T. viride* N879 strain exhibited the greatest relevant activity: 2.38-fold filter paper activity and 2.61-fold carboxymethyl cellulase, 2.18-fold  $\beta$ -glucosidase, and 2.27-fold cellobiohydrolase activities, compared with the respective wild-type activities, under solid-state fermentation using the inexpensive raw material wheat straw as a substrate. This work represents the first application of APNEDP in eukaryotic microorganisms.

Cellulose, a  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4)-linked glucose polymer, is considered to be the primary product of photosynthesis and the most abundant renewable carbon resource in nature [1, 2]. Economic analyses have indicated that the production cost of cellulase is still the major cost factor in the hydrolysis of cellulosic materials to fermentable sugars. It is therefore imperative to improve the production of cellulase in order to make the process more economically viable [3, 4].

The cellulase complex secreted by filamentous fungi consists of three major enzyme components, an endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.4), a 1,4- $\beta$ -D-cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), and a 1,4- $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21), which act synergistically during the conversion of cellulose to glucose [2, 5, 6]. Among the cellulolytic fungi, *Trichoderma* species have been studied extensively because of their production of efficient cellulases, which are several hundred-fold more active than those produced by bacteria [3, 7]. Although, *T. reesei* produces cellobiohydrolases and endoglucanases in high quantities, it is deficient in  $\beta$ -glucosidase, causing the accumulation of the disaccharide cellobiose. The repression and end-product inhibition of cellulase by cellobiose limit the enzyme synthesis and activity [8, 9]. Thus, attempts to use the cellulase system from *T. reesei* mutants have not been successful.

To date, many traditional mutagenesis strategies have been applied to improve the production of cellulase [10–13]. Nevertheless, despite the efforts of many laboratories, no commercially efficient enzyme complex has been produced. The high cost of enzyme production is still the

bottleneck in the production of fermentable sugars from cellulosic materials [3]. Hence, the use of novel mutagens becomes very necessary in enhancing cellulase production.

Mutagenesis via the novel low-energy ion beam implantation and atmospheric pressure non-equilibrium discharge plasma (APNEDP) techniques has attracted great attention owing to their efficiency, safety, and non-polluting nature [14–16]. Ample evidence has demonstrated that ion-beam mutation has a wide range of biological effects. It also has a very high linear energy transfer and mutation efficiency compared with  $\gamma$ -ray or high-energy particles [14, 15]. APNEDP has been used recently in prokaryotic microbial mutation breeding. For example, Wang et al. [8] used APNEDP to induce mutations in *Streptomyces avermitilis* and obtained mutants with higher avermectin B1a productivity than that of the wild-type strain, by 60% or more [16].

The wild-type strain, *T. viride* TL-124, which is isolated from stacks of wheat straw, grows faster than *T. reesei* QM9414 and the wild-type *Aspergillus fumigatus* TL51. In addition, *T. viride* TL-124 has considerable  $\beta$ -glucosidase production. Thus, *T. viride* TL-124 was selected for strain improvement to enhance cellulase production. The current study was initiated to apply the combined mutagenic effects of treatments with UV irradiation, low-energy ion beam implantation, APNEDP, and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) to the production of cellulase in wild-type *T. viride* TL-124 to obtain an industrial strain with enhanced cellulase production.

This work represents the first application of APNEDP in eukaryotic microorganisms.

## MATERIALS AND METHODS

**Microorganism and culture media.** The wild-type *T. viride* TL-124 was isolated from stacks of wheat straw and maintained on potato dextrose agar (PDA) [3] in test tubes at 28°C. Minimal medium (MM) [17] was used for cultivation of *T. viride*. For the preliminary selection of mutants, cellulose-congo red medium was used (g/l:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.25, congo red – 0.2, cellulose – 1.88, and agar – 20, pH 7.0). The wheat straw used in medium preparation for solid-state fermentation was treated according to the method of Gao et al. [18]. Solid-state fermentation medium was prepared in a 250-ml Erlenmeyer flask containing 10 g wheat straw, 0.25 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and 25 ml of distilled water. The media were autoclaved for 30 min at 121°C.

**UV irradiation.** Protoplasts of *T. viride* TL-124 were prepared as described by Penttila et al. [19]. The protoplast suspension (2 ml of  $10^6$  per ml) was exposed to UV irradiation according to the method of Rubinder et al. [20]. D-sorbitol (1 M) was used as the osmotic stabilizer. The growing colonies were transferred before sporulating on PDA slants, for further studies.

**Low-energy ion beam implantation.** Low-energy ion implantation was performed in mutated *T. viride* according to the methods of Su et al. and Gu et al. [14, 15], at the heavy ion implantation facility [21] of the Chinese Academy of Sciences, Institute of Plasma Physics (ASIPP). Nitrogen ions with energy of 15 keV were used at an implantation dose of  $90 \times 2.6 \times 10^4$  ions/(s cm<sup>2</sup>).

**Atmospheric pressure, non-equilibrium discharge plasma (APNEDP).** The spores of mutated *T. viride* were placed 2.0 mm downstream of the plasma torch nozzle exit and were treated with pure helium plasmas with  $P_{in} = 180$  W and  $Q_{He} = 15.0$  slpm. The corresponding gas temperature of the plasma jet was less than 40°C [16].

**N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) mutagenesis.** The spores of mutated *T. viride* were treated with MNNG (Sigma, USA) according to the method of Chand et al. [13]. The treated sample was washed immediately with PBS buffer (pH 6.5), and spread on a MM plate containing 0.5% LiCl.

**Fermentation.** Different fermentation runs were conducted using the shake-flask method. To determine the effects of different carbon sources on cellulase production, mutant *T. viride* were grown in MM in which the 2% glucose was substituted with different carbon sources. To determine the effects of different nitrogen sources on cellulase production, wheat straw replaced glucose as the sole carbon source in MM, and the 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was substituted with different nitrogen sources. Finally, initial pH, growth temperature, and rotation speed were optimized via individual experiments.

**Enzyme assay.** Crude enzyme preparation was prepared according to the method of Latifian et al. [22]. The

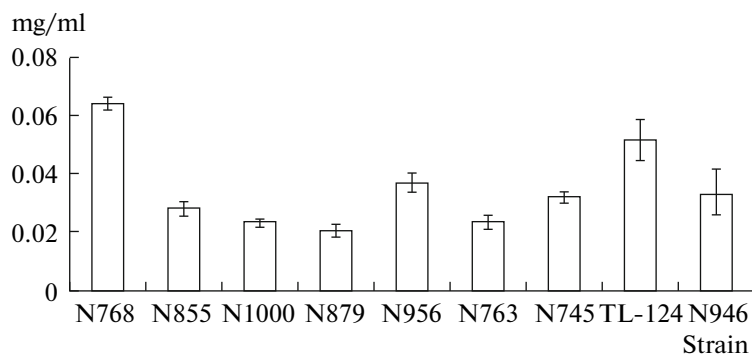
protein concentration of the crude enzyme preparation was determined by the Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) fraction V (Sigma) as the standard. Filter paper activity (FPA) (total cellulase) and CMCase (endo-glucanase),  $\beta$ -glucosidase, and cellobiohydrolase (exoglucanase) activities were determined according to the method of Ghose [23] with some modifications. The released sugar was measured by the dinitrosalicylic acid method [24]. The enzyme activity is expressed as U/mg of protein, where one unit (U) is defined as the amount of enzyme required to liberate 1  $\mu\text{mol}$  of product per min at 50°C.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Mutagenesis.** The wild-type *T. viride* TL-124 strain was subjected to successive mutagenic treatments using UV irradiation, low-energy ion beam implantation, APNEDP, and MNNG. The preliminary selection of mutants was based on the diameter of the clearing zones surrounding the colonies grown on cellulose-congo red medium [9, 25]. After each mutagenic treatment, the cellulase activity of the clones that displayed the largest clearing zones was assessed under solid-state fermentation, and the most promising strain was subjected to the next mutagenic treatment. After four mutagenic steps, more than 3000 mutant colonies were produced, and about 1000 mutants were assayed for cellulase activity. Mutant N879 was selected because it had the highest total cellulase production.

**Cellulase activity assay.** The assayed protein concentrations indicated obvious differences among the mutants of *T. viride*. The protein concentration in the crude enzyme preparation from the mutants ranged from 0.021 to 0.064 mg/ml, compared with 0.052 mg/ml in the preparations from the wild-type strain (Fig. 1). These results indicate that the mutations caused changes in protein production or secretion and are in agreement with a report by Prabavathy et al. [26]. Various factors such as the presence of non-protein components in solutions or non-cellulase proteins in the preparations may interfere with the determination of protein concentration [9, 27, 28].

Solid-state fermentation is an attractive process for economically producing cellulase because of its low capital costs for equipment and low operational costs. Thus, the selected mutants of *T. viride* were evaluated for production of extracellular FPA under solid-state fermentation, using the economical raw material wheat straw as substrate (Fig. 2a). All of the selected mutants showed a slight difference in FPA compared with the wild-type strain. The differences in activity did not allow for a direct comparison of volumetric activities, and the immediate alternative for comparing the data was the activity based on the protein concentration (U/mg) [7]. The comparison of the activities based on protein concentration revealed obvious differences between the mutants and the wild-type strain. On the basis of protein concentration, the FPA of the mutants ranged from 1.53 to 5.33 U/mg, compared with 2.24 U/mg for the wild-type strain



**Fig. 1.** Protein concentrations (mg/ml) of the crude enzyme preparations from the *T. viride* mutant strains compared with the wild-type strain, *T. viride* TL-124. Data were determined from a minimum of three replicates. Error bars represent the standard deviation of each data point.

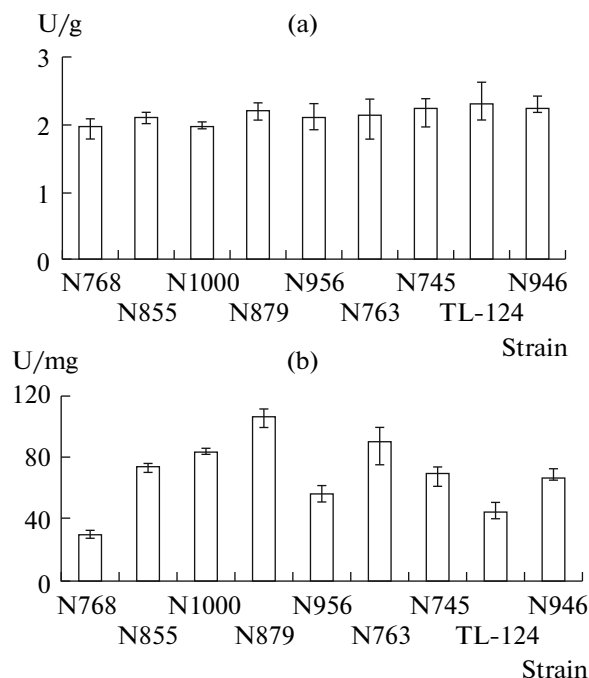
(Fig. 2b). The maximum cellulase activity (U/mg) was observed with mutant strain N879, which produced 2.38-fold FPA and 2.61-fold CMCase, 2.18-fold  $\beta$ -glucosidase, and 2.27-fold cellobiohydrolase activities, relative to the respective activities in the wild-type strain (Table). The mutant strain N879 also produced higher FPA and CMCase and cellobiohydrolase activities, compared with *T. reesei* QM9414 and *A. fumigatus* TL51 (Table). Notably, the mutant N879 produced  $\beta$ -glucosidase at a level that was about 3-fold that of *T. reesei* QM9414 and approximately equal to that produced by *A. fumigatus* TL51 (Table).

Here, we used *T. reesei* strain QM9414 as a standard for comparing the cellulase production of the best mutant obtained in this study. It should be noted that the *T. viride* mutant strain N879 also produced high levels of extracellular  $\beta$ -glucosidase (29.22 U/mg), compared with *T. reesei* QM9414 (9.59 U/mg), when grown in wheat straw (Table). This was improved further under controlled culture conditions and genetic approaches. In addition, the specific FPA and CMCase and cellobiohydrolase activities in strain N879 were 1.92-, 2.46-, and 1.60-fold the respective enzyme activities in the standard strain, *T. reesei* QM9414 (Table). These results indicate the effectiveness of low-energy ion beam implantation and APNEDP in producing useful *T. viride* mutants. These also demonstrate that *T. viride* mutant N879 has potential for development as a cellulase production system.

**Fermentation.** Cellulase production depended on the nature of the carbon and nitrogen sources in the culture medium. Several carbon and nitrogen sources were tested for their effect on the FPA of *T. viride* mutant strain N879. The optimal carbon source for cellulase production was  $\alpha$ -lactose (Fig. 3a). According to previous studies, this may be attributable to the inducible nature of *T. viride* cellulases, which would indicate that  $\alpha$ -lactose was a good inducer of cellulase enzymes in the mutant strain N879, consistent with a previous report [8]. Compared with  $\alpha$ -lactose, cellulose and wheat straw showed lesser effects on cellulase production. It may be that  $\alpha$ -lactose is metabolized faster and utilized more quickly

than the long insoluble chains covalently bound to molecules such as cellulose and wheat straw, which are too large to be transported through cell walls. Wheat straw, a raw natural material, has a more complex structure than cellulose, which may explain why the effect of cellulose on cellulase production was greater than that of wheat straw.

Based on the nitrogen source comparison, nitrate and peptone were the best inorganic and organic nitrogen sources, respectively (Fig. 3b). The total cellulase produc-



**Fig. 2.** FPA production in wild-type and mutant *T. viride* strains under solid-state fermentation. (a) FPA expressed as U/g dry weight. (b) FPA expressed as U/mg protein. Data were determined from a minimum of three replicates. Error bars represent the standard deviation of each data point.

Cellulase activities of the mutated *T. viride* and wild type strain under solid-state fermentation\*

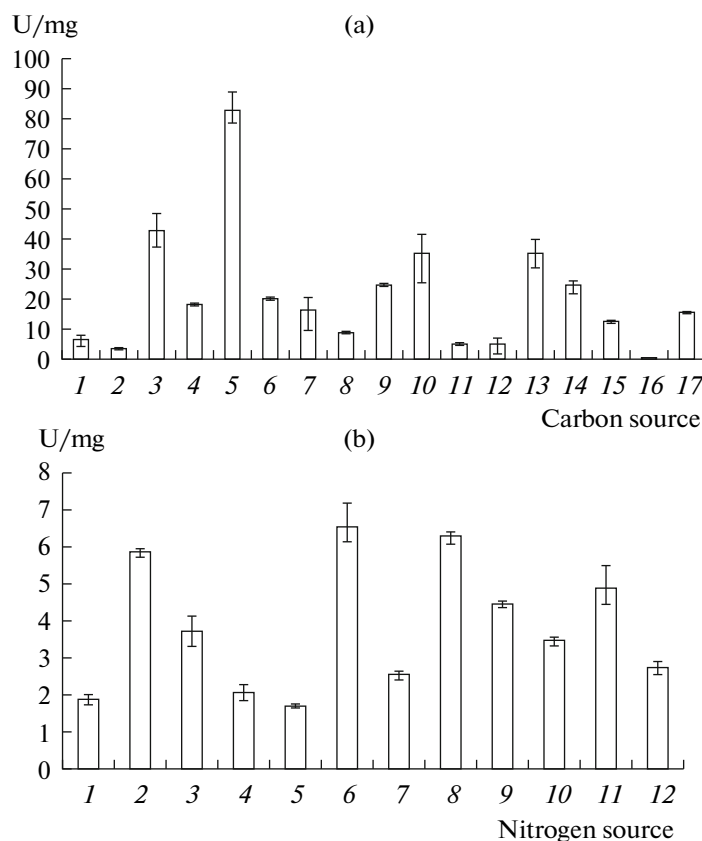
Strain	CMCase, U/mg protein	Cellobiohydrolase, U/mg protein	$\beta$ -glucosidase, U/mg protein	FPA, U/mg protein
<i>T. viride</i> TL-124	867.35	26.81	13.39	44.75
<i>T. viride</i> N879	2261.54	60.90	29.22	106.60
<i>T. reesei</i> QM9414	919.11	38.03	9.59	55.43
<i>A. fumigatus</i> TL51	1233.00	43.75	36.89	84.28

\* Data were determined from a minimum of three replicates.

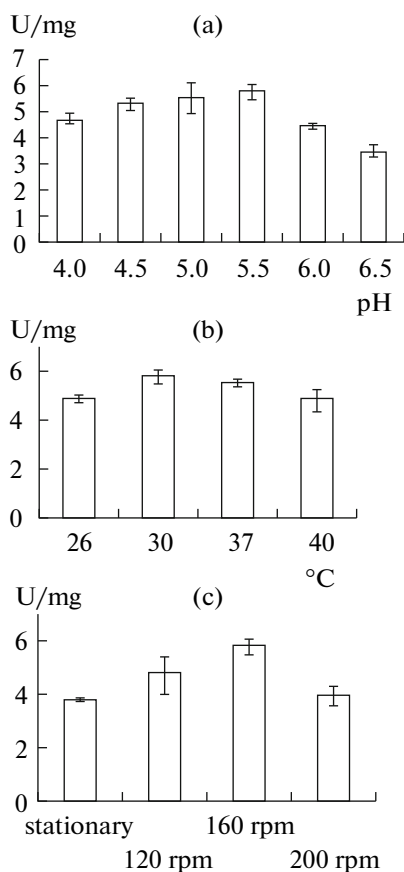
tion was affected less significantly by changes in the nitrogen source than by changes in the carbon source.

The fermentation conditions were optimized with monofactorial experiments. The optimal initial pH was 5.5 (Fig. 4a), and the mutant N879 produced the maximum total cellulase at a growth temperature of 30°C (Fig. 4b). *T. viride* N879 showed highest FPA at the speed of rotation was 160 rpm (5.84 U/mg protein),

compared with the condition of 120 rpm (4.86 U/mg protein) and 200 rpm (4.00 U/mg protein) (Fig. 4c). Moreover, total cellulase production in strain N879 was lower at the condition of stationary (3.84 U/mg protein) compared with any rotation condition tested in this study (Fig. 4c). This observation may be explained by the fact that shaking alters the metabolism of the fungus, which may increase cellulase produc-



**Fig. 3.** Effects of the carbon (a) and nitrogen (b) sources on FPA production in mutant *T. viride* N879. (a) 1 – D-glucose; 2 – mannitol; 3 – maltose; 4 – cellulose; 5 –  $\alpha$ -lactose; 6 – D-sorbitol; 7 – D-(+)-cellobiose; 8 – CMC; 9 – L-(-)-sorbitol; 10 – D-mannose; 11 – wheat straw; 12 – D-galactose; 13 – D-(-)-fructose; 14 – starch soluble; 15 – sucrose; 16 – tween-80; 17 – glycerol. (b) 1 – urea; 2 –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 3 –  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 4 – yeast extract; 5 – beef extract; 6 –  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 7 –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; 8 –  $\text{NaNO}_3$ ; 9 –  $\text{KNO}_3$ ; 10 – peptone; 11 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 12 –  $\text{NH}_4\text{Ac}$ . Data were determined from a minimum of three replicates. Error bars represent the standard deviation of each data point.



**Fig. 4.** Effect of initial pH (a), culture temperature (b) and rotation speed (c) on FPA production (U/mg protein) in mutant *T. viride* N879. Data were determined from a minimum of three replicates. Error bars represent the standard deviation of each data point.

tion. These fermentation conditions provide the foundation for future utilization the *T. viride* mutant N879.

#### ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the National Key Technology R&D Program of China (Grant No. 2006BAD07A01).

#### REFERENCES

- Jarvis, M., *Science*, 2003, vol. 426, no. 6967, pp. 611–612.
- Zhang, Y.H.P. and Lynd L.R., *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, vol. 88, no. 7, pp. 797–824.
- Adsul, M.G., Bastawde, K.B., Varma, A.J., and Gokhale, D.V., *Bioresource Technol.*, 2007, vol. 98, no. 7, pp. 1467–1473.
- Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., and Esterbauer, H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, vol. 36, no. 5, pp. 701–707.
- Henrissat, B., *Cellulose*, 1994, vol. 1, no. 3, pp. 169–196.
- Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E., and Mielenz, J.R., *Bio-technol. Adv.*, 2006, vol. 24, no. 5, pp. 452–481.
- Martins, L.F., Kolling, D., and Camassola M., Dillon A.J.P., and Ramos, L.P., *Bioresource Technol.*, 2008, vol. 99, no. 5, pp. 1417–1424.
- Ahamed, A. and Vermette, P., *Biochem. Eng. J.*, 2008, vol. 40, pp. 399–407.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., and Olsson, L., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, vol. 56, no. 1–2, pp. 17–34.
- Anwar, M.N., Suto, M., and Tomita, F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, vol. 45, no., pp. 684–647.
- Szengyel, Z., Zacchi, G., Varga, A., and Reczey, K., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2000, vol. 84–86, no. 1–9, pp. 679–691.
- Xia, L.M. and Shen, X.L., *Bioresource Technol.*, 2004, vol. 91, no. 3, pp. 259–262.
- Chand, P., Aruna, A., Maqsood, A.M., and Rao, L.V., *J. Appl. Microbiol.*, 2005, vol. 98, no. 2, pp. 318–323.
- Su, C.X., Zhou W., Fan, Y.H., Wang, L., Zhao, S.G., and Yu, Z.L., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 33, no. 12, pp. 1037–1042.
- Gu, S.B., Yao, J.M., Yuan, Q.P., Xue, P.J., Zheng, Z.M., Wang, L., and Yu, Z.L., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 72, no. 3, pp. 456–461.
- Wang, L.Y., Huang, Z.L., Li, G., Zhao, H.X., Xing, X.H., Sun, W.T., Li, H.P., Gou, Z.X., and Bao, C.Y., *J. Appl. Microbiol.*, 2010, vol. 108, no. 3, pp. 851–858.
- Tao, L., Dong, H.J., Chen, X., Chen, S.F., and Wang, T.H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 80, no. 4, pp. 573–578.
- Gao, J.M., Weng, H.B., Zhu, D.H., Yuan, M.X., Guan, F.X., and Xi, Y., *Bioresour Technol.*, 2008, vol. 99, no. 16, pp. 7623–7629.
- Penttila, M., Nevalainen, H., Ratto, M., Salminen, E., and Knowles, J., *Gene*, 1987, vol. 61, no. 2, pp. 155–164.
- Rubinder, K., Chadha, B.S., Sing, N., Saini, H.S., and Singh, S., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 29, no. 2, pp. 70–74.
- Zengliang, Yu. et al., Patent No. ZL93103361.6, 2000, People's Republic of China.
- Latifian, M., Hamidi-Esfahani, Z., and Barzegar, M., *Bioresource Technol.*, 2007, vol. 98, no. 18, pp. 3634–3637.
- Ghose, T.K., *Pure Appl. Chem.*, 1987, vol. 59, no. 2, pp. 257–268.
- Miller, G.L., *Anal. Chem.*, 1959, vol. 31, no. 3, pp. 426–428.
- Teather, R.M. and Wood P.J., *Appl. Environ. Microb.*, 1982, vol. 43, no. 4, pp. 777–780.
- Prabavathy, V.R., Mathivanan, N., Sagadevan, E., Murugesan, K., and Lalithakumari, D., *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, vol. 38, no. 5, pp. 719–723.
- Adney, W.S., Mohagheghi, A., Thomas S.R., and Himmel, M., *Am. Chem. Soc.*, Washington, 1995, pp. 256–271.
- Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., and Lichtig, J., *Quim Nova*, 1998, vol. 21, no. 6, pp. 787–793.

UDC 570

## DECOLORIZATION OF THE ANTHRAQUINONE DYE CIBACRON BLUE 3G-A WITH IMMOBILIZED *Coprinus cinereus* IN FLUIDIZED BED BIOREACTOR

© 2011 A. Moutaouakkil\*, \*\*, M. Blaghen\*\*

\*Unit of Radio-Immuno-Analyse, Division of Life Science Applications, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques (CNESTEN), 10001 Rabat, Morocco  
e-mail: moutaouakkil@cnesten.org.ma

\*\*Unit of Bio-industry and Molecular Toxicology, Laboratory of Microbiology, Biotechnology and Environment, Faculty of Sciences Aïn Chock, University Hassan II – Aïn Chock, 20100 Casablanca, Morocco  
e-mail: blaghen@facsc.ac.ma

Received January 16, 2010

*Coprinus cinereus*, which was able to decolorize the anthraquinone dye Cibacron Blue 3G-A (CB) enzymatically, was used as a biocatalyst for the decolorization of synthetic solutions containing this reactive dye. *Coprinus cinereus* was immobilized in both calcium alginate and polyacrylamide gels, and was used for the decolorization of CB from synthetic water by using a fluidized bed bioreactor. The highest specific decolorization rate was obtained when *Coprinus cinereus* was entrapped in calcium alginate beads, and was of about  $3.84 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  with a 50% conversion time ( $t_{1/2}$ ) of about 2.60 h. Moreover, immobilized fungal biomass in calcium alginate continuously decolorized CB even after 7 repeated experiments without significant loss of activity, while polyacrylamide-immobilized fungal biomass retained only 67% of its original activity. The effects of some physicochemical parameters such as temperature, pH and dye concentration on decolorization performance of isolated fungal strain were also investigated.

Synthetic organic dyes are extensively used in the textile industry. During manufacturing, an estimated 10–15% of these dyes are lost in the effluents, rendering them highly colored [1, 2]. Release of these dyes into the environment has become a major concern in wastewater treatment since some of them or their metabolites may be mutagens or carcinogens [3, 4].

Cibacron Blue 3G-A (C.I. 61211), also called Procion Blue H-B or Reactive Blue 2, is one of the most reactive synthetic dyes used in the textile industry [5]. In addition to the triazine group acting as reactive group, the cibacron Blue 3G-A (CB) presents an anthraquinone group as chromophore (Fig. 1) dyeing natural fibers, such as cellulose, through covalent bonds [6]. Moreover, this polynuclear monochlorotriazine dye was shown to bind most types of proteins [7, 8].

The major environmental problem associated with the use of this type of reactive dyes is due to their inefficient fixation to the fibers. Therefore, significant losses occur during the manufacture and processing with dyes being discharged as effluents into publicly owned water treatment plants.

Considerable research efforts have been devoted to optimize color removal from effluents of the textile industry. Most of the chemical and physical methods proposed for treating dye wastewater have been not widely applied because of the high cost and the secondary pollution that can be generated by the excessive use of chemi-

cal [9–11]. This has led many workers to search for the use of microorganisms, such as bacteria or fungi, for the degradation of these compounds in wastewater treatment systems. Most biological degradations of textile dyes are carried out by anaerobic bacteria [12–14]. Generally, textile dyes are resistant to attack by bacteria under aerobic conditions [15–17]. Furthermore, bacterial enzymes involved in the dye degradation have been shown to be very specific [18, 19].

White-rot fungi are however efficient in biodegradation of recalcitrant compounds like xenobiotics, lignin and dyestuffs by their extracellular ligninolytic enzyme system [20–22]. White-rot fungi offer significant advantages over bacteria. Their extracellular enzyme systems including Mn-dependent peroxidase (MnP), Mn-independent peroxidase (P), lignin peroxidase (LiP) and laccase (L) being non-specific can attack a wide variety of complex aromatic dyestuffs [23, 24]. Since the enzymes are extracellular, the substrate diffusion limitation into the cell, generally observed in bacteria, is not encountered. White-rot fungi do not require preconditioning to particular pollutants, because enzyme secretion depends on nutrient limitation, nitrogen or carbon, rather than presence of pollutant. The extracellular enzyme system also enables white-rot fungi to tolerate high concentrations of pollutants [25].

Immobilization of living microorganisms has been described as useful in biological wastewater treatment



[26–28]. Immobilization of bacteria, yeast cells and fungi has been carried out by various techniques. Entrapment process within natural or synthetic matrices is the most conventional method of immobilization [29]. It is widely known that immobilized cells offer many advantages: enhance the stability, mechanical strength and reusability of the biocatalyst [30, 31].

The aim of this work was to evaluate the potential of the white-rot fungus *Coprinus cinereus* to decolorize the reactive anthraquinone dye CB in fluidized bed bioreactor. *Coprinus cinereus*, which was isolated from dye-contaminated sludge, has been immobilized in both calcium alginate (natural gel matrix) and polyacrylamide (synthetic polymer matrix). Effects of various physicochemical parameters such as temperature, pH and dye concentration on the kinetics of CB decolorization were investigated. Repeated batch decolorization tests were also performed with both free and immobilized fungal biomass to justify repetitive use. Decolorization rates obtained were compared. The information obtained from this study is expected to become a useful reference for the development of practical decolorization processes using immobilized fungal biomass as the biocatalyst.

## MATERIALS AND METHODS

**Microorganism and culture media.** *Coprinus cinereus* used in this study was isolated from dye-contaminated sludge collected from an industrial area in Casablanca city (Morocco). It was identified based on the visual observation of isolates grown on potato dextrose agar (PDA) plates, micro-morphological studies in slide culture [32] at room temperature, and the taxonomic keys described by De Hoog et al. [33] as well as the compendium of soil fungi [34].

Two media were used in this study: one was potato dextrose (Topley House, Bury, England) used for routine transfer and fungus cultivation, and the other was minimum medium (MM) containing ( $\text{g l}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0.6,  $\text{MgSO}_4$  – 0.1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0.1,  $\text{NaCl}$  – 0.5; ( $\text{mg l}^{-1}$ ):  $\text{CaCl}_2$  – 20,  $\text{MnSO}_4$  – 1.1,  $\text{ZnSO}_4$  – 0.2,  $\text{CuSO}_4$  – 0.2 and  $\text{FeSO}_4$  – 0.14 (pH adjusted to 7.0 with 1 M HCl), used to monitor the decolorization.

**Measurement of dye concentration.** The anthraquinone dye used in this study was CB (Fig. 1), which was obtained from BDH Chemicals Ltd Poole (England). The concentration of anthraquinone dye in samples was determined after centrifugation at 15000 g for 15 min by measuring the absorbance of the supernatant at 612 nm using a Jenway 6405 UV/Visible spectrophotometer (USA).

**Fungus growth and decolorization of CB.** Precultures of *Coprinus cinereus* were prepared by inoculating plugs (diameter 0.5 cm) from the growing zone of fungus on PDA plate to 50 ml of PDB. Then, cells were cultivated statically at 25°C for 3 days. Afterwards, the precultures were homogenized aseptically using a potter homogenizer (200 rpm). Aliquots of 2 ml of homogenized precul-

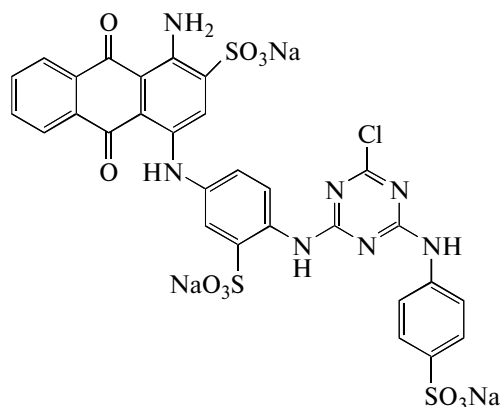


Fig. 1. Chemical structure of Cibacron Blue 3G-A (CB, C.I. 61211).

tures were used to inoculate volumes of 200 ml of MM containing 1% (w/v) of glucose and 200  $\text{mg l}^{-1}$  of CB in 500 ml Erlenmeyer flasks. The cultures were incubated aerobically at 25°C on a rotary shaker at 100 rpm for 10 days. At several time intervals 3 ml aliquots of fungal cultures were sampled and centrifuged at 15000 g for 15 min. The clear supernatant was analyzed spectrophotometrically to determine the residual concentration of CB and the pellets were dried at 105°C for 24 h to determine the biomass dry weight. All experiments were carried out in triplicate.

**Ligninolytic enzyme assays.** After decolorization of the culture medium of *Coprinus cinereus*, the medium was filtrated and centrifuged (15000 g for 30 min) in order to remove the fungal biomass. The supernatant was then concentrated 10 times by ultrafiltration (10 kDa MW cutoff). Activities of extracellular Mn-dependent peroxidase (MnP), Mn-independent peroxidase (P), lignin peroxidase (LiP) and laccase (L) in the concentrated supernatant were determined spectrophotometrically at 25°C by monitoring the absorbance increase at 469 nm for Mn-dependent peroxidase and Mn-independent peroxidase, at 310 nm for lignin peroxidase and at 420 nm for laccase in the reaction mixtures [21, 22]. Mn-dependent peroxidase activity was determined by oxidation of 1 mM 2,6-dimethoxyphenol in citrate buffer (25 mM, pH 4.5) in the presence of 0.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 1 mM  $\text{MnSO}_4$ . Mn-independent peroxidase activity was determined in the absence of Mn. Lignin peroxidase activity was determined with veratryl alcohol as substrate in the presence of 0.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The assay was performed in citrate buffer (25 mM, pH 4.5). Laccase activity was determined by oxidation of 0.5 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) in citrate buffer (25 mM, pH 4.5). The total volume of each reaction mixture was 1 ml. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyses the oxidation of 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per minute. All measurements were repeated three times.



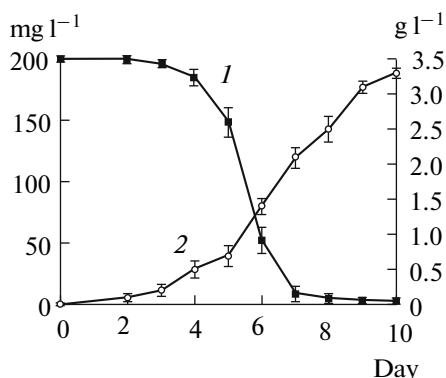


Fig. 2. Decolorization of CB (1, mg l<sup>-1</sup>) by *Coprinus cinereus* growing (2, biomass g l<sup>-1</sup>) in minimum medium (MM) containing 1% (w/v) of glucose and 200 mg l<sup>-1</sup> of the dye.

**Fungus immobilization methods. Entrapment in calcium alginate gel.** One hundred milliliters of sterile sodium alginate solution (2%, w/v) were mixed with 2 g (wet weight) of fungal biomass obtained by filtration of a stirred culture of *Coprinus cinereus* on PDB. The mixture was extruded through a needle (3.0 mm, i.d.) into 150 mM CaCl<sub>2</sub>, forming beads of 5.0 mm diameter. The beads were allowed to harden in the CaCl<sub>2</sub> solution at room temperature for 30 minutes, and were rinsed with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.0).

**Entrapment in polyacrylamide gel.** Two grams (wet weight) of fungal biomass were mixed with 78 ml of Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.0), 20 ml acrylamide-bisacrylamide solution (29.2–0.8%, w/v) and 1 ml ammonium persulfate solution (10%, w/v). The polymerization was initiated by adding 100 µl of N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine. The polyacrylamide gel was then divided into 5.0 mm cubes, which were rinsed with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.0).

**Decolorization of CB in fluidized bed bioreactor using free and immobilized fungus.** The fluidized bed bioreactors are composed with 500 ml conical flasks containing the immobilized fungus in different supports (calcium alginate and polyacrylamide) suspended in 200 ml of MM with 0.1% (w/v) of glucose and 200 mg l<sup>-1</sup> of CB (decolorization medium). The bioreactors were placed in a rotary shaker at 25°C and the fluidization is assured by stirring at a rate of 100 rpm. Decolorization rate was followed according to time in all bioreactors. The same bioreactor has been used for studying CB decolorization with free fungus; thus, 2 g (wet weight) of fungus obtained by filtration of stirred fungal culture on PDB was suspended in 200 ml of MM with 0.1% (w/v) of glucose and 200 mg l<sup>-1</sup> of CB. Decolorization rate was followed according to time in the bioreactor placed in the same conditions cited previously. For each experiment, a control test without fungus was carried out in the same conditions in order to evaluate the affinity of CB for used immobilization supports (calcium alginate and polyacrylamide).

At several time intervals, 1 ml aliquots were collected from bioreactors and centrifuged at 15000 g for 15 min. The supernatants were analyzed spectrophotometrically to determine the amount of CB.

**Effects of some physicochemical parameters on CB decolorization.** To evaluate the effects of operation and environmental factors on the efficiency of color removal, the batch decolorization experiments were carried out at different temperatures (20–55°C), pH values (3.0–9.0) and initial dye concentrations (50–1600 mg l<sup>-1</sup>). The above experiments were performed under stirring (100 rpm).

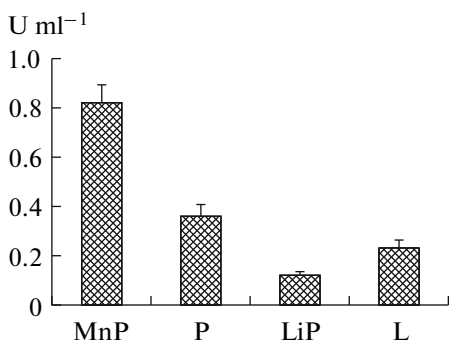
**Repeated-batch operations of decolorization with free and immobilized fungus.** The performances of fluidized bed bioreactors used continuously were evaluated by following the decolorization rates during 7 cycles. The immobilized fungal biomasses (in calcium alginate and in polyacrylamide) were placed into a decolorization medium containing 200 mg l<sup>-1</sup> of CB. The resulting solution (typically pH 7.0) was then incubated at 25°C under stirring (100 rpm) for decolorization. After complete color removal, the immobilized-fungus particles were collected, rinsed twice with sterile deionized water and transferred into a fresh decolorization medium for the second decolorization experiments. The same procedures were repeated 7 times. For comparison, the repeated batch experiments were also conducted using free fungal biomass under identical experimental procedures.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Isolation of CB decolorizing fungus.** Preliminary selection of CB decolorizing fungi was based on the decolorization of CB on MM plates. Four fungal isolates, which decolorized this anthraquinone dye (CB), were isolated from dye-contaminated sludge. Among these fungi, one fungal strain, which was identified as *Coprinus cinereus*, with higher CB decolorization potential in MM plates was selected for further study.

**Decolorization of CB by *Coprinus cinereus* growing in liquid medium.** The decolorization of CB during the cultivation of *Coprinus cinereus* in MM containing 1% (w/v) of glucose and 200 mg l<sup>-1</sup> of CB was investigated. The obtained results, presented in Fig. 2, indicated that this isolated fungal strain has a high ability to decolorize 200 mg l<sup>-1</sup> of CB. During the cultivation of *Coprinus cinereus*, the decolorization rate of CB was initially low. However, more than 95% of the coloration was removed between the 4<sup>th</sup> and the 7<sup>th</sup> day, at which time the fungal biomass began to grow intensively. Conversely, the uninoculated control presented no color removal.

**Ligninolytic enzyme activities.** Previous studies reported that the physical adsorption and the enzymatic degradation with the help of some lignin modifying enzymes (Mn-dependent peroxidase, Mn-independent peroxidase, lignin peroxidase and laccase) are major mechanisms involved in the decolorization of dyes by living fungi [20, 21]. In our case, it was observed that the fun-



**Fig. 3.** Enzymatic activities ( $\text{U ml}^{-1}$ ) of extracellular ligninolytic enzymes recorded in culture medium of *Coprinus cinereus*. MnP – Mn-dependent peroxidase; P – Mn-independent peroxidase; LiP – lignin peroxidase; L – laccase.

gal biomass remained clear during the whole cultivation process. This indicates that the physical adsorption of the anthraquinone dye on the fungal biomass was negligible. However, and as shown in Fig. 3, important activities of Mn-independent peroxidase ( $0.36 \pm 0.05 \text{ U ml}^{-1}$ ), lignin peroxidase ( $0.12 \pm 0.02 \text{ U ml}^{-1}$ ), laccase ( $0.23 \pm 0.04 \text{ U ml}^{-1}$ ) with major activity of Mn-dependent peroxidase ( $0.82 \pm 0.08 \text{ U ml}^{-1}$ ) was recorded in the culture medium of *Coprinus cinereus* at the end of the decolorization process. These results suggest that the decolorization of CB by *Coprinus cinereus* is essentially done by an enzymatic degradation mechanism.

**Decolorization of CB with free and immobilized fungus.** *Coprinus cinereus* was entrapped in both calcium alginate and polyacrylamide gels. The concentrations of CB were measured spectrophotometrically at various times for immobilized fungus, as well as for free fungus.

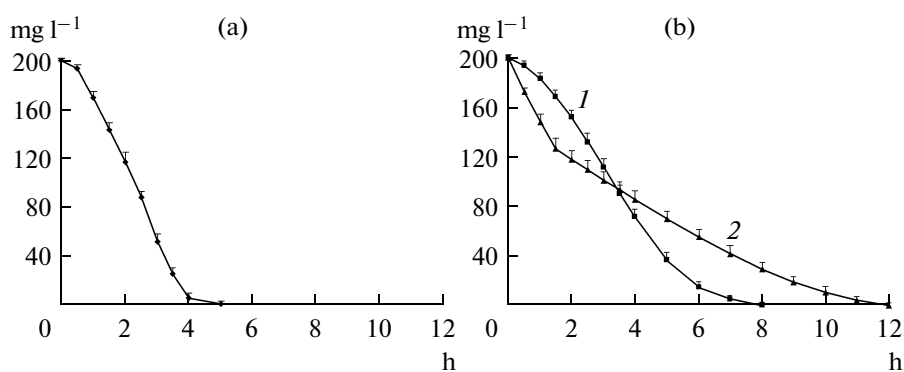
Figure 4 (a and b) demonstrate typical residual dye profiles for decolorization with free and immobilized fungus. The trends for free and calcium alginate-immobilized fungus were similar, as the dye concentration dropped almost linearly until decolorization was completed, while the profile for polyacrylamide-immobilized fungus exhibited an extra phase (indicated by different

slopes) during the early stage of decolorization. The different residual dye profile for polyacrylamide-immobilized fungus may correlate with CB adsorption capacities of this immobilization support (data not shown), since the early drop in the dye concentration (Fig. 4b) may be due to a matrix adsorption effect [35], while the second slope resulted from biotransformation by immobilized *Coprinus cinereus*. For calcium alginate-immobilized fungus, decolorization was primarily contributed by fungal decolorization, as the adsorption effect was less important.

The specific decolorization rate, determined from Fig. 4, was  $5.58$ ,  $3.84$  and  $1.46 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectively, for free fungus and immobilized fungus in calcium alginate and in polyacrylamide (Table 1). The lower decolorization rate for immobilized fungus compared to free fungus can be attributed to the mass transfer restriction arising from fungus entrapment.

From the two supports used for the immobilization of *Coprinus cinereus*, calcium alginate showed the greatest purifying performance with a specific decolorization rate of  $3.84 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and an equilibrium conversion of 99% (Table 1). All the more that the hydrodynamic behaviour and mechanical beads properties of calcium alginate make this polymer a matrix of choice for the utilisation in fluidised bed bioreactor [36, 37]. The immobilization of *Coprinus cinereus* in polyacrylamide gel allows a specific decolorization rate of about  $1.46 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Table 1). This limitation of the decolorization activity is probably due to the existence of an unfavourable microenvironment inside the gel matrix and the presence of residual monomer that leads to a toxicity of the fungal biomass [38].

**Effects of some physicochemical parameters on CB decolorization.** Over the range of 20 to  $45^\circ\text{C}$ , the specific decolorization rate of free and immobilized *Coprinus cinereus* increased as the temperature increased (Fig. 5a); the final conversion maintained above 98%. However, for free and immobilized fungus, decolorization operations at temperatures higher than  $45^\circ\text{C}$  led to a significant loss in viability of the fungus and a sharp decrease in the decolorization activity (Fig. 5a). Therefore, to ensure the stability for long-term operation, decolorization with

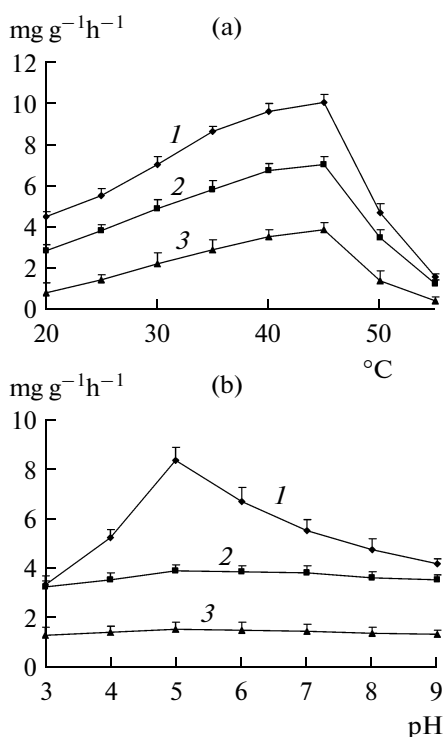


**Fig. 4.** Decolorization of CB by *Coprinus cinereus* in fluidized bed bioreactor; (a) free fungus; (b) immobilized fungus in both alginate (1) and polyacrylamide gels (2).

free and immobilized *Coprinus cinereus* should not be undertaken at temperature higher than 45°C.

Free fungus exhibited better decolorization rates at pH 5.0, as the specific decolorization rate enhanced two-fold for a pH decrease from 9.0 to 5.0 (Fig. 5b). In contrast to free fungus, decolorization with the immobilized fungus was less sensitive to pH with less than 16% deviation over the pH range of 3.0–9.0. This seems to suggest that the mass transfer barrier in the immobilized fungus may impede the transport of H<sup>+</sup> ions into the fungus embedded within the polymeric matrices, resulting in a less significant pH effect for the immobilized fungus. A similar effect has been shown for immobilized bacterial cells of *Pseudomonas luteola* [30].

Figure 6 shows the dependence of CB concentration on the decolorization rate for free and immobilized *Coprinus cinereus*. The kinetic trends were interpreted according to a conventional Michaelis-Menten model, but for immobilized fungus, especially in polyacrylamide gel, the model only represents the apparent rather than intrinsic kinetics, because of the mass transfer barrier and adsorption effect of the immobilization matrix. Although the adsorption effect played a role in the decolorization dynamics primarily during the early stage, enzymatic transformation by *Coprinus cinereus* would eventually dominate and lead to a complete color removal. The optimal kinetic parameters ( $V_{\max}$  and  $K_m$ ) were estimated from the experimental data shown in Fig. 6. The  $V_{\max}$  of



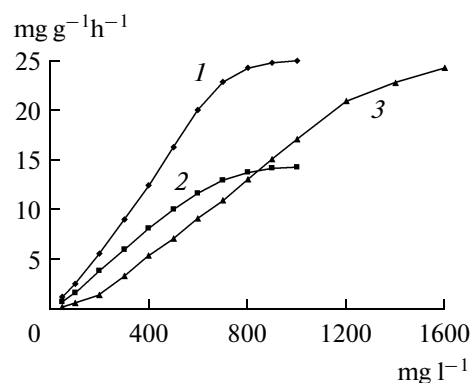
**Fig. 5.** Effect of temperature (a) and pH (b) on specific decolorization rate ( $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) of CB recorded by free (1) and immobilized *Coprinus cinereus* in both alginate (2) and polyacrylamide (3) gels.

**Table 1.** The specific decolorization rate of Cibacron Blue and the equilibrium conversion recorded by free and immobilized *Coprinus cinereus* in both alginate (Al) and polyacrylamide (Pa) gels

Variant	Specific decolorization rate, $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$	Equilibrium conversion, B, %
Free fungus	$5.58 \pm 0.32$	100
Al-immobilized fungus	$3.84 \pm 0.29$	99
Pa-immobilized fungus	$1.46 \pm 0.25$	98

free fungus was  $30.4 \text{ mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , similar to that for polyacrylamide-immobilized fungus ( $32.1 \text{ mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), but much higher than that for fungus immobilized in calcium alginate gel ( $16.8 \text{ mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). In contrast to  $V_{\max}$ ,  $K_m$  values varied less significantly for free and calcium alginate-immobilized fungus. The  $K_m$  values for free and calcium alginate-immobilized fungus were 374 and 367  $\text{mg l}^{-1}$ , respectively, while polyacrylamide-immobilized fungus had a much larger  $K_m$  value of 942  $\text{mg l}^{-1}$ , which seems to indicate a low affinity between the dye (CB) and polyacrylamide-immobilized fungus.

**Repeated-batch decolorization of CB.** Repeated-batch experiments were performed to examine the reusability of the free and immobilized *Coprinus cinereus* in dye decolorization. After 7 cycles, the specific decolorization rate of free and polyacrylamide-immobilized fungus dropped to below about 55 and 67%, respectively, while the specific decolorization rate remained over 98% for calcium alginate-immobilized fungus (Table 2). Thus, calcium alginate-immobilized fungus appeared to exhibit better reusability. Evaluation of  $t_{1/2}$  (the time required for 50% color removal) shows that  $t_{1/2}$  varied only slightly (2.60–2.65 h) for calcium alginate-immobilized fungus during 7 repeat-



**Fig. 6.** Effect of initial concentration of CB on specific decolorization rate ( $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) recorded by free (1) and immobilized *Coprinus cinereus* in both alginate (2) and polyacrylamide (3) gels.

**Table 2.** Comparison of relative specific decolorization rate ( $V_d$ ) and time required for 50% conversion ( $t_{1/2}$ ) recorded by free and immobilized *Coprinus cinereus* in alginate (Al) and in polyacrylamide (Pa) during repeated batch decolorization cycles

Cycle	Free fungus		Al-immobilized fungus		Pa-immobilized fungus	
	$V_d$ , %	$t_{1/2}$ , h	$V_d$ , %	$t_{1/2}$ , h	$V_d$ , %	$t_{1/2}$ , h
1	100	1.79	100	2.60	100	6.82
2	95	1.88	100	2.60	98	6.96
3	85	2.10	99	2.62	95	7.09
4	79	2.26	100	2.60	89	7.71
5	74	2.41	99	2.62	82	8.42
6	67	2.67	99	2.62	76	8.80
7	55	3.25	98	2.65	67	9.46

ed cycles (Table 2). This indicates that calcium alginate, used as an entrapment gel in a continuous fluidized bed bioreactor, offers a great stability of the fungal activity. This stability may be attributed to sweet polymerization conditions of the calcium alginate gel and direct role that plays the calcium in the cell conservation [39]. However, in the first run of experiments,  $t_{1/2}$  for free and polyacrylamide-immobilized fungus were 1.79 and 6.82 h, respectively (Table 2). After 7 runs, the  $t_{1/2}$  increases and reaches 3.25 and 9.46 h for free and polyacrylamide-immobilized fungus, respectively (Table 2).

\*\*\*

It has been shown that high-efficiency decolorization of water contaminated by the anthraquinone dye CB using immobilized *Coprinus cinereus* in a fluidized bed bioreactor is feasible. The obtained results show that this technology allows specific and reproducible decolorization of CB with high yield.

The specific decolorization rate obtained by the free fungus is superior to those obtained by immobilizing this fungus in calcium alginate or polyacrylamide gels. However, the entrapment of *Coprinus cinereus* in calcium alginate gel offers the greatest purifying performances as well as the biggest stability of the bioreactor. All the more, the hydrodynamic behaviour of the beads, in a fluidized bed bioreactor, is very satisfactory. The high specific decolorization rate obtained and the simplicity of the immobilization method mean that alginate would be a suitable immobilization matrix for using fungi to remove anthraquinone dyes from wastewater on an industrial scale.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Professor Yahia Koulali (University Hassan 1<sup>st</sup> of Settat, Morocco) for his assistance and helpful suggestions in the fungus identification.

#### REFERENCES

- Vaidya, A.A. and Datye, K.V., *Colourage*, 1982, vol. 14, pp. 3–10.
- Boer, C.G., Obici, L., Souza, C.G.M., and Piralta, R.M., *Bioresour. Technol.*, 2004, vol. 94, pp. 107–112.
- Anliker, A., *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1979, vol. 3, pp. 59–74.
- Chung, K.T. and Cerniglia, C.E., 1992, *Mutation Res.*, vol. 277 pp. 201–220.
- Ingamells, W., *Colour for Textiles – a User's Handbook*, London: Staples Printers Rochester Ltd, 1993.
- Zollinger, H., *Colour in Chemistry – Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*, New York: VCH Publications, 1991.
- Haff, L.A. and Easterday, R.L., *Cibacron Bblue-Sepharose: A Tool for General Affinity Chromatography*, Eckstein, F., and Sundaram, P.V., Eds, New York: Academic Press, 1978.
- Liu, Y.C. and Stellwagen, E., *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, pp. 583–588.
- McKay, G., Geundi, M.E., and Nassar, M.M., *Water Res.*, 1988, vol. 22, pp. 1527–1533.
- Vandevivere, P.C., Bianchi, R., and Verstraete, W., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1998, vol. 72, pp. 289–302.
- De Moraes, S.G., Freire, R.S., and Duran, N., *Chemosphere*, 2000, vol. 40, pp. 369–373.

12. Rafii, F. and Cerniglia, C.E., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, pp. 1731–1734.
13. Carliell, C.M., Barclay, S.J., Naidoo, N., Buckley, C.A., Mulholland, D.A., and Senior, E., *Water SA*, 1995, vol. 21, pp. 61–69.
14. Zissi, U. and Lyberatos, G., *Water Sci. Technol.*, 1996, vol. 34, pp. 495–500.
15. Sarnaik, S. and Kanekar, P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, vol. 52, pp. 251–254.
16. Chang, J.S. and Kuo, T.S., *Bioresour. Technol.*, 2000, vol. 75, pp. 107–111.
17. Walker, G.M. and Weatherley, L.R., *Environ. Pollution*, 2000, vol. 108, pp. 219–223.
18. Zimmermann, T., Kulla, H.G., and Leisinger, T., *Eur. J. Biochem.*, 1982, vol. 129, pp. 197–203.
19. Moutaouakkil, A., Zeroual, Y., Dzayri, F.Z., Talbi, M., Lee, K., and Blaghen, M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, vol. 413, pp. 139–146.
20. Fu, Y. and Viraraghavan, T., *Bioresour. Technol.*, 2001, vol. 79, pp. 251–262.
21. Shah, V. and Nerud, F., *Can. J. Microbiol.*, 2002, vol. 48, pp. 857–870.
22. Wesenberg, D., Kyriakides, I., and Agathos, S.N., *Biotechnol. Adv.*, 2003, vol. 22, pp. 161–187.
23. Maximo, C., Pessao-Amorim, M.T., and Costa-Ferreira, M., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2003, vol. 32, pp. 145–151.
24. Selvam, K., Swaminathan, K., and Chae, K.S., *Bioresour. Technol.*, 2003, vol. 88, pp. 115–119.
25. Knapp, J.S., Zhang, F., and Tapley, N.K., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1997, vol. 69, pp. 289–296.
26. Chibata, I. and Tosa, T., *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1981, vol. 10, pp. 197–216.
27. Hyde, F.W., Hunt, G.R., and Errede, L.A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, pp. 219–222.
28. Zeroual, Y., Moutaouakkil, A., and Blaghen, M., *Curr. Microbiol.*, 2001, vol. 43, pp. 322–327.
29. Monsan, P., Les méthodes d'immobilisation d'enzymes, Durand, G., and Monsan, P., Eds, Paris: Gauthier-Villards, 1982.
30. Chang, J.S., Chou, C., and Chen, S.Y., *Process Biochem.*, 2001, vol. 36, pp. 757–763.
31. Moutaouakkil, A., Zeroual, Y., Dzayri, F.Z., Talbi, M., Lee, K., and Blaghen, M., *Curr. Microbiol.*, 2004, vol. 48, pp. 124–129.
32. Riddell, R.W., *Mycologia*, 1950, vol. 42, pp. 265–270.
33. De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., and Figueras, M.J., *Atlas of Clinical Fungi*, 2<sup>nd</sup> Ed., Utrecht/Reus: Centraalbureau Voor Schimmelcultures / Univeesitat Rovira I Virgili, 2000.
34. Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.H., *Compendium of Soil Fungi*, London: Academic Press, 1980.
35. Philips, C.R. and Poon, Y.V., *Immobilization of Cells*, New York: Springer-Verlag, 1988.
36. Smidsrod, O. and Skjak, B.G., *Trends Biotechnol.*, 1990, vol. 8, pp. 71–78.
37. Badalo, A., Gomez, E., Gomez, J.L., Bastida, J., Maximo, M.F., and Diaz, F., *Process Biochem.*, 1991, vol. 26, pp. 349–353.
38. Mosbach, K. and Mosbach, R., *Acta Chem. Scand.*, 1966, vol. 20, pp. 2807–2810.
39. Tamponnet, C., Matsumara, M., and Veliky, I.A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, pp. 211–217.

УДК 577.152.193;199

## УЧАСТИЕ ЛАККАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ ГРИБА *Lentinus (Panus) tigrinus* В БИОДЕГРАДАЦИИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФЕНОЛА В ЖИДКИХ СРЕДАХ

© 2011 г. Д. А. Кадималиев, В. В. Ревин, Н. А. Атыкян, О. С. Надежина, А. А. Паршин

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, 430005

e-mail: cadimded@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.11.2009 г.

Исследована возможность использования гриба *Lentinus tigrinus* штамм ВКМ F-3616D для биодеградации высоких (до 5%) концентраций фенола в жидких средах, участие ферментов лакказы и пероксидазы в этом процессе. Показано, что гриб *L. tigrinus* способен эффективно разрушать фенол, при этом биомасса легко удалялась из жидкости. Снижение концентрации фенола сопровождалось повышением уровня секреции и активности лакказы на начальных, а пероксидазы на более поздних этапах биодеградации. Для эффективной биодеградации фенола необходима секреция этих ферментов в определенных соотношениях и последовательности. Предложен эффективный способ снижения концентрации фенола в сточных водах коптильных цехов мясоперерабатывающих комплексов с использованием гриба *L. tigrinus*.

С развитием промышленности и сельского хозяйства в биосферу поступает все большее количество различных ксенобиотиков, загрязняющих окружающую среду. В настоящее время нагрузка на естественные процессы самоочищения биосферы является избыточной. Параллельно с деструкцией идет постепенное накопление и преобразование еще более токсичных соединений.

Фенольные соединения относятся к числу наиболее распространенных поллютантов водных экосистем и представляют опасность для здоровья человека и животных. По встречаемости в биосфере и экологической опасности они занимают третье место после тяжелых металлов и нефтепродуктов и являются основными токсичными компонентами сточных вод ряда промышленных производств. В стоках пищевых предприятий, например коптильных цехов мясоперерабатывающих комплексов, содержание фенолов может достигать до 3%. Такие стоки, попадая на биологические очистные сооружения, приводят к угнетению и впоследствии гибели микроорганизмов активного ила и, как следствие, попадают в окружающую среду [1–3].

Перспективным в детоксикации фенольных соединений может быть использование грибов “белой гнили”. Эти грибы обладают мощным потенциалом деструкции ароматических соединений, в основе которого лежит их способность разлагать природный фенольный полимер – лигнин за счет экзоферментов литического комплекса [1, 4, 5].

В этом отношении перспективен лигнолитический гриб *Lentinus (Panus) tigrinus* штамм ВКМ F-3616D, обладающий высокой лигнолитической активностью [6–8] за счет способности производи-

ровать нетипичную “желтую” лакказу (КФ 1.10.3.2) и секреторную пероксидазу растительного типа (КФ 1.11.1.7) [9–11]. Использование данного микроорганизма и его экзоферментов перспективно для разработки эффективных процессов утилизации широкого спектра токсичных фенольных соединений.

Цель работы – исследование возможности культивирования гриба *L. tigrinus* на средах с высокими концентрациями фенола и роли внеклеточного лигнолитического ферментного комплекса (ВЛФК) в процессе его биодеградации.

### МЕТОДИКА

Гриб *Lentinus (Panus) tigrinus* (пилолистник тигровый) был выделен на кафедре биотехнологии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева из сухих плодовых тел гриба, растущего на березовом валежнике в окрестностях г. Саранска, и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов как штамм ВКМ F-3616 D.

Гриб поддерживали на сусло-агаре. Кусочек выросшего грибом агара вносили в конические колбы Эрленмейера объемом 500 мл со 100 мл среды Чапека–Докса, содержащей дополнительно 15 г/л лигносульфоната, и выращивали инокулят в течение 4 сут на качалках (235 об/мин) при 26°C. В опытных вариантах культивирование осуществлялось на модифицированной среде Эггерта [12] с глюкозой (0.5%) и березовыми опилками (20 г/л). Для засева использовали 5% (об.) 4-суточного инокулята. Культуру гриба выращивали глубинным способом при перемешивании (235 об/мин, 26°C, колбы Эрлен-

мейера 500 мл, 100 мл среды) в течение 6 и 9 сут с добавлением фенола в концентрации 1 и 5%. Фенол добавляли на 3 (трофофаза) и 6 сут (идиофаза) роста культуры.

В экспериментах по изучению возможности практического использования гриба *L. tigrinus* для биодegradации высоких концентраций фенола и его производных выращивание культуры гриба *L. tigrinus* проводили на стоках коптильного цеха мясоперерабатывающего комплекса (смывы, образующие в результате мойки коптильных камер и конденсат коптильного дыма). В ферментер ("ОКА-М1", Россия) объемом 1 л помещали 0.5 л стоков без разбавления после доведения pH до 6.0.

Активность лакказы определяли по окислению пирокатехина [13] с коэффициентом поглощения  $740 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , а пероксидазы — по окислению о-дианизидина [14],  $30000 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . Начальную скорость реакции измеряли на спектрофотометре СФ-46 ("ЛОМО", Россия). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее окисление 1 мкмоль субстрата в течение 1 мин в оптимальных условиях. Удельную активность рассчитывали как ед./мг белка.

Содержание белка определяли по методу Бредфорд [15], количество биомассы — гравиметрически. Содержание фенола контролировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Милихром 4 (Россия) [16] и на фотоэлектроколориметре КФК-2 (Россия) по реакции с 4-аминоантипирином [17].

Для определения содержания фенолов на хроматографе Милихром 4 использовали метод абсолютной градуировки. Градуировку и проведение определений производили в идентичных условиях в автоматическом режиме работы хроматографа. Перед началом градуировки и анализа промывали колонку, пропуская 1000 мкл элюента при скорости 100 мкл/мин до установления постоянного значения оптической плотности при длине волны 280 нм.

Для выполнения градуировки и измерений в автоматическом режиме в соответствии с "Программой регистрации и обработки информации" устанавливались следующие параметры: объем ступени — 1500 мкл, объем элюента в режиме "регенерация" — 100 мкл, в режиме "буфер" — 6 мкл, расход элюента — 100 мкл/мин, скорость набора — 999 мкл/мин, длина волны — 280 нм, масштаб регистрации — 0.5 е.о.п., время измерения — 0.4 с; идентификацию пиков на хроматограммах проводили по времени удерживания компонентов.

Для определения содержания фенолов на КФК-2 (Россия) по реакции с 4-аминоантипирином в перегонную колбу на 500 мл наливали культуральную жидкость в таком количестве (мл), чтобы предел обнаружения совпадал с чувствительностью метода. К пробе добавляли воды до 90 мл, 1 мл 10%-ного рас-

твора  $\text{CuSO}_4$  и 1 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , и помещали в перегонный аппарат. Кончик холодильника Либиха погружали в 10 мл 0.05 н. раствора  $\text{NaOH}$ , pH отгона должен быть не более 9.0, и отгоняли около 90 мл.

Перегонную жидкость выливали в мерную колбу на 100 мл с притертой пробкой. В колбу добавляли 1 мл 10%-ного  $\text{CuSO}_4$ , 1 мл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2.5 мл буферного раствора, pH 10.0, 1 мл 2%-ного 4-аминоантипирина и 3.5 мл 20%-ного персульфата аммония, доводили объем до 100 мл водой и через 5 мин измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм в кюветах на 5 см. Содержание фенолов рассчитывали по калибровочному графику, для построения которого в 6 мерных колб на 100 мл вносили 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 мл 0.01 мг/мл рабочего стандартного раствора фенола, далее вносили реактивы, как описано выше. Для контрольной пробы брали 75 мл воды, 1 мл 10%-ного  $\text{CuSO}_4$ , 1 мл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2.5 мл 2%-ного 4-аминоантипирина и 3.5 мл 20%-ного персульфата аммония, доводили водой объем до 100 мл. К дистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$  прибавляли 0.1 н.  $\text{NaOH}$  до  $\geq \text{pH } 10.0$  и  $\text{KMnO}_4$  до краснофиолетовой окраски и перегоняли.

Все результаты, полученные не менее чем в 5 параллельных опытах, статистически обрабатывали с использованием ЭВМ и программы Microsoft Excel 2000. Линейную аппроксимацию данных проводили с использованием пакета статистической обработки результатов приложения Microsoft Excel 2000.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рост культуры гриба *L. tigrinus* в условиях глубинного культивирования в контрольной среде и на средах с высокими концентрациями фенола в основном наблюдался в виде pellets различного размера, быстро оседающих после прекращения перемешивания. Это особенно важно для последующей разработки биотехнологического процесса очистки жидких токсичных стоков, главным условием которого является быстрое окисление поллютантов и эффективное отделение биомассы активного ила в процессе осветления сточной воды.

В ходе исследования было выявлено, что добавление фенола в среду для культивирования после 3 сут роста в концентрации до 5% не только не вызвало угнетения роста культуры гриба *L. tigrinus*, но и стимулировало метаболические процессы, что нашло отражение в значительном приросте биомассы по сравнению с контрольным вариантом (рис. 1). Вероятно, накопление биомассы при добавлении фенола связано со способностью гриба *L. tigrinus* (так же, как и других грибов белой гнили) использовать ароматические соединения в качестве дополнительного источника углерода и энергии при кометаболлизме легко утилизируемых субстратов (глюкоза,



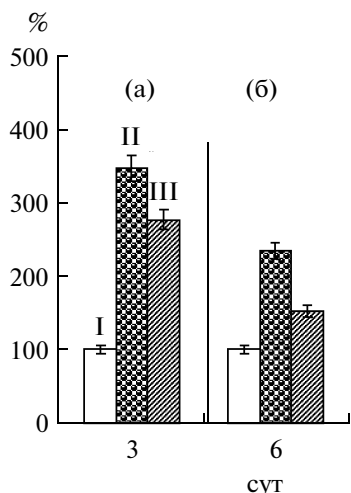


Рис. 1. Влияние фенола на накопление биомассы (%) на 9 сут культивирования гриба *L. tigrinus* при его добавлении на 3 (а) и 6 (б) сут: I – контроль; II – 1%, III – 5% фенола.

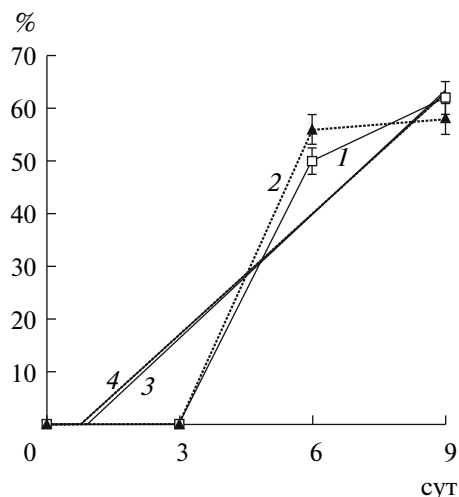


Рис. 2. Убыль фенола (% к исходному содержанию) в культуре гриба *L. tigrinus* при его добавлении на 3 сут: 1 – 1%, 2 – 5% фенола, 3 –  $y_1 = 23.6x - 31$ ; 4 –  $y_2 = 23x - 29$ .

ксилоза, целлюлоза и др., в нашем эксперименте – 0.5% глюкозы) [18].

Наряду с активными ростовыми процессами наблюдалось и снижение концентрации растворенного фенола в питательной среде, при этом интенсивность процесса зависела от начальной концентрации и времени его внесения. При добавлении фенола в трофофазу уже к 6 сут убыль растворенного фенола составила 50 и 56% от исходного количества в вариантах с 1- и 5%-ной концентрацией соответственно. Дальнейшее культивирование выявило более интенсивную убыль фенола в варианте с 1% по сравнению с 5% – 62 и 58% к исходному содержанию соответственно (рис. 2).

Внесение фенола в среду, когда процесс роста завершен (идиофаза), и в среде накоплено значительное количество окислительных ферментов, приводило к усилению процессов деградации, в результате чего к концу культивирования его убыль достигала 70%. Интегрирование кривых убыли фенола позволило судить о близких скоростях его деградации и(или) преобразования в диапазоне 1–5%, при этом с возрастанием концентрации требовалось более позднее введение в среду – на стадии активного синтеза ВЛФК, когда основные ростовые процессы завершены.

Для установления роли ферментов в деградации фенола исследовали также динамику синтеза и секреции отдельных ферментов ВЛФК гриба в присутствии субстрата.

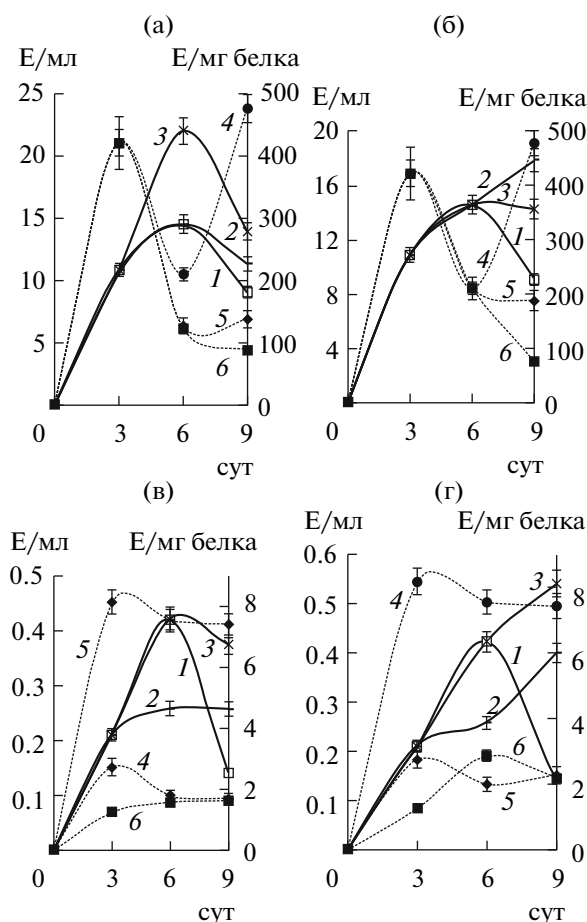
Проведенные исследования показали, что фенол в концентрации 1%, добавленный в трофофазу, не увеличивал активность лигнолитических ферментов. Повышение концентрации фенола до 5% оказывало стимулирующее воздействие на синтез ферментов, в

первую очередь, регистрировалось увеличение лакказной активности. На 6 сут роста она в 1.5 раза превышала контрольное значение, рис. 3.

Известно, что лакказы катализируют восстановление  $O_2$  до  $H_2O$  и одноэлектронное окисление органических субстратов, преимущественно фенольных соединений в соответствующие феноксирадикалы [19, 20]. Эти радикалы (они не стабильны), в свою очередь, вступают в реакцию полимеризации с образованием высокомолекулярных продуктов, что ведет к удалению низкомолекулярных (как правило, более токсичных) соединений из среды. В связи с этим и наблюдаемое нами на первом этапе преобладание лакказы в ВЛФК, вероятно, связано с ее ролью в снижении фенольного барьера для гриба путем образования полимерных продуктов. На возможность такого механизма указывают и данные литературы. Так, например, показано, что очищенная лакказа из гриба *Coriolus zonatus* при окислении феруловой и синапиновой кислот образует димеры. [21]. Другой механизм повышения уровня синтеза лакказы может быть связан со стимулированием окисления фенолом или его производными. В работе [22] показано использование 2,4-диметилфенола в качестве ароматического индуктора и внесение его в среду вместе с 2 мМ  $CuSO_4$  на 4 сут культивирования увеличивало выход лакказы в 10 раз.

Максимум пероксидазной активности (в 3 раза выше, чем в контроле) наблюдался позднее, на 9 сут роста, что, вероятно, было связано с началом активного окисления образовавшихся на первом этапе олигофенолов и фенола путем инициирования свободнорадикальных процессов с участием пероксида водорода и пероксидных радикалов (рис. 3б). В результате последовательно образуются хиноны, затем гидроксихиноны, после чего происходит раз-





**Рис. 3.** Изменение лакказной (а, в) и пероксидазной (б, г) активности гриба *L. tigrinus* при добавлении фенола на 3 (а, б) и 6 (в, г) сут: активность: 1 – контроль, 2 – 1%, 3 – 5% фенола; удельная активность: 4 – контроль, 5 – 1%, 6 – 5% фенола.

рыв ароматического кольца с образованием соответствующих кислот (например, из пирокатехина образуется муконовая кислота [23]), которая затем вовлекается в окисление до  $\text{CO}_2$  через цикл трикарбоновых кислот. Таким образом, образовавшийся на первом этапе под действием лакказы полимерный продукт на втором этапе под действием пероксидазы и феноксирадикалов (соответственно, ферментативный и неферментативный пути окисления [24]) окисляется до продуктов, вступающих в один из циклов метаболизма с образованием источников дополнительной энергии.

Изучение удельной активности ферментов лакказы и пероксидазы не выявило увеличения их доли в сумме внеклеточных белков. До 6 сут роста удельная активность была такой же, как в контрольном варианте, а потом резко снижалась. В этот же период отмечено выделение большого количества белка, вероятно, в результате лизиса биомассы, так и усиления секреторных процессов – выделения ферментов (не только ВЛФК, но и др.) в среду.

Внесение фенола в идиофазу (фаза синтеза вторичных метаболитов, в том числе и лигнолитических ферментов) в концентрации 1 и 5% приводило к увеличению общей лакказной активности на 97 и 57% соответственно по сравнению с контролем. В среде с концентрацией фенола 1% лакказная активность была на 25% выше, чем при добавлении 5% фенола, т.е. увеличение концентрации фенола и более позднее его внесение все же ингибировало синтез лакказы, что обусловлено угнетением роста культуры гриба (рис. 1). Удельная лакказная активность в этом варианте была в 2.4 раза выше, но ниже, чем в контроле (рис. 3). Однако пероксидазная активность значительно увеличивалась на 9 сут роста, почти в 1.5 и 4 раза по сравнению со средой с 1% фенола и контролем соответственно. Наблюдаемое явление можно объяснить тем, что при добавлении фенола в трофофазу (стадия первичного метаболизма, когда уровень ВЛФК очень низок) происходит детоксикация за счет лакказы (для окисления используется кислород), а пероксидаза присоединяется позже, когда в среде накапливаются радикалы, образующиеся при окислении ароматических соединений и пероксида водорода. Добавление фенола в идиофазу интенсифицировало его деградацию, т.к. на этом этапе уже накоплены ферменты ВЛФК, а кроме того фенол дополнительно индуцировал их синтез и, в первую очередь пероксидазы. Уровень удельной пероксидазной активности был приблизительно такой же, как и при добавлении фенола в трофофазу (рис. 3).

Таким образом, в присутствии фенола в среде наблюдалось не только изменение лакказной и пероксидазной активности гриба, но и их соотношение, а также время выхода в среду. Причем характер изменений зависит как от концентрации фенола, так и от фазы роста культуры в момент его внесения в среду. С учетом изменения активности ферментов мы предположили, что лакказа играет в этом процессе ведущую роль, вызывая на первом этапе полимеризацию избыточного фенола, тем самым существенно снижая фенольный барьер, а уже на втором этапе инициирует окисление олигофенолов по обычному свободнорадикальному механизму. При этом пероксидаза, наряду с окислением фенола участвует в деградации образующихся под действием лакказы олигофенолов, а также является дополнительным ферментом, инициирующим запуск их радикального окисления.

Имеются сообщения о практическом применении грибов белой гнили и (или) их ферментов для биodeградации фенольных соединений в различных объектах, например в сточных водах ЦБК [19], в гидролизатах растительного сырья [20], в стоках и почве, содержащих галогенированные производные фенола, например пестициды [18], для биodeградации гидролизного лигнина [25] и др.

Показатели качества стоков коптильного цеха мясокомбината, обработанных грибом *L. tigrinus*

Показатель	Смыв			Конденсат		
	до засева	3 сут	6 сут	до засева	3 сут	6 сут
Биомасса, г/л	—	30.0 ± 1.5	35.0 ± 1.7	—	25.0 ± 1.2	28.0 ± 1.4
Содержание фенола, мг/мл	30.0 ± 1.5	18.0 ± 0.9	1.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Убыль фенола, %	—	40.0 ± 2.0	96.0 ± 4.5	—	30.0 ± 1.5	90.0 ± 4.5

В настоящее время для утилизации фенольных соединений используют следующие методы — экстракцию растворителями, адсорбцию на активированном угле, электрохимическое окисление. Несмотря на большое число существующих физико-химических методов деструкции фенолов, практически все они имеют ряд ограничений в своем применении. Для них характерны такие недостатки, как высокая стоимость, низкая эффективность, образование побочных, а иногда даже более токсичных продуктов. Микробиологические способы очистки воды от фенолов имеют преимущества перед физико-химическими методами. Микробиологическая очистка экономична, не требует больших капитальных и эксплуатационных затрат, локальные очистные установки занимают незначительные площади, просты и надежны в обслуживании. В связи с этим использование микроорганизмов и выделяемых ими ферментов раскрывает перспективы более эффективной утилизации широкого спектра фенольных соединений [26, 27].

Несмотря на преимущества микробиологических методов деструкции фенолов, они имеют существенный недостаток. Известно, что в биологических установках присутствует активный ил — мультикомпонентный микробный комплекс, однако он обладает низкой деструктивной активностью в отношении многих токсичных веществ, в том числе соединений фенольного ряда. Более того, ранее изученные микроорганизмы способны к биодegradации фенольных соединений в концентрациях значительно более низких по сравнению с теми, которые содержатся в промышленных сточных водах — от 0.05 до 0.5 г/л [28] и даже 2 г/л [29]. Такие стоки, попадая на биологические очистные сооружения, приводят к гибели микроорганизмов активного ила [3].

Перспективным является использование гриба *L. tigrinus*, способного (как нами было показано выше) расти и развиваться на жидких средах, содержащих до 5% фенолов. Дополнительная обработка стоков культурой гриба *L. tigrinus* позволит обеспечить эффективную очистку воды от фенолов. В связи с этим для проверки возможного использования процесса детоксикации в производственных целях мы исследовали биодegradацию фенола в стоках коптильных цехов мясоперерабатывающих предприятий при помощи отмытой биомассы *L. tigrinus*, отобранной в период максимальной активности.

Культура гриба *L. tigrinus* активно росла на стоках коптильного цеха мясокомбината, о чем свидетельствовали увеличение содержания биомассы, наблюдаемое при росте как на смывах, так и на конденсате (таблица). Вероятно, это можно объяснить тем, что смывы, кроме фенола, содержали питательные вещества, благоприятно влияющие на рост гриба.

Данные по утилизации фенола в смыве и конденсате указывают на высокую эффективность практического применения культуры гриба *L. tigrinus*, при выращивании которой в ферментере на установке “ОКА-М1” к 6 сут роста наблюдалась почти полная утилизация фенола. Его убыль при исходной концентрации 0.3% (в конденсате) составила около 90%, а при 3% (в смывах) более 90%.

Таким образом, гриб белой гнили *L. tigrinus* обладал высоким деструктивным потенциалом по отношению к фенолу, в том числе содержащемуся в стоках коптильных цехов мясокомбинатов, и может быть использован в практических целях для очистки промышленных сточных вод.

Работа выполнена при поддержке программы “Развитие научного потенциала высшей школы 2006–2008” РНП.2.1.17708.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Васильченко Л.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 1. С. 5–23.
2. Каретникова Е.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 1. С. 55–58.
3. Смирнов В.Н., Рябкина М.В., Винаров А.Ю. // Биотехнология. 2002. № 3. С. 67–79.
4. Горбатова О.Н., Королева О.В., Ландесман Е.О., Степанова Е.В., Жердев А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 4. С. 468–474.
5. Leontievsky A.A., Myasoedova N.M., Baskunov B.P., Evans C.S., Golovleva L.A. // Biodegradation. 2000. V. 11. № 5. P. 331–340.
6. Головлева Л.А., Леонтьевский А.А. // Микробиология. 1998. Т. 67. № 5. С. 581–587.
7. Ревин В.В., Кадималиев Д.А., Шутова В.В., Самуилов В.Д. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 5. С. 450–454.
8. Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Атыкян Н.А., Самуилов В.Д. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 5. С. 555–560.

9. *Pozdnyakova N.N., Leontievsky A.A., Golovleva L.A.* // FEBS Lett. 1994. V. 350. № 2–3. P. 192–194.
10. *Ревин В.В., Кадималиев Д.А., Атыкян Н.А., Ситкин Б.В., Самуилов В.Д.* // Биохимия. 2000. Т. 65. № 11. С. 1546–1550.
11. *Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Атыкян Н.А., Самуилов В.Д.* // Биохимия. 2005. Т. 70. № 6. С. 850–854.
12. *Eggert C., Temp U., Eriksson L.K-E.* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 4. P. 1151–1158.
13. *Синицын А.П., Черноглазов В.П., Гусаков А.В.* // Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Итоги науки и техники. Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 25. С. 80–93.
14. *Ugarova N.N., Rozhkova G.D., Berezin I.V.* // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 570. № 4. P. 31–43.
15. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
16. *Сычев С.Н., Сычев Н.С., Гаврилина В.А.* Высокоэффективная жидкостная хроматография на микроколоночных хроматографах серии “Милихром”: Монография. Орел: Орел ГТУ, 2002. 134 с.
17. *Новиков Ю.В., Ласточкина К.О., Болдина З.Н.* Методы исследования качества воды водоемов. М.: Медицина, 1990. 400 с.
18. *Gold M.H., Alic M.* // Microbiological Reviews. 1993. V. 57. № 3. P. 605–622.
19. *Jonsson L.J., Palmqvist E., Nilvebrant N.-O., Hahn-Hagerdal B.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 49. P. 691–697.
20. *Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N.-O., Jonsson L.J.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 1999. V. 77. № 1–3. P. 91–103.
21. *Смирнов С.А., Королева О.В., Гаврилова В.П., Белова А.Б., Клячко Н.Л.* // Биохимия. 2001. Т. 66. № 7. С. 952–958.
22. *Черных А.М., Леонтьевский А.А., Головлева Л.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 578–581
23. *Leatham G.F., Crawford R.L., Kirk T.K.* // Appl. Environ. Microbiol. 1983. V. 46. № 1. P. 191–197.
24. *Cullen D., Kersten P.J.* // The Mycota. III. Biochemistry and Molecular Biology / Bramble R., Marzluf G.A. (eds.). Berlin: Springer-Verlag, 1996. P. 297–314.
25. *Мясоедова Н.М., Леонтьевский А.А., Головлева Л.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 31. № 5. С. 505–509.
26. *Самсонова А.С., Алещенкова З.М., Ли Е., Лим Б.-Р., Хван С.В., Семочкина Н.Ф., Пинчук Л.С., Макаревич А.В., Кравицов А.Г.* // Биотехнология. 2003. № 4. С. 83–87.
27. *Братковская И., Виджюнайте Р., Кулис Ю.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 9. С. 1213–1222.
28. *Jiang H.-L., Tay J.-H., Maszenan A.M., Tay S.T.-L.* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 11. P. 6767–6775.
29. Патент РФ. № 2201446. 2003.

## The Role of Laccase and Peroxidase of *Lentinus (Panus) tigrinus* Fungus in Biodegradation of High Phenol Concentrations in Liquid Medium

D. A. Kadimaliev, V. V. Revin, N. A. Atykyan, O. S. Nadezhina, and A. A. Parshin

*Ogarev Mordovian State University, Saransk, 430005 Russia*

*e-mail: cadimded@yandex.ru.*

Received November 24, 2009

**Abstract**—The possibility of the usage of *Lentinus tigrinus* fungus strain VKM F-3616D for biodegradation of high (up to 5%) phenol concentrations in liquid medium and the involvement of laccase and peroxidase in this process have been studied. *L. tigrinus* fungus was demonstrated to effectively degrade phenol with easy biomass separation from the liquid. Decrease in phenol concentration was accompanied by increased secretion level and laccase activity at the preliminary stages of biodegradation, while that of peroxidase was at the latest stages of biodegradation. These enzyme secretions in distinct ratios and consequences are necessary for effective phenol biodegradation. An effective approach for phenol concentration decrease in the waste water of smoking shops in meat-processing factories using *L. tigrinus* fungus was described.

УДК 619.611.573.616:092.632.636.578

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АЛЬТЕРНАРИОЛА ДЛЯ ОЦЕНКИ РИСКА КОНТАМИНАЦИИ АГРОПРОДУКЦИИ

© 2011 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 03.11.2009 г.

На основе поликлональных кроличьих антител к конъюгату альтернариола и бычьего сывороточного альбумина, синтезированному в реакции формальдегидной конденсации, впервые разработана высоко-специфичная тест-система для непрямого конкурентного иммуноферментного анализа, обеспечивающая чувствительность определения альтернариола 0.4 нг/мл. Показана возможность применения анализа для оценки степени загрязненности альтернариолом зерна, кормовых рационов животных и сырья, используемого для их приготовления.

Для определения альтернариола (АОЛ, 3,4',5-тригидрокси-6'-метилдибензо- $\alpha$ -пирона), представителя обширной группы токсичных метаболитов грибов рода *Alternaria* [1, 2], в пищевых продуктах и кормах описаны различные приемы хроматографического анализа [3–5]. В последние годы для контроля безопасности этих объектов массового потребления все чаще используют иммунохимические методы, в частности, иммуноферментный анализ (ИФА). Так, американскими исследователями разработан иммуноанализ группы алициклических метаболитов *Alternaria* – ААЛ-токсинов [6], который далее был успешно применен для токсикологической оценки грубых, силосованных и смешанных зерновых кормов [7].

Цель работы – разработка непрямого ИФА для определения частоты и уровня встречаемости АОЛ в продукции зерно- и кормопроизводства.

### МЕТОДИКА

Использовали АОЛ и метиловый эфир АОЛ фирмы “Sigma” (США), предоставленные отделом клеточных технологий Научно-исследовательского центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, формальдегид, диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы “Fluka” (Германия), бычий сывороточный альбумин (БСА), яичный альбумин (ЯА) и желатин (Жел) отечественного производства. Антивидовой ферментный конъюгат получали по методу [8] из пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7) и антисыворотки осли к иммуноглобулинам кролика. ИФА выполняли на высокосвязывающих полистирольных планшетах (# 9018, “Costar”, США), для измерений использовали фотометр АКИ-Ц-01 (Россия).

УФ-спектры записывали на приборе Hitachi-557 (Япония).

Синтез белковых конъюгатов АОЛ осуществляли методом формальдегидной конденсации с соблюдением общей процедуры, изложенной в [9]. Для получения БСА-АОЛ (10), т.е. с 10-кратным мольным избытком АОЛ, а также БСА-АОЛ (30) и БСА-АОЛ (110), к растворам, содержащим по 7 мг БСА (0.1 мкмоль) в 1.0 мл воды, добавляли по 0.5 мл ДМФА и 5, 15 и 56 мкл раствора АОЛ в ДМСО с концентрацией 50 мг/мл. Для получения Жел-АОЛ (10) и ЯА-АОЛ (10) к растворам, содержащим по 4 мг ЯА (0.1 мкмоль) и 8 мг Жел (0.05 мкмоль) в 1.0 мл воды, добавляли по 0.5 мл ДМФА и 5 и 2.5 мкл раствора АОЛ в ДМСО с концентрацией 50 мг/мл. Далее к каждой смеси добавляли по 300 мкл 37%-ного формальдегида (3690 мкмоль) и после 24 ч перемешивания при 30°C реакционные смеси диализовали против трех смен 1000-кратного объема 0.5%-ного раствора хлористого натрия. К диализатам добавляли равный объем глицерина и хранили при минус 10–15°C. Для записи УФ-спектров использовали водные растворы конъюгатов с концентрацией 100 мкг/мл.

Иммунизацию кроликов-самцов серой масти (2–3 кг) проводили конъюгатом БСА-АОЛ (110). В первую инъекцию животные получали 100 мкг иммуногена в полном адьюванте Фрейнда подкожно в 10–15 точек области спины, во вторую и во все последующие – по 100 мкг в физиологическом растворе. Через 7 сут после каждой повторной инъекции, осуществляемой с месячным интервалом, у животных из краевой вены уха отбирали кровь, отделяли сыворотку, добавляли равный объем глицерина и хранили при минус 10–15°C. Тестирование сывороток проводили неконкурентным ИФА при концентрациях реагентов, обеспечивающих интенсивность аналитического сигнала (оптическую плот-

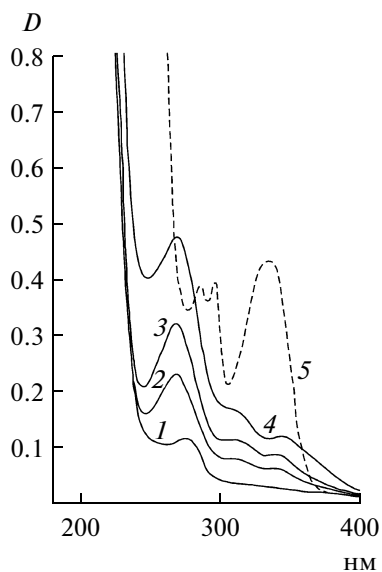


Рис. 1. Спектры УФ-поглощения: 1 – БСА, 2 – БСА-АОЛ (10), 3 – БСА-АОЛ (30), 4 – БСА-АОЛ (110), 5 – АОЛ.

ность) от 0.8 до 1.2. Для выполнения анализа ячейки планшетов заполняли 0.2 мл растворов конъюгатов, предназначенных для иммобилизации, в 0.05 М карбонат-бикарбонатном буфере pH 9.5 с концентрацией 0.05 мкг/мл и инкубировали 16 ч при 4°C. Затем ячейки отмывали 4–5 раз 0.15 М фосфатно-солевым буфером, pH 7.5, содержащим твин 20 (ФСБ-т), и в ячейки вносили по 0.1 мл растворов антител и аналита в этом же буфере. Через 1 ч инкубации ячейки вновь отмывали и заполняли 0.2 мл рабочего раствора ферментного конъюгата. После 1 ч инкубации и отмывки вносили по 0.2 мл субстратного раствора, содержащего 0.4 мг/мл о-фенилендиамина и 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0.15 М цитрат-фосфатном буфере pH 5.0. Через 45 мин в ячейки добавляли по 50 мкл 4М серной кислоты, содержащей 0.1 М Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, и проводили фотометрию при 492 нм.

Приготовление рабочих растворов АОЛ для конкурентного ИФА проводили путем соответствующих разбавлений исходного раствора в ацетонитриле с концентрацией 4.45 мкг/мл, определенной спектрофотометрически ( $\lambda = 255$  нм,  $\epsilon = 38000$ ), в смеси ФСБ-т и ацетонитрила в объемном соотношении 9 : 1. Градуировочный график в координатах: “процент связывания антител – концентрация раствора АОЛ” получали в условиях промежуточной прецизионности ( $n = 10$ ) ежедневно или с интервалами 1–2 сут.

Объектами анализа были образцы зерна пшеницы, ячменя, овса и ржи из Севера Нечерноземья, предоставленные сотрудниками лаборатории микологии и фитопатологии им. А.А. Ячевского Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений РАСХН (г. Санкт-Петербург–

Пушкин), а также сырья и кормовых рационов, полученных от животноводческих предприятий.

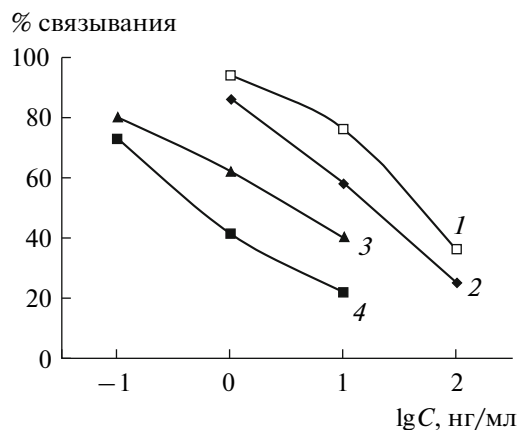
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

АОЛ, взятый нами в качестве гаптена для конъюгирования с белками, в растворе ацетонитрила имел характерные максимумы УФ-поглощения при 255 нм, 288 и 300 нм, 330 и 340 нм, которые были близки описанным в литературе для спектра в этаноле – 258 нм ( $\epsilon = 38000$ ), 302 и 330 нм [10]. Первый коротковолновый максимум поглощения мог быть перекрыт поглощением белковых носителей при 280 нм, поэтому факт присутствия гаптена в конъюгатах можно было надежно обнаруживать только по поглощению около 300 и 330 нм.

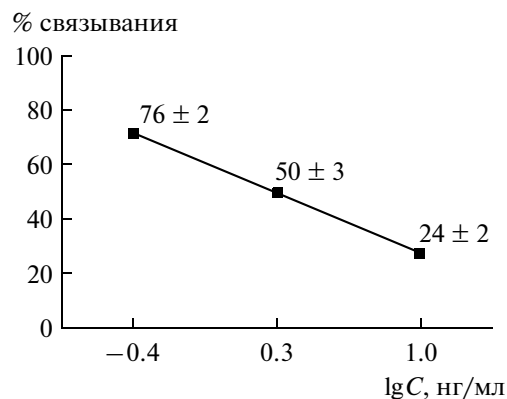
По типовой процедуре реакции формальдегидной конденсации (реакция Манниха) рекомендуется использовать 37%-ный раствор формальдегида (50 мкл на 2 мг БСА и на 2 мг гаптена), нагревание в диапазоне от 37 до 57°C с продолжительностью от 3 до 24 ч [9]. Попытка проведения реакции с 3690-кратным избытком формальдегида в течение 24 ч завершилась получением продуктов, имеющих неожиданные спектральные характеристики. У конъюгатов вместо свойственного АОЛ поглощению при 330–340 нм появился широкий максимум с центром при 347 нм (рис. 1). Батохромное смещение (на 17 нм) указывало на изменения в хромофорной системе АОЛ, возникшие в результате его связывания с белками. Интенсивность пика закономерно возрастала с увеличением избытка гаптена в реакции и при нагрузках 30 и 110 моль/моль БСА достигала 0.08 и 0.11 оптических единиц (рис. 1).

Выбранный для иммунизации конъюгат БСА-АОЛ (110) уже после второго введения (при первом взятии крови) обеспечил получение антител с рабочим титром 1 : 2500 и возможность определения АОЛ в растворах до концентрации 10 нг/мл в условиях взаимодействия с твердофазным антигеном ЯА-АОЛ (10). Продолжение процедуры иммунизации вплоть до 4 получения сыворотки крови сопровождалось сохранением этого же уровня титра антител и увеличением чувствительности анализа почти на 2 порядка (рис. 2). С иммобилизованными конъюгатами на основе БСА и Жел, взятыми в той же концентрации 0.05 мкг/мл титры антител оказались выше, по показателям конкурентного анализа некоторые преимущества имел Жел-АОЛ (10), который обеспечивал линейность аналитического сигнала в интервале (20–80%) для концентраций от 0.4 до 10 нг/мл (табл. 1).

Градуировочный график, построенный в координатах “процент связывания антител ( $n = 10$ ) – логарифм концентрации АОЛ”, представлен на рис. 3. При равномерном возрастании концентраций калибровочных растворов (0.04, 2.0, 10.0 нг/мл) снижение уровня связывания антител с твердой фазой ( $76 \pm$



**Рис. 2.** Конкурентный ИФА АОЛ при тестировании анти-БСА-АОЛ (110) сывороток от 1 до 4 взятия крови в условиях взаимодействия с твердофазным антигеном ЯА-АОЛ (10).



**Рис. 3.** Градуировочный график ИФА с анти-БСА-АОЛ (110) сывороткой от 6 взятия крови и твердофазным антигеном Жел-АОЛ (10) ( $n = 10$ ) для растворов АОЛ в присутствии ацетонитрила.

2%,  $50 \pm 3\%$ ,  $24 \pm 2\%$ ) имело линейный характер. Значения процента связывания антител, имеющие относительное стандартное отклонение не более 0.05, указывали на стабильный характер функционирования тест-системы в лабораторных условиях при обычных колебаниях внешних факторов.

Для оценки специфичности анализа мы приготовили раствор метилового эфира АОЛ в ацетонитриле и по данным УФ-спектра подтвердили его идентичность. В спектре вещества присутствовали те же характеристические максимумы поглощения при 256 нм, 288 и 300 нм, 330 и 340 нм, что и у АОЛ, которые совпадали с описанными — 257, 290, 301, 335–342 нм [10]. В экспериментах использовали раствор метилового эфира АОЛ в ацетонитриле с концентрацией 10 мкг/мл, рассчитанной по величине  $D_{256} = 1.354$  и значению  $\epsilon = 38000$ , указанной для АОЛ [10]. Антитела в условиях конкурентного анализа не обнаруживали метиловый эфир АОЛ даже в концентрации 1 мкг/мл. Таким образом, перекрестная реактив-

ность антител в отношении ближайшего природного аналога АОЛ — монометилового эфира была ниже 1%. Это свидетельствовало о высокой специфичности анализа и принципиальной возможности использования этого варианта ИФА для избирательной индикации АОЛ в объектах.

В ходе анализа водно-ацетонитрильных экстрактов зерна, продуктов переработки пшеницы, кукурузы, сои, подсолнечника и кормосмесей сопутствующие вещества, в том числе и другие микотоксины (Т-2-токсин, дезоксиниваленол, охратоксин А), не создавали каких-либо препятствий функционированию тест-системы. Предел количественного определения АОЛ составил 20 мкг/кг.

Результаты анализа зерна ячменя и овса представлены в табл. 2. В целом, показатель степени загрязненности зерна АОЛ у овса (35/56, т.е. 35 положительных образцов из 56 исследованных) оказался выше, чем у ячменя — 18/62. Ранее такой же результат был получен в Германии — частота обнаружения АОЛ для овса составила 17%, а для

**Таблица 1.** Конкурентное взаимодействие (процент связывания антител) анти БСА-АОЛ (110) сыворотки после 7 введения иммуногена с различными твердофазными антигенами

Иммобилизованный антиген	Рабочий титр антител	Концентрация раствора АОЛ, нг/мл		
		10	2	0.4
БСА-АОЛ (30)	1 : 100000	31	50	76
БСА-АОЛ (10)	1 : 120000	29	47	72
ЯА-АОЛ (10)	1 : 7000	25	42	78
Жел-АОЛ(10)	1 : 120000	27	49	71

**Таблица 2.** Частота обнаружения и содержание АОЛ в возделываемом зерне овса и ячменя

Вид	$n^+/n$	АОЛ, мкг/кг	
		диапазон	среднее
Овес	35/56	20–2505	144
Ячмень	18/62	20–126	48

Примечание к табл. 2 и 3:  $n$  – число исследованных образцов,  $n^+$  – число положительных образцов.

ячменя и пшеницы – 1–2% [11]. У овса в большинстве положительных образцов (28/35) уровни накопления также соответствовали диапазону 20–250 мкг/кг (среднее 78.5 мкг/кг), тогда как у остальных в разной степени превышали этот верхний порог и составили от 323 до 2505 мкг/кг (среднее значение 966.7 мкг/кг).

Для ячменя уровни содержания токсина находились в интервале от 20 до 126 мкг/кг. Согласно данным, приведенным в работе [11], количества АОЛ, найденные в зерне в Германии, составляли 6–160 мкг/кг. В литературе описаны также случаи более высоких содержаний АОЛ в зерне хлебных злаков, которые связаны, как правило, с чрезмерно интенсивным поражением растений грибами рода *Alternaria*. Так, польскими исследователями показано, что в зерновках из колоса пшеницы с очевидным черным налетом на его поверхностных частях количество АОЛ составило 590 мкг/кг, а в соломе такой пшеницы и ржи его уровень достигал 1800 мкг/кг [12]. В Китае в 20 из 22 образцов зерна пшеницы с интенсивным инфицированием *Alternaria* (87.3%) накоп-

ление АОЛ наблюдалось в количествах от 116 до 731 мкг/кг (среднее 335 мкг/кг) [13].

Встречаемость АОЛ в пшенице, ячмене и кукурузе фуражного назначения составила в целом 19.9% (табл. 3), при этом уровни загрязненности зерна, а также продуктов его подработки (пшеничные отруби), не превышали 200 мкг/кг. В жмыхах и шротах из подсолнечника, а также в продукции переработки зерна кукурузы (“глютен” и “корм глютенный”) частота обнаружения АОЛ была значительно выше. В жмыхах и шротах из подсолнечника усредненный уровень накопления АОЛ оказался самым высоким среди кормовых ингредиентов и составил 192 мкг/кг. О присутствии АОЛ в семенах подсолнечника ранее сообщено итальянскими исследователями [14] и недавно в Бразилии в 18% образцов семян найден АОЛ в количествах 24.9–170.9 мкг/кг [15]. В комбинированных кормах частота обнаружения АОЛ (59/216, 27.3%) и уровни контаминации (от 20 до 334 мкг/кг) вполне соответствовали ожидаемым, исходя из результатов обследования основных видов сырья, используемых для их изготовления.

В ходе анализа единичных образцов сена и силоса нами установлены весьма высокие уровни их загрязнения – 560 и 760 мкг/кг. Этот вопрос заслуживает отдельного изучения, поскольку в составе микобиоты силосованных кормов, формирование которой происходит в специфических условиях, доля грибов *Alternaria* невелика [16]. Видовая принадлежность грибов рода *Alternaria*, наиболее активно участвующих в загрязнении АОЛ зерновых, сочных и грубых кормов, пока также остается невыясненной. Первичная оценка 50 изолятов *Alternaria* spp. из разных видов кормов (сусловый агар, 25°C, 7 сут) показала, что все они способны продуцировать этот метаболит в количествах от 7 до 700 мкг/мл среды.

**Таблица 3.** Частота обнаружения и содержание АОЛ в кормах

Вид корма	$n^+/n$	АОЛ, мкг/кг	
		диапазон	среднее
Зерно пшеницы	4/28	76–192	98
Зерно ячменя	22/76	20–126	47
Зерно кукурузы	5/52	38–169	88
Отруби пшеничные	4/10	20–63	34
Шрот из сои	1/7	23	23
Шрот, жмых из подсолнечника	17/21	25–388	192
“Глютен” кукурузный	16/20	20–190	56
Комбикорма	59/216	20–334	49
Сено, силос	2/2	560, 760	560, 760

Создание ИФА, с помощью которого возможно получать сведения о характере контаминации АОЛ различных видов агропродукции, позволит провести поиск активных штаммов грибов, обеспечивающих биосинтез этого токсина в условиях выращивания сельскохозяйственных культур.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белякова Г.А., Левкина Л.М. // Микология и фитопатология. 1990. Т. 24. № 2. С. 128–135.
2. Белякова Г.А., Левкина Л.М. // Микология и фитопатология. 1992. Т. 26. № 3. С. 183–188.
3. Schade J.E., King A.D. // J. Food Prot. 1984. V. 47. № 12. P. 978–995.
4. Chromatography of Mycotoxins. Techniques and Applications / Ed. V. Betina Amsterdam: Elsevier, 1993, 373 p.
5. Scott P.M., Weber D., Kanhere S.R. // J. Chromatogr. A. 1997. № 765. P. 255–263.
6. Szurdoki F., Trousdale E., Ward B., Gee S.J., Hammock B.D., Gilchrist D.G. // J. Agr. Food Chem. 1996. V. 44. № 7. P. 1796–1803.
7. Yu W., Yu F.-Y., Undersander D.J., Chu F.S. // Food Agricul. Immunol. 1999. V. 11. № 4. P. 307–319.
8. Nakane P.K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 2. P. 1084–1091.
9. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. San Diego: Acad. Press, 1996. P. 785.
10. Cole R.J., Cox R.H. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. New York–London–Toronto–Sydney–San Francisco: Acad. Press, 1981. 937 p.
11. Gruber-Schley S., Thalmann A. // Landwirtschaft. Forsch. 1988. V. 41. № 1–2. P. 11–29.
12. Grabarkiewicz-Szczesna J., Chelkowski J., Zajkowski P. // Mycotoxin Res. 1989. V. 5. № 2. P. 77–80.
13. Li F.Q., Yoshizawa T. // J. Agr. Food Chem. 2000. V. 48. № 7. P. 2920–2924.
14. Logrieco A., Bottalico A., Visconti A., Vurro M. // Microbiol. Alim. Nutr. 1988. № 6. P. 13–17.
15. Pozzi C.R., Braghini R., Arcardo J.R.P., Zorzete P., Israel A.L.M., Pozar I.O., Denucci S., Correa B. // J. Agr. Food Chem. 2005. V. 53. № 14. P. 5824–5828.
16. Кислякова О.С. // Проблемы вет. санитарии и экологии. 2001. Т. 111. С. 115–122.

## Enzyme Immunassay of Alternariol for the Assessment of Risk of Agricultural Products Contamination

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 November 3, 2009

**Abstract**—A highly specific test system based on polyclonal rabbit antibodies targeting a conjugate of alternariol and bovine serum albumin prepared by formaldehyde condensation has been developed for the first time and shown to have the sensitivity of 0.4 ng/ml in the indirect competitive determination of alternariol. The possibility of applying the assay for assessment of the intensity of alternariol contamination of corn, animal feed, and raw materials used for the preparation of the latter has been demonstrated.



УДК 57.083.3

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСЕСТРОЛА В МЯСЕ ЖИВОТНЫХ

© 2011 г. М. М. Вдовенко\*, Чи-Фанг Пенг\*\*, Чуан-Лай Шу\*\*, Е. С. Вылегжанина\*\*\*, А. А. Комаров\*\*\*, И. Ю. Сахаров\*

\*Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

e-mail: sakharovivan@gmail.com

\*\*Школа пищевой химии и технологии, Университет Южного Янцзы, 214122 Китай

\*\*\*Всероссийский государственный центр качества и стандартизации ветеринарных лекарственных средств для животных и кормов, Москва, 123022 Россия

Поступила в редакцию 04.12.2009 г.

Разработан не прямой конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА) гексестрола (ГЕК), одного из запрещенных в животноводстве анаболиков. Варьируя концентрации наслаивающего конъюгата (ГЕК-овальбумина), антисыворотки против ГЕК, казеина и Твин-20, оптимизированы условия проведения ИФА. Показано, что значения предела обнаружения ( $IC_{10}$ ),  $IC_{50}$  и рабочего диапазона ( $IC_{20}$ – $IC_{80}$ ) в отсутствие и присутствии 0.05% Твин-20 в реакционной смеси равны 0.01, 0.17, 0.03–0.86 нг/мл и 0.05, 2.9, 0.26–32.0 нг/мл соответственно. Среднеквадратичное отклонение результатов анализа не превышало 5.4%. При использовании бездетергентного формата ИФА при определении ГЕК в образцах говяжьего мяса с различным содержанием аналита величина открытия составила 74–147%.

В современном промышленном животноводстве при интенсивных технологиях выращивания животных в нарушение технологических регламентов иногда прибегают к незаконному использованию гормональных стимуляторов роста, т.к. применение этих препаратов позволяет добиваться значительного повышения производства продукции животного происхождения при минимизации вложенных затрат. Такая продукция крайне опасна для здоровья человека, т.к. гормональные стимуляторы роста обладают канцерогенной активностью, а также вызывают нарушения полового созревания и репродуктивной способности человека [1–4]. В настоящее время использование гормональных стимуляторов роста при выращивании животных запрещено в большинстве стран. В странах Европейского союза в соответствии с директивой 96/23/ЕС проводится мониторинг остаточного содержания в кормах и животноводческой продукции запрещенных анаболических стимуляторов роста (стильбены, стероиды, лактоны резорциновой кислоты, бета-адреномиметики). Все эти вещества отнесены к наиболее опасным лекарственным препаратам (группа А). При контроле препаратов данной группы основной целью является обнаружение незаконного использования их в любых концентрациях.

Качество пищевых продуктов на наличие в них гормональных стимуляторов роста наиболее часто оценивается с применением хроматографических методов анализа [5–7]. Данные методы, несмотря на

высокую чувствительность, воспроизводимость и достоверность результатов, обладают существенными недостатками, которые обусловлены высокой стоимостью оборудования, необходимостью привлечения высококвалифицированного персонала, а также значительными трудозатратами и длительностью анализа при характеристике серийных образцов. В связи с этим активно разрабатываются иммунохимические методы определения гормональных стимуляторов роста, которые лишены недостатков хроматографических методов [8].

Цель исследования – разработка непрямого конкурентного иммуноферментного метода определения гексестрола (ГЕК), одного из анаболических препаратов стильбенового ряда, и использование данного метода для определения ГЕК в мясе животных.

### МЕТОДИКА

**Материалы.** Пероксидаза из корней хрена (RZ 3.0) – препарат фирмы “Sigma” (США). Данный фермент был использован в работе без дополнительной очистки.

Гексестрол, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) и натриевая соль казеина – препараты фирмы “Sigma” (США),  $H_2O_2$  (30%-ный) – “ХимМед” (Россия), Твин-20 – “Ferak” (Германия). Все используемые соли были аналитической или химической чистоты. Концентрация пероксида водорода оценивалась спектро-

фотометрически по измерению оптической плотности его растворов при 240 нм ( $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) [9].

**Иммунореагенты.** Гексестрол, конъюгированный с овальбумином (**ГЕК-ОВА**) был получен, как описано ранее [10]. Для этого, к 10 мг 3-карбокситрипропилгексестрилового эфира, растворенного в 0.4 мл смеси диоксана и диметилсульфоксида (1 : 1 об./об.), добавляли 5 мл триметиламина и 20 мл изобутилхлорформата и инкубировали в течение 1 ч при 48°C (**раствор А**). В то же время 20 мг овальбумина растворяли в 0.8 мл дистиллированной воды с последующим добавлением 0.8 мл диметилсульфоксида. Данный раствор также инкубировали в течение 1 ч при 48°C (**раствор Б**). Затем раствор А медленно по каплям добавляли к раствору Б, после чего полученную смесь инкубировали в течение 4 ч при 48°C. Полученный конъюгат ГЕК-ОВА диализовали против 10 мМ К-фосфатного буфера, рН 7.4, содержащего 0.15 М NaCl (**ФБС**) и хранили при -20°C. Аналогичным образом синтезировали конъюгат ГЕК с бычьим сыворотным альбумином (**БСА**).

Поликлональная антисыворотка к ГЕК была получена при подкожной иммунизации кроликов весом 1.5–2.5 кг в течение 6 мес конъюгатом ГЕК-БСА, как описано ранее [11]. Титр антисывороток оценивали методом ИФА. Специфические антисыворотки хранили в 50%-ном (об./об.) растворе глицерина при -20°C.

Конъюгат поликлональных антител овцы против IgG кролика с пероксидазой хрена был синтезирован, как описано [12]. Для этого 5 мг пероксидазы хрена (**ПХ**) растворяли в 0.5 мл дистиллированной воды с последующим добавлением раствора перйодата натрия, конечная концентрация которого составляла 17 мМ. Окисление ПХ проводили при комнатной температуре в течение 20 мин в темноте, после чего реакционную смесь диализовали против 1 мМ Na-ацетатного буфера, рН 4.9, в течение ночи при 4°C для удаления избыточного количества окислителя и продуктов его разложения. На следующие сутки в полученный раствор пероксидазы добавляли 0.5 мг очищенных поликлональных антител овцы против IgG кролика, растворенных в 75 мкл 50 мМ Na-карбонатного буфера, рН 9.6, и инкубировали при комнатной температуре 2 ч при постоянном перемешивании. Восстановление образовавшихся оснований Шиффа проводили, добавляя 10 мкл свежеприготовленного 10%-ного раствора NaBH<sub>4</sub>. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Конъюгат диализовали против ФБС и хранили в 50%-ном (об./об.) растворе глицерина при -20°C.

**Определение гексестрола методом ИФА.** Предварительно в лунки 96-луночных микропланшетов с высокой сорбционной способностью ("Costar", США) вносили по 100 мкл раствора конъюгата ГЕК-ОВА (0.25–2.00 мкг/мл) в 50 мМ карбонатном буфе-

ре, рН 9.6, и инкубировали в течение ночи при 4°C. После удаления несорбированного конъюгата в лунки планшета вносили по 100 мкл 0.1%-ного раствора казеина в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7.4, содержащем 0.15 М NaCl (**ФБС**), и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Избыток казеина удаляли четырехкратной отмывкой планшетов ФБС, содержащим 0.05% Твин-20 (**ФБСТ**). На следующем этапе в лунки планшета вносили по 50 мкл ГЕК (0.003 до 600 нг/мл) и антисыворотки против ГЕК. Антисыворотку разводили ФБС или ФБСТ, в то время как для ГЕК в качестве растворителя использовали ФБС или ФБСТ, содержащие 0.2% казеина и 20% метанола. Конкурентная иммунологическая реакция протекала в течение 1 ч при 37°C. После отмывания микропланшета от несвязавшихся антител во все лунки добавляли по 100 мкл раствора конъюгата противовидовых антител с пероксидазой хрена (разведение 1 : 6000) в ФБСТ и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Рабочее разведение используемого конъюгата было определено в отдельном эксперименте. Затем, после отмывания микропланшета, во все лунки добавляли по 100 мкл свежеприготовленного субстратного раствора, содержащего 0.42 мМ ТМБ и 1.2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, растворенных в 100 мМ ацетатном буфере, рН 4.3. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а затем в лунках определяли значения оптической плотности при 450 нм.

**Подготовка образцов говядины.** Измельчали до состояния фарша 5 г говяжьего мяса, не содержащего жира и соединительной ткани, смешивали с 5 мл 0.067 М фосфатного буфера, рН 7.2, и гомогенизировали в течение 2 мин в ножевом гомогенизаторе. Затем 1 г полученного гомогената смешивали с 3 мл метанола и подвергали ультразвуковой обработке ("Elmasonic S", Германия, мощность 80 Вт) в течение 20 мин, после чего смесь центрифугировали в течение 10 мин при 4000 g. Используя полученный осадок, процесс экстракции метанолом проводили повторно. Осадок после вторичной экстракции смешивали с 3 мл водно-метанольной смеси (1 : 3) и подвергали ультразвуковой обработке в течение 20 мин. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 4000 g. Экстракцию водно-метанольной смесью проводили дважды. После проведения четырехэтапной экстракции полученные супернатанты образца мяса объединяли и смешивали при интенсивном встряхивании с 2 мл гексана. Образовавшийся верхний слой гексана удаляли, и экстракцию гексаном повторяли вновь. Для удаления метанола из водно-спиртового (нижнего) слоя полученный раствор подвергали выпариванию при 50°C. Водный раствор смешивали с 5.0 мл трет-бутилметилового эфира, и экстракцию проводили в течение 20 мин, встряхивая вручную каждые 5 мин. Используя нижний слой, экстракцию с трет-бутил-

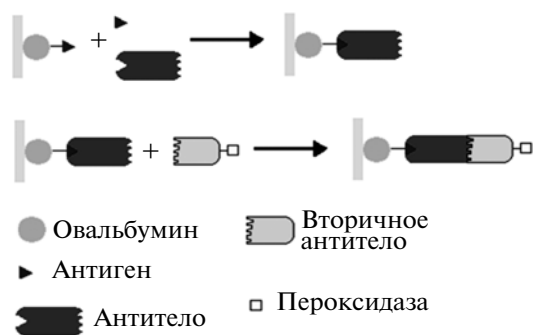


Рис. 1. Схема непрямого конкурентного твердофазного иммуоферментного анализа гексестрола.

метиловым эфиром проводили повторно. Затем полученные органические фракции объединяли и упаривали на роторном испарителе (45°C). Перед анализом высушенный образец растворяли в 0.5 мл рабочего буфера (ФСБ или ФСБТ) и центрифугировали в течение 10 мин при 7000 g. На последнем этапе пробоподготовки супернатант разводили в 10 раз рабочим буфером. Растворы ГЕК с концентрациями, соответствующими значениям IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub> и IC<sub>75</sub>, в образце мясного экстракта получали смешиванием этанольного раствора ГЕК (1 мг/мл) и экстракта говяжьего мяса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя качество проведения иммуоферментного анализа во многом определяется характеристиками используемых иммуореагентов (специфических антител, наslaивающих и ферментных конъюгатов), условия анализа также значительно влияют на параметры данного аналитического метода. Учитывая вышесказанное, на первом этапе разработки непрямого конкурентного ИФА (рис. 1), предназначенного для определения ГЕК (химическая формула представлена на рис. 2) в мясе животных, нами оптимизировалась концентрация антител против ГЕК в реакционной среде. Как видно на рис. 3, использование слабо разбавленного раствора специфической антисыворотки (разведение 1 : 800) приводит к формированию градуировочной кривой с высоким фоновым значением оптической плотности (рис. 3, 1). С другой стороны, при применении сильно разбавленной антисыворотки (разведение 1 : 6400) величина регистрируемой оптической плотности не зависела от концентрации добавляемого в реакционную среду ГЕК, т.е. при этом разведении антисыворотки градуировочная кривая не позволяла измерять концентрацию ГЕК (рис. 3, 4). И только антисыворотка к ГЕК в разведениях 1 : 1600 и 1 : 3200 позволила нам получить качественные градуировочные кривые для определения ГЕК (рис. 3, 2 и 3).

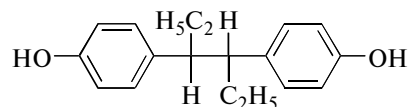
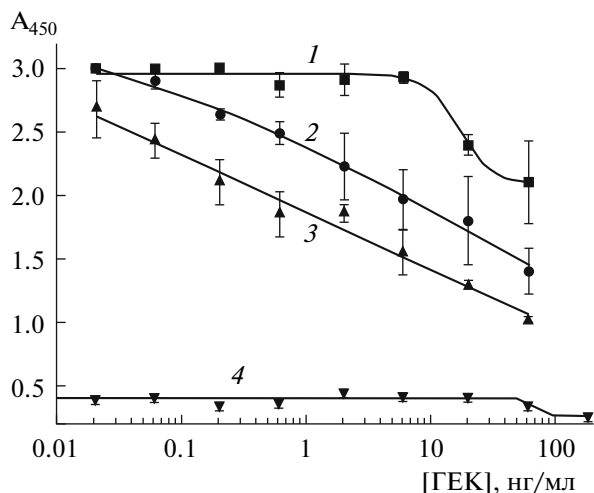


Рис. 2. Химическая структура гексестрола.

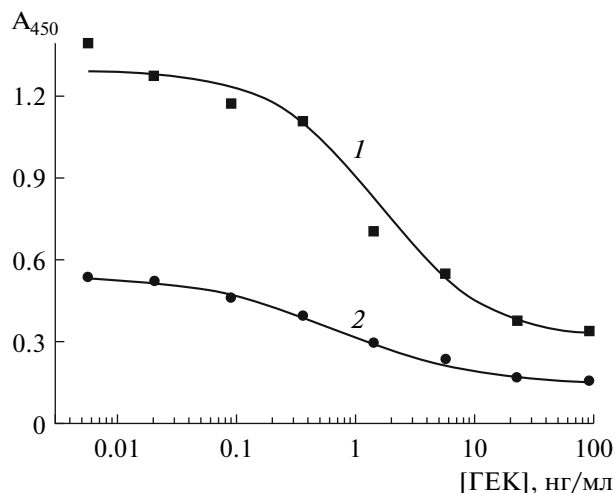
Традиционно в ИФА для предотвращения неспецифической сорбции на поверхности полистироловых планшетов в реакционную среду добавляют ПАВ. Более того, часто в схему анализа также вводят стадию сорбирования блокирующего белка. На первом этапе нашей работы оба указанных методологических приема использовались нами при определении ГЕК, используя Твин-20 как ПАВ и казеин как блокирующий белок. Однако, как видно на рис. 4, 1, и в этом варианте анализа значение оптической плотности, соответствующей неспецифической реакции, было достаточно велико. Поэтому казеин был применен не только как блокирующий белок, но и как один из компонентов реакционной смеси на стадии конкуренции. Добавление 0.1% казеина в реакционную смесь позволило эффективно подавить неспецифическую адсорбцию антител в лунках микропланшета (рис. 4, 2). Надо также отметить, что введение казеина в реакционную смесь приводило и к понижению эффективности специфической иммунологической реакции.

В дальнейшем исследовали влияние концентрации конъюгата ГЕК-ОВА, используемого как наslaивающий антиген, на аналитические характеристики ИФА. Как видно на рис. 5, 1 при низких концентрациях наslaивающего антигена градуировочная кривая не формируется. Повышение концентрации ГЕК-ОВА позволило получить качественные градуировочные кривые для определения ГЕК (рис. 5, 2 и 3). Однако, дальнейшее повышение концентрации ГЕК-ОВА (до 2 мкг/мл) приводило к негативному результату, что выражалось в резком ухудшении аналитических характеристик ИФА, а именно в повышении величины предела обнаружения и резком сужении рабочего диапазона измеряемого ГЕК (рис. 5, 4). По-видимому, обнаруженный эффект связан с формированием неактивных агрегатов ГЕК-ОВА, образующихся за счет гидрофобного взаимодействия фрагментов ГЕК различных молекул наslaивающего конъюгата. Сравнение таких аналитических величин, как IC<sub>10</sub>, IC<sub>50</sub> и интервала рабочего диапазона (IC<sub>20</sub>—IC<sub>80</sub>) для 4 градуировочных кривых с использованием различных концентраций ГЕК-ОВА, показало, что наилучшие результаты были получены при использовании наslaивающего конъюгата с концентрацией 0.5 мкг/мл (табл. 1).

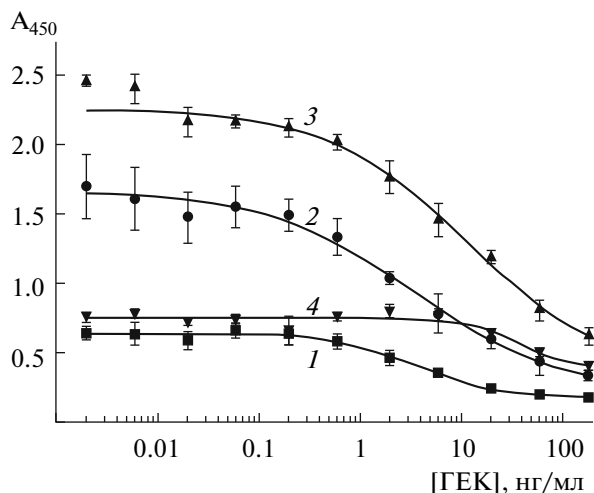
В работе [13], посвященной разработке ИФА для определения азинфосфометила в образцах воды, было показано, что удаление Твин-20 из реакционной



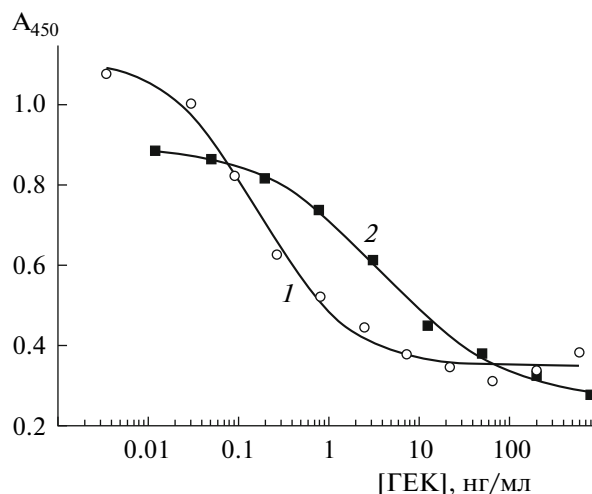
**Рис. 3.** Подбор оптимального разведения антисыворотки против ГЕК в ИФА гексестрола. При оптимизации использовались разведения: 1 – 1 : 800, 2 – 1 : 1600, 3 – 1 : 3200, 4 – 1 : 6400.



**Рис. 4.** Градуировочные кривые для определения ГЕК с помощью ИФА, используя в качестве рабочего буфера ФСБТ с 10% метанола без добавления (1) или с добавлением 0.1% казеина (2).



**Рис. 5.** Подбор оптимальной концентрации ГЕК-ОВА, использованного как наслаивающий конъюгат, в ИФА гексестрола. При оптимизации использовались концентрации (мкг/мл): 1 – 0.25, 2 – 0.5, 3 – 1.0 и 4 – 2.0.



**Рис. 6.** Градуировочные кривые для определения ГЕК с помощью ИФА, используя в качестве рабочего буфера ФСБТ с 0.1% казеина и 10% метанола без добавления (1) или с добавлением 0.05% Твин-20 (2).

смеси на стадии конкуренции приводит к повышению чувствительности анализа. Аналогичный подход был апробирован нами и в случае определения ГЕК. Как видно на рис. 6, удаление ПАВ из реакционной смеси приводило к смещению градуировочной кривой в область более низких концентраций ГЕК, т.е. к понижению предела обнаружения анализа исследуемого анаболического гормона. Следует также с удовлетворением отметить, что такое удаление ПАВ из реакционной среды не привело к значительному увеличению значения фоновой оптической плотности (рис. 6). В отсутствие Твин-20 в реак-

ционной смеси величины  $IC_{10}$  и  $IC_{50}$  составили 0.01 и 0.17 нг/мл соответственно, при этом рабочий диапазон анализа ГЕК лежал в интервале от 0.03 до 0.86 нг/мл (табл. 2). Среднеквадратичное отклонение результатов анализа находилось в интервале 0.3–5.4%.

Сопоставление полученных аналитических параметров при определении ГЕК с помощью ИФА без применения ПАВ и жидкостной хроматографии с масс-спектроскопической регистрацией, для которой предел обнаружения равнялся 0.8 нг/мл, показало [14], что разработанный ИФА имеет более

**Таблица 1.** Влияние концентрации наслаивающего конъюгата (ГЕК-ОВА) на величины аналитических параметров ИФА гексестрола

ГЕК-ОВА, мкг/мл	IC <sub>10</sub> , нг/мл	IC <sub>50</sub> , нг/мл	Рабочий диапазон, нг/мл
0.25	0.4	3.6	0.7–16
0.5	0.1	3.4	0.4–30
1.0	0.7	11.5	1.5–98
2.0	8.0	34.6	16–92

**Таблица 2.** Влияние присутствия Твин-20 в реакционной среде стадии конкуренции на величины аналитических параметров ИФА гексестрола

Состав реакционной среды	IC <sub>10</sub> , нг/мл	IC <sub>50</sub> , нг/мл	Рабочий диапазон, нг/мл
ФБС с 0.1% казеина, 10% метанола и 0.05% Твин-20	0.05	2.9	0.26–32.0
ФБС с 0.1% казеина и 10% метанола	0.01	0.17	0.03–0.86

низкий предел обнаружения ГЕК по сравнению с хроматографическим методом. Сравнение разработанного метода с другими опубликованными иммунохимическими методами анализа показало, что аналитические параметры ИФА без применения ПАВ значительно лучше параметров для непрямого ИФА (рабочий диапазон от 0.1 до 8.1 нг/мл, IC<sub>50</sub> – 0.671 нг/мл) [15] и сопоставимы с аналитическими

характеристиками для прямого ИФА (рабочий диапазон от 0.01 до 8.1 нг/мл, IC<sub>50</sub> – 0.23 нг/мл) [11].

Разработанный метод анализа был использован для определения ГЕК, добавленного в образцы экстракта говяжьего мяса. Концентрация ГЕК в приготовленных образцах равнялась 0.04, 0.17 и 0.55 нг/мл. При проведении реакции конкуренции между ГЕК-ОВА и ГЕК за места связывания специфических антител в ФБС, т.е. в отсутствие ПАВ, величины открытия для определения ГЕК в образцах мяса варьировались в пределе 74–147% (табл. 3). Здесь следует подчеркнуть, что когда определение ГЕК проводилось с помощью ИФА с добавлением Твин-20, матричный эффект мяса был столь значителен, что, в отличие от ИФА без применения ПАВ, не позволил корректно измерять концентрацию ГЕК в образцах мяса (0.43, 2.9 и 18.5 нг/мл). Величины открытия в этом случае лежали в интервале 545–1355% (табл. 3).

Таким образом, разработан не прямой конкурентный иммуноферментный анализ гексестрола. При этом было показано, что удаление ПАВ из реакционной смеси на стадии конкуренции позволило не только значительно понизить предел обнаружения данного анаболического гормона, но и минимизировать матричный эффект мяса при определении ГЕК с помощью ИФА.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (08-03-92201 ГФЕН\_а и 09-04-01639-а), Национальным фондом естественных наук Китая (20675035) и Перспективной программой развития науки и технологии Китая (2006ВАК02А09 и 2006ВАК02А19).

**Таблица 3.** Определение гексестрола в образцах говяжьего мяса с помощью непрямого конкурентного иммуноферментного анализа

Образец мяса	ИФА без использования Твин-20			ИФА с использованием Твин-20		
	концентрация ГЕК		открытие, %	концентрация ГЕК		открытие, %
	добавленного, нг/мл	определенного, нг/мл (n = 3)		добавленного, нг/мл	определенного, нг/мл (n = 3)	
№ 1	0.04	0.06	140	0.4	5.0	1163
	0.17	0.20	118	2.9	18.5	638
	0.55	0.57	104	18.5	100.9	545
№ 2	0.04	0.06	140	0.4	5.0	1163
	0.17	0.25	147	2.9	27.0	931
	0.55	0.70	127	18.5	177.4	959
№ 3	0.04	0.03	74	0.4	5.0	1163
	0.17	0.14	82	2.9	39.3	1355
	0.55	0.57	104	18.5	214.2	1158

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Metzler M. // Food Cosmetics Toxicol. 1981. V. 19. P. 611–615.
2. Hart J.E. // Food Chem. Toxicol. 1988. V. 26. № 3. P. 227–232.
3. Byford J.R., Shawa L.E., Drewb M.G.B., Pope G.S., Sauer M.J., Darbre P.D. // J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 2002. V. 80. № 1. P. 49–60.
4. Dobrydneva Y., Williams R.L., Katzenellenbogen J.A., Ratz P.H., Blackmore P.F. // Thrombosis Res. 2003. V. 110. № 1. P. 23–31.
5. Marcos V., Perogordo E., Espinosa P., Pozuelo M., Hooghuis H. // Analyt. Chim. Acta. 2004. V. 507. № 2. P. 219–227.
6. Inmaculada G., Sarabia L.A., Orti C.M., Aldama J.M. // Analyt. Chim. Acta. 2005. V. 544. № 1. P. 26–35.
7. Xu C.L., Peng C.F., Liu L., Wang L.Y., Jin Z.Y., Chu X.G. // J. Pharmac. Biomed. Analysis. 2006. V. 41. № 3. P. 1029–1036.
8. Magliulo M., Michelini E., Simoni P., Guardigli M., Roda A. // Analyt. Bioanalyt. Chem. 2005. V. 384. № 1. P. 27–30.
9. Kulmacz R.J. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 249. № 2. P. 273–285.
10. Xu C.L., Peng C.F., Wang L.Y., Hao K., Jin Z.Y. // Food Agric. Immunol. 2006. V. 17. № 1. P. 21–27.
11. Wang L.Y., Peng C.F., Chen W., Xu C.L. // Food Agric. Immunol. 2008. V. 19. № 1. P. 61–75.
12. Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б., Сахаров И.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 614–620.
13. Mercader J.V., Montoya A. // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. № 3. P. 1285–1293.

## Enzyme Immunoassay for the Determination of Hexestrol in Meat

M. M. Vdovenko<sup>a</sup>, C.-F. Peng<sup>b</sup>, C.-L. Xu<sup>b</sup>, E. S. Vylegzhanina<sup>c</sup>,  
A. A. Komarov<sup>c</sup>, and I. Yu. Sakharov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup> School of Food Chemistry and Technology, South Yangtze University, 214122 China

<sup>c</sup> All-Russia State Center for Quality Control and Standardization of Veterinary Therapeutics and Animal Feeds,  
Moscow, 123022 Russia

e-mail: sakharovivan@gmail.com

Received December 4, 2009

**Abstract**—An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of hexestrol (HES), an antibiotic forbidden for use in livestock farming, has been developed. Conditions of ELISA have been optimized by varying the concentrations of the coating conjugate (HES-ovalbumin), anti-HES antiserum, casein, and Tween 20. In the absence of Tween 20 in the reaction mixture, the detection limit (IC<sub>10</sub>) equaled 0.01 ng/ml, IC<sub>50</sub> equaled 0.17 ng/ml, and the working range (IC<sub>20</sub>–IC<sub>80</sub>) equaled 0.03–0.86 ng/ml, while, in the presence of 0.05% Tween 20, these values equaled 0.05 ng/ml, 2.9 ng/ml, and 0.26–32.0 ng/ml, respectively. Standard deviation of the analysis results did not exceed 5.4%. If ELISA was performed in the absence of detergents, the recovery value upon HES determination in spiked beef samples ranged from 74 to 147%.

УДК 581.143:577.114

## ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *Silene vulgaris* (M.) G.

© 2011 г. Е. А. Гюнтер, Ю. С. Оводов

Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, 167982

e-mail: gunter@physiol.komisc.ru

Поступила в редакцию 06.09.2009 г.

Из каллусной культуры смолевки обыкновенной *Silene vulgaris*, (M.) G. выделена пектин-белковая фракция SVC, в составе которой в качестве основных компонентов содержались остатки D-галактуроновой кислоты, галактозы, арабинозы, рамнозы и белка. С помощью методов ионообменной хроматографии, ультрафильтрации, кислотного и ферментативного гидролиза показано, что SVC содержал смесь молекул линейного пектина, разветвленного пектинового полисахарида и пектин-белкового полимера. Фрагмент линейной цепи галактуронана составлял более половины всей углеводной цепи силенана. Разветвленная область макромолекулы представлена рамногалактуронаном I. Пектин-белковый полимер состоял в основном из слабо разветвленных пектиновых фрагментов с молекулярной массой более 300 кДа и белка.

Пектины являются основным компонентом первичных клеточных стенок высших растений и играют важную роль в регуляции пористости структуры и механических свойств клеточной стенки, а также участвуют в регуляции процессов роста и развития растений [1]. Пектины представляют собой галактуронаны и рассматриваются, как полимеры D-галактуроновой кислоты, которые имеют линейные области галактуронана и рамногалактуронана (smooth regions) и разветвленные области (hairy regions), представленные рамногалактуронаном I и рамногалактуронаном II (RGI и RGII), с боковыми цепями из галактана, арабинана, арабиногалактанов и других более сложных фрагментов [1–3].

Кроме того, различают смешанные углеводсодержащие биополимеры (гликоконъюгаты), которые, наряду с полисахаридными цепями, содержат полипептидные, белковые или липидные фрагменты. Достаточно хорошо изученными гликоконъюгатами являются арабиногалактановые белки (АГБ), которые обнаружены практически во всех растениях [4]. Они вовлечены в ряд фундаментальных процессов, связанных с развитием растительных клеток (пролиферация и растяжение клеток, соматический эмбриогенез). АГБ являются макромолекулами со сложной структурой, которые содержат более 90% углеводов (арабиногалактан II) и 2–10% белков. Арабиногалактановые цепи присоединены ковалентными связями к остаткам гидроксипролина, серина или треонина полипептидного кодра. В настоящее время нет прямых доказательств существования пектин-белковых комплексов. Однако с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) было впервые показано, что экстракт пектина, полученного из сахарной свеклы, содержит смесь линейных молекул пектина, разветвленного пектинового полисахарида и комплекса пектина с белком, присоединенным к од-

ному концу пектиновой цепи [5]. Ранее высказывалось предположение о наличии ковалентной связи между пектином и белком [6]. Полученные с помощью АСМ данные подтверждают это предположение, однако не являются прямым доказательством наличия этой связи: не исключается возможность физической ассоциации пектина и белка. Необходимо дополнительное исследование, чтобы идентифицировать тип пектин-белковой связи в комплексах, определить роль пектина и белка в комплексе и в растительной клеточной стенке [5].

Предварительные исследования, проведенные нами, показали, что силенан, пектин каллуса смолевки обыкновенной [*Silene vulgaris* (M.) G., *Oberna behen* (L.) I.], экстрагируется совместно с белками. Однако изучение строения пектин-белковых полимеров до настоящего времени не проводилось.

Установлено, что макромолекула силенана состоит из линейных и разветвленных областей [7]. Линейная область представлена  $\alpha$ -1,4-D-галактуронаном и  $\alpha$ -1,2-рамно- $\alpha$ -1,4-D-галактуронаном, который одновременно является главной углеводной цепью разветвленной области силенана – рамногалактуронана I. Боковые цепи разветвленной области построены из остатков  $\alpha$ -1,5-связанной арабинофуранозы и  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4-,  $\beta$ -1,6-связанной галактопиранозы [8]. Изучены качественные и количественные изменения полисахаридов в течение ростового цикла культуры смолевки [9], а также показано влияние гормональных факторов [10], углеводов [11, 12], кальция, фосфата, азота [13] и ультрафиолетового облучения [14] на рост клеток и продуцирование полисахаридов. Показана иммуномодулирующая активность силенана каллусной культуры смолевки, в частности, усиление поглотительной способности и миелопероксидазной активности фагоцитов пери-

ферической крови человека и макрофагов брюшной полости крыс [15].

Ранее было показано, что каллусные и суспензионные культуры смолевки обыкновенной продуцируют близкие по строению пектины [16]. Сходство в строении пектинов позволяет применять каллусные культуры как исходный материал при масштабировании процесса получения биологически активных пектиновых веществ. В связи с этим каллусные культуры с высоким содержанием полисахаридов являются перспективным источником для получения суспензионных культур и создания на их основе линий—продуцентов ценных соединений для медицины, косметики, пищевой промышленности и для сельского хозяйства.

Применение культур клеток растений позволит получать пектин-белковые комплексы, характеризующиеся заданным строением и свойствами и стандартизованные по химическому составу и биологической активности. Клеточные культуры, продуцирующие в большом количестве физиологически активные пектин-белковые полимеры, могут служить альтернативным сырьевым источником для получения новых ценных гликоконъюгатов без ущерба природным популяциям.

Цель работы — получение и общая химическая характеристика пектиновых веществ, продуцируемых каллусной культурой смолевки обыкновенной.

## МЕТОДИКА

**Условия культивирования каллусной культуры.** Каллусную культуру смолевки обыкновенной [*Silene vulgaris* (M.) G. = *Oberna behen* (L.) I.] выращивали на агаризованной модифицированной среде Мурасиге и Скуга [17] с добавлением ауксина — 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (1.0 мг/л) и цитокинина — 6-бензиламинопурина (0.5 мг/л). Каллус субкультивировали с интервалом в 21 сут при  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  в темноте.

**Общие аналитические методы.** В полисахаридных фракциях определяли содержание гликуроновых кислот (**ГУК**) по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [18], содержание белка — методом Лоури. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Ultrospec 3000 (“Pharmacia Biotech”, Великобритания). Газожидкостную хроматографию (**ГЖХ**) выполняли на приборе Hewlett-Packard 4890A (“Hewlett-Packard”, США) с пламенно-ионизационным детектором и интегратором HP 3395A на капиллярной колонке RTX-1 (0.25 мм × 30 м) (“Restek”, США), газ-носитель — аргон. Все растворы концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 40–50°C. Центрифугирование растворов проводили при 6000 g в течение 15 мин. Полисахаридные фракции лиофилизовали на лиофильной сушке (“VirTis”, США).

**Выделение полисахаридов.** Выделение полисахаридных фракций из каллуса проводили по методике, описанной в работе [16]. В результате получили пектин-белковую фракцию из каллусной культуры смолевки обыкновенной (**SVC**).

**Полный кислотный гидролиз.** Полисахаридные фракции (по 2.0–2.5 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (0.5 мл) при 100°C в течение 3–4 ч. Гидролизаты упаривали в вакууме с метиловым спиртом до полного удаления трифторуксусной кислоты. В качестве внутреннего стандарта использовали мио-инозит (0.5 мг/мл). Моносахариды идентифицировали с помощью ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [19].

**Ионообменная хроматография на ДЭАЭЦ.** Полисахаридные фракции растворяли в небольшом количестве воды и наносили на колонку (1.5 × 43 см) с ДЭАЭЦ (ОН<sup>-</sup>-форма, скорость элюции 54 мл/ч). Элюцию осуществляли последовательно водными растворами 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 и 1.0 М хлорида натрия. Фракции отбирали по 10 мл. Выход полисахарида контролировали по реакции на углеводы с фенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [20]. Объединенные фракции, соответствующие отдельным пикам, диализовали, концентрировали и лиофилизовали.

**Молекулярно-массовое распределение полисахаридов.** Полисахариды (30–60 мг) растворяли в дистиллированной воде (100–150 мл) и последовательно разделяли по молекулярной массе в ультрафильтрационной ячейке (“Millipore”, США) с помощью ультрафильтрационных мембран (полисульфон, “Владисарт”, Россия) с различными размерами пор (300, 100, 50 и 10 кДа). Фракции концентрировали и лиофилизовали. В результате получали фракции с молекулярными массами более 300 кДа (**SVC-I**); с молекулярными массами 100–300 кДа (**SVC-II**) и с молекулярными массами 50–100 кДа (**SVC-III**).

**Жесткий кислотный гидролиз.** Фракцию SVC (100 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (20 мл) при 100°C в течение 5 ч. Полученный осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом трижды, затем растворяли в воде с добавлением 1 М аммиака до pH 5.0 и лиофилизовали. В результате жесткого кислотного гидролиза получили полисахаридный фрагмент (**SVC-G**) (выход 54%).

**Ферментативный гидролиз.** Ферментативный гидролиз пектина SVC из каллуса смолевки проводили с помощью пектиназы ( $\alpha$ -1,4-D-галактопиранозилураназа, КФ 3.2.1.15, Sigma, 753 ед./г, оптимум pH 4.0 при 25°C) с преобладающей эндо-активностью. Фракцию SVC (150 мг) растворяли в 15 мл дистиллированной воды и добавляли водный раствор пектиназы (3 мг). Смесь инкубировали в течение 6 ч при 25°C, pH 4.0. Действие фермента останавливали путем кипячения инкубационной смеси, полученный осадок удаляли центрифугированием.



**Таблица 1.** Характеристика полисахаридных фракций SVC, полученных в результате фракционирования на ДЭАЭЦ и ультрафильтрации

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							ГУК, %	Белок, %
		Гал	Ара	Рам	Глю	Кси	Ман	сумма		
SVC	10.6*	1.7	1.4	0.9	0.7	0.5	0.7	5.9	63.5	11.6
SVC-1	21.5**	3.4	3.2	2.0	2.0	0.3	0.5	11.4	65.0	7.7
SVC-2	14.7**	2.6	1.7	1.6	1.4	0.2	0.3	7.8	76.2	3.5
SVC-I	77.1***	1.6	1.7	1.2	0.4	0.3	0.5	5.7	81.9	14.1
SVC-II	0.8***	10.8	5.1	2.7	2.3	1.1	1.1	23.1	55.9	1.7
SVC-III	0.4***	19.7	11.7	5.5	3.0	5.0	1.9	46.8	29.6	0

\* Выход от сухой биомассы каллуса.

\*\* Выход от количества полисахарида, нанесенного на колонку с ДЭАЭЦ.

\*\*\* Выход от фракции SVC.

Супернатант концентрировали и осаждали 4-кратным объемом 96%-ного этанола. Осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом до отсутствия свободной галактуроновой кислоты, растворяли в дистиллированной воде и лиофилизовали. В результате ферментативного гидролиза получили фракцию SVC-P (выход 51.7%), представляющую собой смесь фрагментов. Фракцию SVC-P разделяли на ультрафильтрационных мембранах, в результате чего получили фрагменты с молекулярными массами более 300 кДа (SVC-PI), 100–300 кДа (SVC-PII), 50–100 кДа (SVC-PIII) и 10–50 кДа (SVC-PIV). Для фрагментов с молекулярными массами (MM) более 10 кДа дана общая химическая характеристика.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из каллусной культуры смолевки обыкновенной выделена пектин-белковая фракция SVC. Выход SVC от сухой массы составил 10.6%, содержание полисахарида на 1 л питательной среды – 0.83 г/л.

В составе SVC в качестве основных компонентов углеводной цепи содержались остатки D-галактуроновой кислоты (64%), галактозы (1.7%), арабинозы (1.4%) и рамнозы (0.9%) (табл. 1). Соотношение арабиноза-галактоза равнялось 1 : 1.2. Присутствовавшие в образце остатки глюкозы, ксилозы и маннозы, скорее всего, являлись компонентами сопутствующих пектинам резервных полисахаридов и гемицеллюлоз. Содержание белка в SVC составляло 12%.

При анализе SVC методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭЦ получены следующие фракции: SVC-1 (элюция 0.2 M NaCl) и SVC-2 (элюция 0.4 M NaCl) (табл. 1). Фракции имели близкий качественный моносахаридный состав и различались содержанием галактуроновой кислоты и белка. Для фракции SVC-1 отмечено пониженное содержание галактуроновой кислоты и более высокое содержание белка по сравнению с фракцией SVC-2. Основ-

ными нейтральными компонентами углеводной цепи полученных фракций являлись остатки галактозы, арабинозы и рамнозы.

Присутствие белка во фракциях, разделенных на ДЭАЭЦ, свидетельствует о том, что белок, вероятно, связан с пектином ковалентными связями. Ранее на примере пектина сахарной свеклы было показано, что белок не может быть отделен от пектина с помощью хроматографии в присутствии 4 M NaCl [21], что также подтверждает предположение о ковалентной связи пектина и белка. Таким образом, фракция SVC состояла из кислых пектин-белковых полимеров, отличающихся незначительной гетерогенностью.

С помощью ультрафильтрации через мембраны с разным диаметром пор определено молекулярно-массовое распределение SVC. Установлено, что основной по выходу (77%) являлась фракция SVC-I с молекулярной массой более 300 кДа, в которой доминирующими моносахаридами являлись галактуронозная кислота, галактоза и арабиноза (табл. 1). Фракции SVC-II и SVC-III с молекулярными массами 100–300 и 50–100 кДа были минорными, их выход составлял 0.8% и 0.4% соответственно. В моносахаридном составе этих фракций увеличивалось относительное содержание остатков галактозы, арабинозы и рамнозы и снижалось количество остатков галактуроновой кислоты. Содержание белка было максимальным во фракции SVC-I и составило 14%, тогда как во фракциях SVC-II и SVC-III обнаружены следовые количества белка.

Полученные данные указывают на то, что SVC представляет собой смесь пектин-белкового полимера, состоящего в основном из слабо разветвленных пектиновых фрагментов с молекулярной массой более 300 кДа и белка, и сильно разветвленного пектинового полисахарида с молекулярными массами 50–300 кДа. Для пектина сахарной свеклы также было показано, что он содержит смесь линейных молекул пектина, разветвленного пектинового полисахарида и комплекса пектина с белком [5].

**Таблица 2.** Характеристика фрагментов SVC, полученных в результате ферментативного гидролиза

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							ГУК, %	Белок, %
		Гал	Ара	Рам	Глю	Кси	Ман	сумма		
SVC-P	51.7*	3.0	1.8	0.5	0.8	0.4	0.7	7.2	55.3	9.2
SVC-PI	71.4**	2.2	1.6	0.5	0.5	0.2	0.6	5.6	54.0	12.8
SVC-PII	24.3**	2.3	2.0	0.9	0.5	0.2	0.2	6.1	78.1	0
SVC-PIII	1.1**	9.6	3.0	1.6	5.0	4.1	2.8	26.1	50.3	0
SVC-PIV	1.3**	8.4	2.6	2.8	5.9	3.0	3.7	26.4	11.6	0

\* Выход от фракции SVC.

\*\* Выход от фракции SVC-P.

В результате ферментативного гидролиза SVC с помощью пектиназы ( $\alpha$ -1,4-D-галактопиранозилураназа, КФ 3.2.1.15) с преобладающей эндо-активностью получена смесь фрагментов SVC-P, при разделении которой на ультрафильтрационных мембранах выявлены фракции, отличающиеся по молекулярной массе (табл. 2). Основным по выходу (71%) являлся фрагмент SVC-PI с молекулярной массой более 300 кДа, в составе которого преобладали остатки галактуронової кислоты, галактозы и арабинозы. Фрагмент SVC-PII с молекулярной массой 100–300 кДа отличался от SVC-PI более высоким содержанием галактуронової кислоты. Минорные фрагменты SVC-PIII (ММ 50–100 кДа) и SVC-PIV (ММ 10–50 кДа) имели более низкое содержание галактуронової кислоты и повышенное содержание нейтральных моносахаридных остатков. Белок (13%) обнаружен только в составе фракции SVC-PI.

Присутствие в большом количестве галактуронової кислоты, а также расщепление полисахарида с помощью пектиназы свидетельствует о том, что  $\alpha$ -1,4-D-галактуронан является главной углеводной цепью SVC, что подтверждает принадлежность этого полисахарида к классу пектинов. Содержание во фракциях SVC-PI–SVC-PIV остатков арабинозы и галактозы, обычно входящих в состав боковых цепей пектинов, а также присутствие остатков рамнозы свидетельствует о том, что образовавшиеся под действием пектиназы фрагменты углеводной цепи SVC содержат разветвленные участки, представленные рамногалактуронаном I. Боковые цепи силенана, скорее всего, представляют собой арабинаны, галактаны и (или) арабиногалактаны.

Присутствие в составе доминирующей фракции SVC-PI белка, который не отщеплялся от полисахарида после проведения ферментативного гидролиза, свидетельствует о том, что фракция SVC содержала пектин-белковые полимеры.

В результате жесткого кислотного гидролиза SVC получен фрагмент галактуронана SVC-G, в ко-

тором содержание остатков галактуронової кислоты равнялось 98%. Выход фрагмента составлял 54%.

Таким образом, макромолекула силенана состоит из линейных и разветвленных областей. Фрагмент линейной цепи галактуронана составляет более половины всей углеводной цепи силенана. Разветвленная область макромолекулы представлена рамногалактуронаном I. Присутствие в составе силенана белка, подтвержденное методами ионообменной хроматографии, ультрафильтрации и ферментативного гидролиза, указывает на то, что SVC представляет собой пектин-белковый полимер. SVC содержит смесь линейного и разветвленного пектинового полисахарида и комплекса пектина с белком.

Полученные сведения о составе, содержании и закономерностях биосинтеза силенана в каллусной культуре смолески обыкновенной необходимы для практического использования культуры клеток, в частности для получения суспензионных культур – продуцентов биологически активных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (грант “Молекулярная и клеточная биология”), совместным грантом УрО РАН и ДВО РАН, программы “Ведущие научные школы”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albersheim P., An J., Fleshour G., Fuller M.S., Guillen R., Ham K.-S., Hahn M.G., Huang J., O'Neil M., Whitcombe A., Williams M.V., York W.S., Darvill A.G. // *Biochem. Soc. Trans.* 1994. V. 22. P. 374–378.
2. Оводов Ю.С. // *Биоорган. химия.* 1998. Т. 24. № 7. С. 483–501.
3. Оводов Ю.С. // *Биоорган. химия.* 2009. Т. 35. № 3. С. 293–310.
4. Nothnagel E.A. // *Int. Rev. Cytol.* 1997. V. 174. P. 195–291.
5. Kirby A.R., MacDougal A.J., Morris V.J. // *Food Biophys.* 2006. V. 1. P. 51–56.
6. Keegstra K., Talmadge K., Bauer W.D., Albersheim P.H. // *Plant Physiol.* 1973. V. 51. P. 188–199.
7. Оводова П.Г., Бушинева О.А., Шапков А.С., Оводов Ю.С. // *Биоорган. химия.* 2000. Т. 26. № 9. С. 686–692.

8. Бушнева О.А., Оводова Р.Г., Шашков А.С., Чижов А.О., Оводов Ю.С. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 12. С. 1687–1696.
9. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // Phytochemistry. 2002. V. 59. № 7. P. 703–708.
10. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // Biotech. News Int. 2001. V. 6. № 1. P. 14–15.
11. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 1641–1645.
12. Гюнтер Е.А., Оводов Ю.С. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 8. С. 1079–1087.
13. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // J. Biotechnol. 2005. V. 117. P. 385–393.
14. Günter E.A., Kapustina O.M., Popeyko O.V., Ovodov Yu.S. // Carbohydr. Res. 2007. V. 342. P. 182–189.
15. Popov S.V., Popova G.Y., Ovodova R.G., Bushneva O.A., Ovodov Y.S. // Int. J. Immunopharmacol. 1999. V. 21. P. 614–622.
16. Гюнтер Е.А., Оводов Ю.С. // Прикл. биохимия микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 94–101.
17. Murashige T., Skoog S. // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 3. P. 473–479.
18. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. 1995. V. 38. № 1. P. 43–51.
19. York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T., Albersheim P. // Meth. Enzymol. 1985. V. 118. P. 3–40.
20. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350–356.
21. Williams P.A., Sayers C., Viebke C., Senan C., Mazoyer J., Boulenguer P.J. // J. Agric Food Chem. 2005. V. 53. P. 3592.

## Pectin Substances of the Callus Culture of *Silene vulgaris* (M.) G.

Ye. A. Gyunter and Yu. S. Ovodov

*Institute of Physiology, Komi Scientific Center, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia*  
*e-mail: gunter@physiol.komisc.ru*

Received September 6, 2009

**Abstract**—Pectin–protein fraction SVC was isolated from the callus culture of the bladder campion (*Silene vulgaris*). The main components in it were residues of D-galacturonic acid, galactose, arabinose, rhamnose, and protein. Using ion-exchange chromatography, ultrafiltration, and acid and enzymatic hydrolysis, it was shown that SVC contained a mixture of molecules of linear pectin, branched pectin polysaccharide, and pectin–protein polymer. A fragment of the linear chain of galacturonan amounted to more than half of the entire carbohydrate silenan chain. The branched area of the macromolecule is represented by rhamnogalacturonan I. The pectin–protein polymer consisted mainly of protein and weakly branched pectin fragments with molecular mass of more than 300 kDa.

УДК 575.631

## ДЫХАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК *Polyscias filicifolia* Bailey, *Stephania glabra* (Roxb.) Miers И *Dioscorea deltoidea* Wall

© 2011 г. М. В. Титова\*\*, Е. А. Беркович\*\*, О. В. Решетняк\*, И. Е. Куличенко\*,  
А. В. Орешников\*, А. М. Носов\*\*

\*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276

\*\*Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

e-mail: titomirez@newmail.ru

Поступила в редакцию 06.11.2009 г.

Охарактеризованы особенности дыхания культур клеток—продуцентов биологически активных соединений (изопреноиды и алкалоиды) с целью оптимизации продуктивности культур по росту и биосинтезу. Установлено, что исследуемые культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall (продуцент фураностаноловых гликозидов), *Stephania glabra* (Roxb.) Miers (продуцент алкалоида стефарина) и *Polyscias filicifolia* Bailey (комплекс биологически активных веществ) отличались как по общей интенсивности дыхания, так и по соотношению цитохромного и цианидрезистентного дыхания, причем изменения скорости общего поглощения кислорода и активности альтернативной оксидазы в процессе роста индивидуальны для каждой из исследуемых культур. Максимальная скорость поглощения кислорода для культур клеток *D. deltoidea* и *S. glabra* отмечена в период, предшествующий активному синтезу вторичных метаболитов (лаг-фаза для *D. deltoidea* и экспоненциальная фаза для *S. glabra*). Полученные закономерности могут быть использованы для дальнейшего мониторинга и регуляции роста и биосинтеза вторичных соединений в культурах клеток—продуцентов при глубинном культивировании.

Культуры клеток высших растений являются альтернативным способом получения растительно-го сырья для медицины, ветеринарии, парфюмерии и пищевой промышленности [1]. При создании эффективной технологии для реализации поставленных задач (синтез вторичных метаболитов, накопление биомассы, т.д.) необходимо учитывать особенности состояния клеток при выращивании *in vitro* [2, 3]. В частности, важную информацию об изменении физиологического состояния клеток в ходе ростового цикла можно получить при анализе дыхательной активности культур.

Дыхание растительных клеток — сложный регулируемый процесс, представляющий собой совокупность окислительно-восстановительных реакций, которые служат источником конвертируемых форм клеточной энергии в виде  $\Delta\mu_{H^+}$  и АТФ и промежуточных метаболитов, вовлекаемых в общий клеточный обмен и использующихся в различных биосинтезах [4]. Характерной особенностью электрон-транспортной дыхательной цепи (ЭЦ) клеток растений является наличие двух возможных путей переноса электронов — основного цитохромного (через ингибируемую цианидом цитохромоксидазу) и цианидрезистентного альтернативного пути (АП). Их вклад в общее поглощение кислорода варьирует в достаточно широких пределах и зависит от многих факторов, в частности от содержания и активности соответствующих ферментов, от степени восстановленности ЭЦ, доступности дыхательных субстратов и др. [5].

При АП обеспечивается передача электронов от убухинона на кислород в обход двух участков ЭЦ (комплексы III и IV), что является энергетически менее эффективным, чем использование цитохромного пути. Однако проведенные многочисленные исследования подтверждают важную роль АП в поддержании метаболизма растительной клетки. [6–10] Показано, что работа альтернативной оксидазы (АО) позволяет поддерживать функционирование цикла Кребса и осуществлять транспорт электронов в условиях ингибирования цитохромного пути [10]. Кроме того, АП регулирует баланс восстановленных переносчиков электронов, снижая возможность образования активных форм кислорода, а также может способствовать активному росту растительных клеток [6, 7]. Активация АП в ответ на неблагоприятные внешние воздействия (низкие температуры [11], условия окислительного стресса [6, 7], дефицит питательных компонентов [12]) говорит об участии АО в системе сигнальных механизмов защиты растительных клеток от стрессов различного типа [13, 14].

Суспензионные культуры клеток высших растений представляют собой популяцию соматических клеток, находящихся в относительно равных условиях, что позволяет использовать клетки *in vitro* в качестве экспериментальных модельных систем при изучении фундаментальных вопросов биологии клетки, в частности для исследования дыхательного метаболизма [13, 15, 16]. В этом аспекте большой интерес представляют трансгенные куль-

туры клеток с различной активностью АО [9, 17]. Измерение общей скорости поглощения кислорода является распространенным методом контроля метаболической активности растительных клеток *in vitro* при выращивании в колбах или аппаратном культивировании и может адекватно отражать реакцию культур клеток на изменение условий выращивания (изменение температуры, pH, осмотический стресс, ингибирование, дефицит питания) [13, 18]. Однако при глубинном культивировании растительных клеток до настоящего времени мало внимания уделялось исследованиям взаимосвязи различных путей дыхательного обмена с процессами роста клеток и синтезом вторичных метаболитов. Практический интерес также представляет сравнение вкладов цитохромного и цианидрезистентного дыхания для штаммов культур клеток высших растений, принадлежащих к разным видам, отличающихся механизмами адаптации к стрессовым условиям и по классам синтезируемых вторичных метаболитов.

Цель работы — исследование общей интенсивности дыхания и вклада различных путей дыхательного обмена в суммарное поглощение кислорода культурами — продуцентами вторичных метаболитов в связи с процессами роста и биосинтеза соответствующих соединений, а также оценка адекватности использования предложенной методики для экспресс-анализа изменений физиологического состояния популяции клеток *in vitro* в ходе глубинного культивирования в биореакторах.

## МЕТОДИКА

**Объекты исследования.** Использовали следующие суспензионные культуры клеток, депонированные в ВККК ВР ИФР РАН под соответствующими номерами:

1. *Dioscorea deltoidea* Wall, мутантный штамм—сверхпродуцент фураностаноловых гликозидов ИФР ДМ-0.5 (коллекционный № 6).

2. *Polyscias filicifolia* Bailey, коллекционный штамм ВФГ-001-95 (№ 58).

3. *Stephania glabra* (Roxb.) Miers, коллекционный штамм 113, продуцент алкалоида стефарина (№ 67).

Культуры выращивали в колбах объемом 2 л на модифицированных средах Мурасиге—Скуга. Для всех штаммов величина инокулюма находилась в пределах 2.4–2.8 г сухого материала/л среды при жизнеспособности культур 87–93%. Цикл субкультивирования составлял 2 нед. Культуры выращивали в темноте на качалке (80–100 об/мин) при 26–27°C и влажности 70–75%.

Для характеристики роста и физиологического состояния культур использовали массы сухих и сырых клеток, а также жизнеспособность и концентрацию клеток.

Жизнеспособность определяли под микроскопом, как процент не окрашиваемых 0.025%-ной

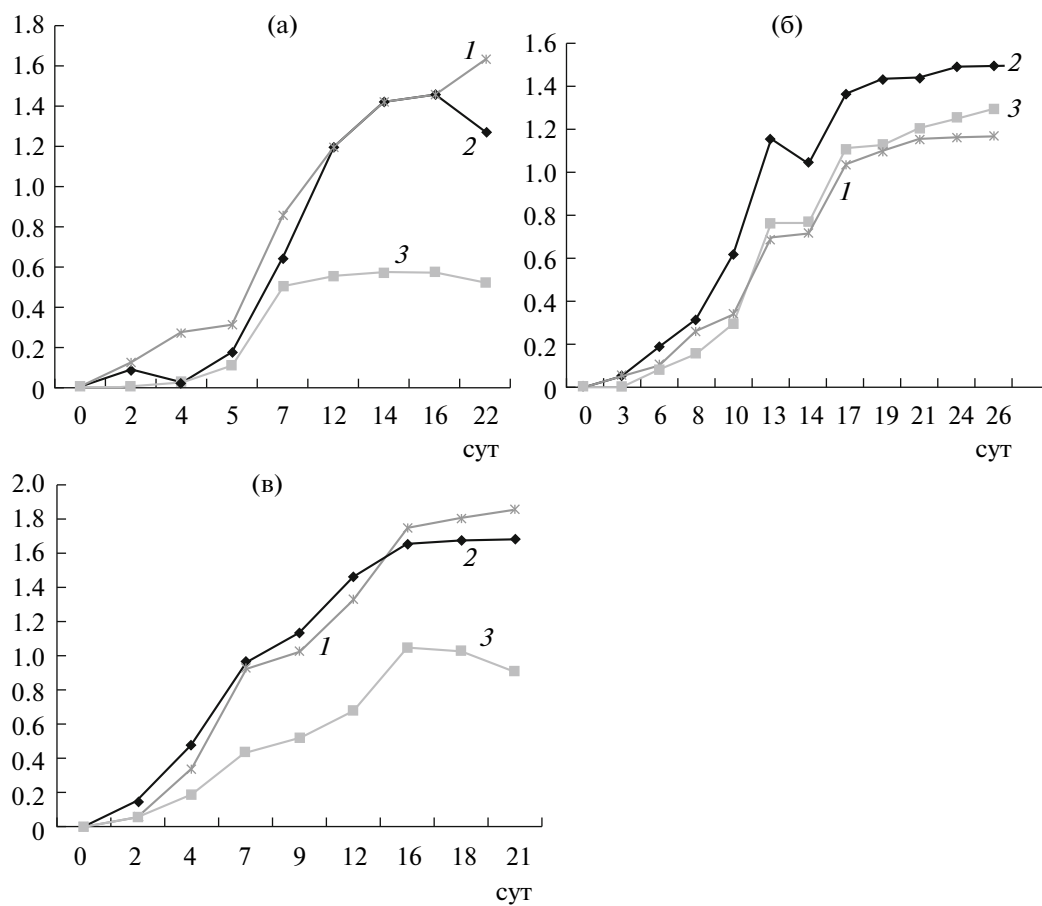
синькой Эванса клеточных агрегатов. Просчитывали не менее 250 агрегатов в трех повторностях.

Для подсчета числа клеток 0.5 мл суспензии инкубировали с 2.0–2.5 мл 20%-ного раствора хромовой кислоты при 60°C в течении 15–20 мин, в зависимости от возраста и типа суспензии. Число клеток просчитывали в камере Фукса—Розенталя.

**Полярографический метод.** Определение вкладов различных путей дыхания в общее поглощение кислорода производили при помощи полярографической установки с ячейкой открытого типа и электродом Кларка при 27°C. Для измерений использовали суспензию клеток (из расчета 10 и 40 г сырой биомассы клеток/л среды). Для определения вклада различных путей дыхания использовали ингибиторы: 5 мМ азид натрия, подавляющий цитохромсидазный комплекс, и 10 мМ салицилгидроксамовую кислоту, блокирующую АП. Уровень альтернативного дыхания определяли по разнице в скорости поглощения кислорода под воздействием соответствующих ингибиторов. Остаточное дыхание, связанное с функциями цитоплазматических оксидаз, определяли как уровень поглощения кислорода (в %), который оставался после внесения обоих ингибиторов.

**Спектрофотометрический метод определения фураностаноловых гликозидов (олигофураностанозиды).** Навески биомассы (50–200 мг) экстрагировали 70%-ным водными метанолом (концентрация олигофураностанозидов в экстракте в пределах 0.01–0.20 мг/мл). После осаждения клеточной биомассы в отдельные пробирки отбирали 0.20 мл супернатанта, добавляли 0.50 мл реактива Эрлиха (1%-ный раствор п-диметламинобензальдегида в смеси соляная кислота—метанол, 34 : 66 v/v), выдерживали при 50 ± 1°C в течение 2 ч. После охлаждения доводили объем до 2.2 мл и измеряли поглощение при 520 нм. Концентрацию олигофураностанозидов вычисляли по калибровочному графику, построенному по чистому препарату дельтозида [19].

**Анализ алкалоида стефаглабрина сульфата.** 60 мг высушенной биомассы культуры клеток *S. glabra* заливали 1 мл водного раствора 0.1%-ной серной кислоты, перемешивали и оставляли на 18–20 ч. 6 мкл надосадочной жидкости наносили микрошприцом на ТСХ-пластины с сорбентом Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (“Merck”, Германия). Пластины хроматографировали в системе растворителей хлороформ—бензол—этанол—25%-ный раствор аммиака (50 : 80 : 100 : 0.02). R<sub>f</sub> стефарина около 0.25 [20]. Количественную оценку содержания алкалоида проводили путем денситометрирования пятна стефаглабрина на пластинке при 254 нм (денситометр ЗАО “Сорбполимер”, Россия). Для расчета использовали метод абсолютной калибровки с учетом влажности исследуемой биомассы. В качестве стандарта и для построения калибровочной кривой использовали спиртовые растворы стефаглабрина сульфата (ВИЛР, Россия).



**Рис. 1.** Динамика роста и физиологические характеристики суспензионных культур клеток *D. deltoidea* (а), *P. filicifolia* (б) и *S. glabra* (в) в полулогарифмической системе координат: 1 – масса сырых клеток,  $\ln X/X_0$ ; 2 – масса сухих клеток,  $\ln X/X_0$ ; 3 – концентрация клеток,  $\ln X/X_0$ .

Предел детектирования для стефаглабина сульфата – 0.1 мкг в пятне.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Динамика роста и биосинтеза.** Для всех штаммов исследовали ростовые характеристики и получили типичные S-образные кривые роста по всем изученным параметрам (масса сырых и сухих клеток,

жизнеспособность и концентрация клеток). На рис. 1 представлены соответствующие графики, построенные в полулогарифмической системе координат. Кроме того, были рассчитаны индекс роста ( $I$ ), удельная скорость роста ( $\mu$ ), время удвоения ( $T$ ) и экономический коэффициент ( $Y$ ) (табл. 1). Уточненные по графикам границы фаз ростовых циклов показаны в табл. 2. Кроме того, для культур клеток *D. deltoidea* и *S. glabra* была изучена динамика на-

**Таблица 1.** Границы фаз ростового цикла культур

Культура	Границы фаз ростового цикла, сут					
	лаг-фаза	ускорения	экспоненциальная	замедления	стационарная	деградации
<i>D. deltoidea</i>	0–4	4–5	5–12	12–14	14–16	с 16 до конца цикла
<i>P. filicifolia</i>	0–5	5–8	8–17	17–19	с 19 до конца цикла	–
<i>S. glabra</i>	0–3	3–5	5–12	12–16	16–20	с 20 до конца цикла

Таблица 2. Ростовые характеристики культур\*

Культура	$M_{\text{макс}}$ , г	$v$ , %	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	$T$ , сут	$Y$	$I$
<i>D. deltoidea</i> Wall	9.3	87–93	0.14	4.92	0.31	3.2
<i>P. filicifolia</i> Bailey	11.1	89–96	0.30	2.29	0.37	3.9
<i>S. glabra</i> (Roxb.) Miers	14.5	85–92	0.34	2.07	0.48	4.7

\*  $M_{\text{макс}}$  – максимальное значение концентрации биомассы по сухому весу;  $v$  – жизнеспособность клеток;  $\mu$  – удельная скорость роста клеток;  $T$  – время удвоения биомассы;  $Y$  – экономический коэффициент;  $I$  – индекс роста.

копления вторичных метаболитов – фураностаноловых гликозидов и алкалоида стефарина соответственно (рис. 2).

Для исследуемых культур лаг-фаза роста находилась в пределах 3–5 сут, а фаза экспоненциального роста – 7–9 сут. Характерной особенностью роста культуры клеток *D. deltoidea* являлась короткая фаза стационара (около 2 сут, рис. 1а), что может быть специфическим признаком этой культуры [21, 22]. Стационарная фаза для культуры клеток *P. filicifolia* наступала довольно поздно (19 сут) и характеризовалась значительной продолжительностью (в течение эксперимента фазу деградации зафиксировать не удалось ни по одному из измеряемых параметров, рис. 1б).

Наиболее высокие ростовые показатели наблюдали для суспензионной культуры *S. glabra*, для которой были получены максимальные значения накопления сухой биомассы ( $M_{\text{макс}}$ ),  $\mu$ ,  $Y$  и  $I$  (14.5 г/л, 0.34 сут<sup>-1</sup>, 0.48 и 4.7 соответственно, табл. 2, рис. 1в).

Для культур–продуцентов *D. deltoidea* и *S. glabra* отмечены характерные отличия в динамике накопления вторичных метаболитов. Так, при культивировании в колбах объемом 2 л для *D. deltoidea* актив-

ный синтез фураностаноловых гликозидов сохранялся на протяжении всего цикла роста, причем максимум наблюдали в основном в стационарной фазе (12–16 сут, рис. 2а). У суспензионной культуры *S. glabra* активный синтез приходился на фазу замедления роста и начало стационарной фазы с пиком синтеза на 12–14 сут (рис. 2б).

Для всех штаммов отмечена характерная для культур растительных клеток несбалансированность роста по различным критериям, связанная с растяжением клеток в заключительные стадии ростового цикла (по массе сырых клеток) и частичной синхронизацией деления клеток (по числу клеток).

**Вклад АП в общее поглощение кислорода.** Для оценки соотношения различных путей дыхательного метаболизма применяли ингибиторный анализ, который при некоторых допущениях позволяет проследить действие различного рода субстратов и ингибиторов на процесс дыхания. Следует отметить, что по современным представлениям определить точный вклад цитохромного и альтернативного дыхания в общее поглощение кислорода с помощью ингибиторного анализа достаточно сложно, поскольку два пути конкурируют между собой, и при подавлении одного из них часть электронов пе-

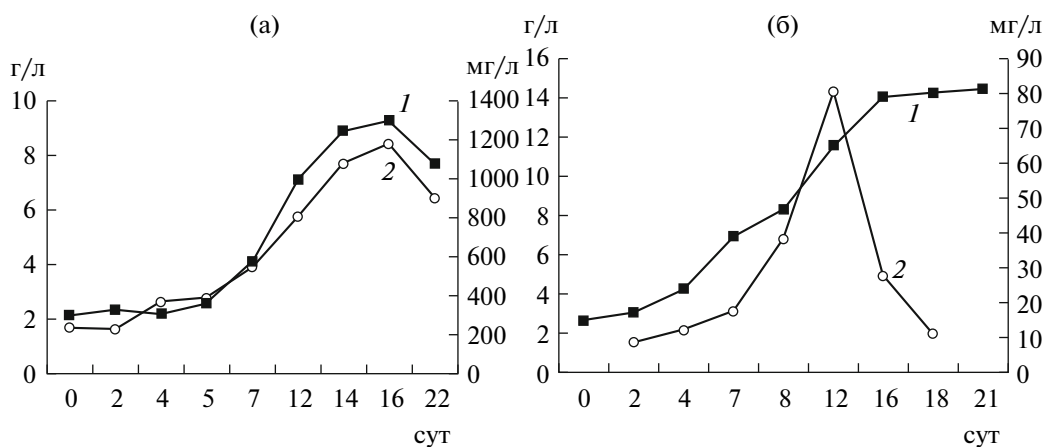


Рис. 2. Динамика накопления вторичных метаболитов в процессе роста суспензионных культур клеток: фураностаноловые гликозиды *D. deltoidea* (а) и алкалоид стеффарин *S. glabra* (б): 1 – масса сухих клеток, г/л; 2 – содержание фураностаноловых гликозидов, мг/л среды; 3 – содержание алкалоида стеффарина, мг/л среды.

**Таблица 3.** Общая скорость поглощения кислорода (мг O<sub>2</sub>/ч г сухой биомассы) на разных стадиях роста в исследуемых культурах и вклад АО в общее поглощение кислорода (% от общей интенсивности дыхания)

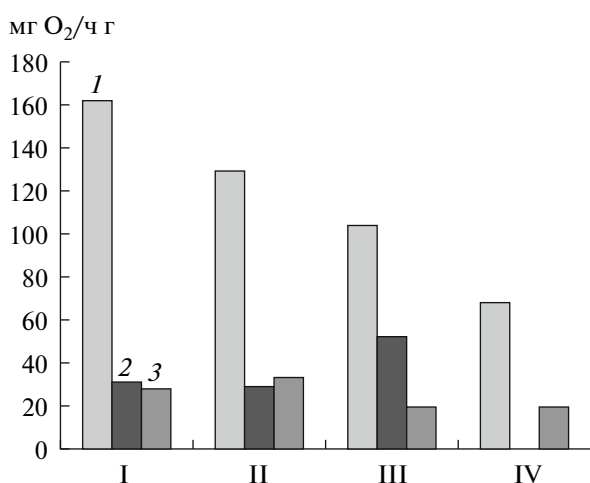
Общая скорость, мг O <sub>2</sub> /ч г сухой биомассы			
Фазы ростового цикла	<i>D. deltoidea</i>	<i>P. filicifolia</i>	<i>S. glabra</i>
Лаг-фаза	161.75 ± 19.19	30.39 ± 2.24	27.8 ± 7.39
Экспоненциальная	129.04 ± 3.47	29.12 ± 1.63	32.9 ± 0.57
Стационарная	103.65 ± 6.21	52.43 ± 1.46	19.46 ± 4.44
Деградации	68.1 ± 2.33	фаза не зафиксирована	19.02 ± 0.21
Вклад АО, %			
Лаг-фаза	21.9 ± 2.4	43.7 ± 10.59	61.7 ± 1.25
Экспоненциальная	35.1 ± 3.32	52.0 ± 1.95	54.65 ± 7.73
Стационарная	29.1 ± 8.15	43.4 ± 2.03	35.9 ± 6.34
Деградации	18.7 ± 2.26	фаза не зафиксирована	20.8 ± 0.48

ретекает на другой путь, активность которого возрастает. Однако для оценки потенциальных возможностей альтернативного дыхания такой метод применяется и активно используется.

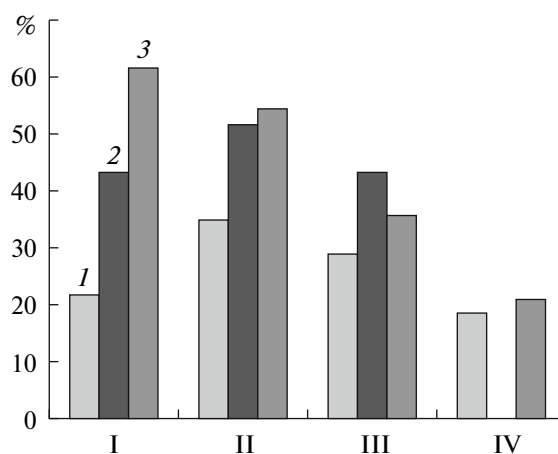
В табл. 3, а также на рис. 3 и 4, представлены результаты измерений изменения общей скорости дыхания исследуемых культур в течение ростового цикла, а также доля в этом процессе АО.

Все исследуемые штаммы суспензионных культур растительных клеток отличались по общей скорости поглощения кислорода. Наиболее высокий уровень дыхательного метаболизма был получен для

клеток *D. deltoidea*. На протяжении всего цикла роста общая интенсивность дыхания этой культуры была в 3–4 раза выше, чем у *P. filicifolia* и *S. glabra* (табл. 3, рис. 3). Также отмечены различия в динамике изменения общей скорости поглощения кислорода для разных культур по фазам ростового цикла. Максимальные значения для *D. deltoidea* наблюдали в лаг-фазе (161.75 ± 19.19 мг O<sub>2</sub>/ч г сухой биомассы, табл. 3) с постепенным снижением общей интенсивности дыхания в последующие фазы роста. Для суспензионных культур *P. filicifolia* и *S. glabra* в лаг-фазе и экспоненциальной фазе общая скорость поглощения



**Рис. 3.** Общая скорость дыхания (мг O<sub>2</sub>/ч г сухой биомассы) на разных стадиях роста культур *D. deltoidea* (1), *P. filicifolia* (2) и *S. glabra* (3). I – лаг-фаза, II – экспоненциальная, III – стационарная, IV – деградации.



**Рис. 4.** Вклад АО в общее поглощение кислорода на разных стадиях роста культур *D. deltoidea* (1), *P. filicifolia* (2) и *S. glabra* (3) (% от общей интенсивности дыхания). Обозначения фаз см. на рис. 3.



кислорода изменялась незначительно, однако в стационарной фазе отмечено повышение дыхательной активности для *P. filicifolia* (до  $52.43 \pm 1.46$  мг  $O_2$ /ч г сухой биомассы) и незначительное снижение этого показателя для *S. glabra* (табл. 3, рис. 3).

У исследуемых культур клеток вклад цитохромного и альтернативного путей дыхания в общее поглощение кислорода существенно отличался. Скорость общего поглощения кислорода для *D. deltoidea* на протяжении всего ростового цикла в большей степени была обеспечена митохондриальным дыханием (рис. 4), при этом наибольший вклад АО наблюдался в экспоненциальной фазе роста ( $35.1 \pm 3.32\%$ , табл. 3).

Напротив, для культуры клеток *P. filicifolia* оказалась характерной высокая активность АО в течение всего цикла выращивания. Вклад АО не опускался ниже 43% (рис. 4) и достигал максимальных значений в экспоненциальной фазе ( $52.0 \pm 1.95\%$ , табл. 3).

Наибольшая скорость общего поглощения кислорода для *S. glabra* была зафиксирована в экспоненциальной фазе роста ( $32.9 \pm 0.57$  мг  $O_2$ /ч г сухой биомассы, табл. 3), в большей степени она была обеспечена вкладом АО ( $54.65 \pm 7.73\%$ , табл. 3), активность которой была максимальна в лаг-фазе и постепенно снижалась в течение последующих стадий роста (рис. 4).

Отмечены характерные различия в изменении интенсивности общего дыхания клеток в процессе выращивания, а также в динамике активности АО, что позволяет использовать дыхательную активность как дополнительную характеристику, отражающую особенности изменения физиологического состояния клеток культур—продуцентов в процессе роста.

При анализе полученных результатов отмечена корреляция между изменением интенсивности дыхания и динамикой накопления вторичных метаболитов для культур—продуцентов *D. deltoidea* и *S. glabra*. Наибольшую скорость поглощения кислорода фиксировали в период, предшествовавший началу активного синтеза вторичных метаболитов (лаг-фаза для *D. deltoidea* и экспоненциальная фаза для *S. glabra*).

Представленные данные позволяют сделать вывод, что дыхательная активность культур клеток высших растений—продуцентов соответствующих метаболитов является информативной характеристикой физиологического состояния культуры и может быть использована для мониторинга и оптимизации роста клеток при масштабировании процесса культивирования, в частности дает возможность точнее определять условия и время для воздействия на биосинтез вторичных метаболитов при вводе элиситоров или предшественников синтеза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DiCosmo F., Misawa M. // Biotechnol. Adv. 1995. № 3. P. 425–453.
2. Kieran P.M., MacLoughlin P.F., Malone D.M. // J. Biotechnol. 1997. V. 59. № 1. P. 39–52.
3. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. // Phytochem. Rev. 2002. № 1. P. 13–25.
4. Day D.A., Arron G.P., Laties G.G. // Biochemistry of Plants / Ed. D.D. Davies. N.-Y.: Acad. Press, 1980. V. 2. P. 197–241.
5. Geraldde-Laakso S., Arrabaca J.D. // Plant Physiol. Biochem. 1997. V. 35. № 11. P. 897–903.
6. Wagner A.M., Moore A.L. // Biosci. Rep. 1997. V. 17. № 3. P. 319–333.
7. Parsons H.L., Yip J.Y.H., Vanlerberghe G.C. // Plant Physiol. 1999. V. 121. № 4. P. 1309–1320.
8. Шугаев А.Г., Соколова С.В. // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 1. С. 55–61.
9. Головки Т.К., Пыстина Н.В. // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 6. С. 846–853.
10. Шугаев А.Г., Шугаева Н.А., Выскребенцева Е.И. // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 4. С. 503–510.
11. Duque P., Arrabaca J.D. // Physiol. Plant. 1999. V. 107. № 1. P. 24–31.
12. Рахманкулова З.Ф., Федяев В.В., Подашевка О.А., Усманов И.Ю. // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 2. С. 206–212.
13. Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Millar A.H., Day D.A., Whelan J. // Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. № 2. P. 193–212.
14. Ferreira A.L., Arrabaca J.D., Vaz-Pinto V., Lima-Costa M.E. // Biologia Plant. 2008. V. 52. № 1. P. 66–71.
15. Носов А.М. // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.
16. McDonald A.E., Sieger St.M., Vanlerberghe G.C. // Physiol. Plant. 2002. V. 116. № 2. P. 135–143.
17. Robson C.A., Vanlerberghe G.C. // Plant Physiol. 2002. V. 129. № 4. P. 1908–1920.
18. Seletzky J.M., Noack U., Hahn S., Knoll A., Amoabediny G., Buchs J. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 34. № 2. P. 123–130.
19. Васильева И.С., Воробьев А.С., Горская Н.В., Липский А.Х., Гуриелидзе К.Г., Пасешиченко В.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 28. № 5. С. 692–697.
20. Давыденков В.Н., Тареева Н.В., Кирьянов А.А., Бондаренко Л.Т. // Хим.-фарм. журнал. 1988. Т. 2. № 3. С. 326–328.
21. Липский А.Х., Черняк Н.Д. // Физиология растений. 1983. Т. 30. № 3. С. 437–447.
22. Орешников А.В., Носов А.М., Манаков М.Н. // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 6. С. 918–922.

## Breathing Activity of Suspension Culture of Cells of *Polyscias filicifolia* Bailey, *Stephania glabra* (Roxb.) Miers, and *Dioscorea deltoidea* Wall

M. V. Titova<sup>b</sup>, E. A. Berkovich<sup>b</sup>, O. V. Reshetnyak<sup>a</sup>, I. E. Kulichenko<sup>a</sup>,  
A. V. Oreshnikov<sup>a</sup>, and A. M. Nosov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia  
e-mail: titomirez@newmail.ru

<sup>b</sup> Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

Received November 6, 2009

**Abstract**—Peculiarities of breathing of cultures of cells producing biologically active compounds (isoprenoids and alkaloids) were investigated in order to optimize productivity of culture growth and biosynthesis. It had been revealed that studied cultures of cells of *Dioscorea deltoidea* Wall (producer of furistanol glycosides), *Stephania glabra* (Roxb.) Miers (producer of stepharin alkaloid) and *Polyscias filicifolia* Bailey (complex of biologically active agents) differ both in joint breathing activity and in ratio between cytochrome and cyanide-resistant breathing, while changes of rate of total oxygen consumption and activity of alternative oxidase during growth were found to be individual for every investigated culture. Maximum rate of oxygen consumption for cells of *D. deltoidea* and *S. glabra* was marked in the period preceding active synthesis of secondary metabolites (lag phase for *D. deltoidea* and exponential phase for *S. glabra*). The revealed trends can be used for further monitoring and regulation of growth and biosynthesis of secondary metabolites in producing cell cultures during deep cultivation.

УДК 581.19

## ВЛИЯНИЕ ВЛАГОТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ НА БЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

© 2011 г. Н. В. Кораблёва, Т. Д. Касимова

*Институт химии растительных веществ АН РУз им. С.Ю. Юнусова, Узбекистан, Ташкент 100170  
e-mail: nadya1477@rambler.ru*

Поступила в редакцию 09.12.2009 г.

Исследовано влияние различных температурных режимов влаготепловой обработки в диапазоне от 40 до 80°C на белковые фракции зерна пшеницы, выращенной в природно-климатических условиях Узбекистана. Методами обращенно-фазовой и эксклюзионной хроматографии установлено, что проведение влаготепловой обработки вызывает уменьшение экстрактивности и изменение соотношения высоко- и низкомолекулярных компонентов. При этом повышение температуры обработки выше 60°C во всех случаях, за исключением фракции глютеинов, приводило к уменьшению высокомолекулярных компонентов с одновременным увеличением количества низкомолекулярных. Глютеиновая фракция была более подвержена воздействию высоких температур и обладала большей способностью к агрегации, происходящей в основном за счет компонента с молекулярной массой 113.42 кДа. Уменьшение количества свободных сульфгидрильных групп в клейковине пшеницы и ее фракциях при повышении температуры обработки указывало на их окисление с образованием новых межмолекулярных дисульфидных связей, что приводило к агрегации белков и способствовало укреплению клейковины.

Одним из основных процессов подготовки зерна к помолу, качественно улучшающих его продовольственное использование, является обработка зерна влагой и теплом. При этом различные температурные режимы процесса позволяют, в той или иной степени воздействовать на весь технологический комплекс переработки зерна с целью его улучшения, а также обеспечивать наибольший выход готовой продукции – муки и крупы с лучшими показателями качества и наименьшей затратой энергии.

Основным белковым компонентом зерна пшеницы является клейковина, которая представляет собой высокополидисперсную, полимерную систему, состоящую из высоко- и низкомолекулярных белковых компонентов – глиадины и глютеина [1–8]. Наибольший интерес представляет изучение воздействия температуры на белковые компоненты различного размера и структуры.

Определение качественных изменений, происходящих в белках при тепловом воздействии, проводилось с использованием таких методов анализа, как гельфильтрация [9, 10] электрофорез [11, 12, 15] высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [12–14, 19]. Так, Сингх и МакРичи, используя ВЭЖХ [12], обнаружили, что в воднодиспергированной клейковине, нагретой до 100°C, только высокомолекулярные глютеины проявляют полимеризацию, а глиадины не образуют олигомеров. К противоположному выводу пришли Лагрейн с соавт. [13]. Изучая воздействие нагрева и охлаждения на физико-химические свойства водно-клейковинной суспензии пшеницы, они отме-

тили, что выдерживание клейковины при 95°C приводило к полимеризации как глютеина, так и глиадины. Большинство исследователей [8–26] указывали также на то, что во время тепловой обработки влажной клейковины происходило уменьшение растворимости и экстрактивности белковых веществ за счет изменения конформационного состояния клейковинных белков и открытия гидрофобных групп.

Воздействие температуры на белки альбуминовой и глобулиновой фракций пшеницы изучено мало. Шомер с соавт. [18] отметили, что низкомолекулярные фракции как альбуминов, так и глобулинов обладают большей устойчивостью к воздействию высоких температур, чем высокомолекулярные, которые склонны к коагуляции при более низкой температуре.

Большая часть исследователей [3–21] проводила изучение изменений, происходящих в изолированных белковых фракциях, водные суспензии которых подвергались нагреву при различной температуре.

Цель работы – определение изменений, происходящих с белковыми фракциями в целом зерне, подвергнутом процессу влаготепловой обработки при различных температурных режимах в условиях, близких к производственным, и влияния состава и соотношения белковых фракций на реологические свойства клейковины.

## МЕТОДИКА

Для исследования использовали мягкую пшеницу *Triticum aestivum* L. выращенную в Узбекистане, сорта Крошка, урожая 2006 и 2008 гг., со следующими показателями качества: влажность — 9.69%, стекловидность — 52%, масса 1000 зерен — 40 г, натура — 780 г/л, содержание клейковины — 25.3%, общий белок ( $N \times 5.7$ ) — 15.2%, зольность — 1.86%.

**Проведение влаготепловой обработки.** Навески зерна пшеницы (100 г) увлажняли до 16%. Необходимое количество воды рассчитывали по формуле [25]. Затем навески зерна выдерживали в течение 10 мин в термостате при температуре 40, 50, 60, 70 и 80°C. Обработанное таким образом зерно пшеницы оставляли в закрытых емкостях при комнатной температуре на 5 ч, после чего измельчали на лабораторной мельничке ЭКМУ 50 (Россия), и использовали для дальнейшего анализа.

**Выделение белковых фракций.** Экстракцию белковых фракций из измельченных образцов пшеницы проводили по методу [27]. Растворимые белки экстрагировали 0.1 М раствором фосфатного буфера, рН 7.0, содержащего 1 М раствор NaCl, с последующим диализом против дистиллированной воды. Глиадиновую фракцию выделяли из осадка, после отделения альбуминов и глобулинов, путем экстракции 70%-ным этанолом. Глютенин выделяли при помощи 0.05 н. раствора NaOH после удаления спиртовой фракции глиадинов. Определение белка в выделенных фракциях проводили по измерению поглощения  $E$  при 260 и 280 нм с расчетом концентрации  $C$  по формуле:  $C_{\text{мг/мл}} = 1.45 E_{280} - 0.74 E_{260}$  [28]. Полученные белковые фракции анализировали методом ВЭЖХ.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).** Анализ проводили на приборе марки АТ серии 1100, фирмы “Agilent technologist” (США), с использованием дегазатора, насоса для подачи растворителей, автоматического ввода пробы (автосамплер), термостата колонки и диодноматричного детектора (ДМД):

а) *Обращенно-фазовая хроматография.* Колонка — марки Zorbax Agilent Eclipse XDB-C8, фирмы “Agilent technologist” (США), 125 × 2 мм, 5 мкм; подвижная фаза: **раствор А** — дистиллированная вода, содержащая 0.1% ТФУ, **раствор В** — ацетонитрил, также содержащий 0.1% ТФУ. Разделение проводили, используя линейный градиент концентрации раствора В от 15 до 50% в течение 50 мин с возвратом до первоначального уровня (15%) в течение последующих 10 мин. Скорость потока — 1 мл/мин, термостатирование колонки при 50°C. Концентрация белков в растворах — 1 мг/мл. Детектирование пиков проводили при длине волны 210 нм;

б) *Эксклюзионная хроматография.* Колонка — марки Zorbax GF-250, фирмы “Agilent technologist” (США), 4.6 × 250 мм, 4 мкм с использованием предколонки марки Zorbax diol, 4.6 × 12.5 мм, 5 мкм; по-

движная фаза: для растворимых белков (альбумины и глобулины) — 0.1 М натрий-фосфатный буфер, рН, 7.0, содержащий 0.1 М раствор NaCl; подвижная фаза для клейковинообразующих белков (глиадины и глютенины) — 0.1 М натрий-фосфатный буфер, рН 7.0, содержащий 0.1%-ный додецилсульфата натрия (ДДС-Na). Образцы глиадина и глютенина перед анализом разводили в рабочем буфере, но содержащем 2% ДДС-Na. Концентрация белков в растворах — 1 мг/мл. Для всех белковых фракций использовали скорость потока 0.25 мл/мин, термостатирование колонки при 28°C и детектирование пиков при длине волны 210 нм.

Для определения молекулярной массы (ММ) белков колонка предварительно была откалибрована при помощи стандартных растворов белков с известной молекулярной массой (кДа): иммуноглобулин — 160, бычий сывороточный альбумин — 67, овальбумин — 45, ингибитор трипсина — 20. Молекулярную массу определяли путем построения калибровочного графика, используя в качестве параметров зависимость логарифма ММ белков (ось ординат) от их объема удерживания, определяемом, как произведение времени удерживания на скорость потока (ось абсцисс).

**Выделение клейковины.** Клейковину выделяли по стандартной методике [29], отмывая крахмал и оболочку в проточной воде. Реологические свойства клейковины определяли на приборе — измерителе деформации клейковины “ИДК-1” (Россия).

**Определение хлебопекарных свойств муки из зерна, обработанного при различных условиях влаготепловой обработки.** Оценку качества муки, полученной из зерна, обработанного при различных условиях влаготепловой обработки, проводили методом пробной лабораторной выпечки.

**Определение свободных сульфгидрильных групп.** Навески отмытой клейковины 0.1–0.2 г, тщательно суспендировали в 10 мл рабочего буфера (0.05 М натрий-фосфатный буфер, рН 6.5, содержащего 2% об./об. додецилсульфата натрия (ДДС-Na), 3.0 М мочевины и 1 мМ натрий этилендиамин тетраацетат (трилон Б)). В подготовленных образцах клейковины измеряли количество белка по поглощению при 260, 280 нм [28]. Навески 10–20 мг гидрофильно высушенных фракций глиадина и глютенина растворяли в 10 мл рабочего буфера (концентрация белка в растворе 1–2 мг/мл). Свободные сульфгидрильные группы в подготовленных растворах определяли колориметрически при 412 нм после реакции с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислотой) (реактив Элмана) по методике, предложенной Б. Лагрейном с соавт. [13]

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных проводили при помощи компьютерной программы “Microsoft Excel” с использованием общепринятых статистических критериев [30]. Полученные значения достоверно отлича-

**Таблица 1.** Содержание белка (мг/г зерна) в белковых фракциях зерна пшеницы, обработанной при различной температуре проведения влаготепловой обработки ( $n = 6$ )

Фракция	Температура обработки, °С					
	контроль	40	50	60	70	80
Альбумины	15.23 ± 0.37	14.40 ± 0.29	12.87 ± 0.20*	12.90 ± 0.37*	10.90 ± 0.40*	8.83 ± 0.2*
Глобулины	4.83 ± 0.10	6.72 ± 0.26*	8.77 ± 0.32*	6.58 ± 0.19*	5.90 ± 0.23*	4.80 ± 0.12
Глиадины	49.23 ± 0.23	47.10 ± 0.23*	46.62 ± 0.17*	46.02 ± 0.10*	45.27 ± 0.18*	45.30 ± 0.11*
Глютенины	45.16 ± 0.10	42.57 ± 0.12*	41.17 ± 0.27*	34.53 ± 0.14*	33.87 ± 0.18*	31.66 ± 0.24*
Суммарный извлеченный белок, % от общего содержания белка	75.3	72.9	72.08	65.8	63.19	59.45

\* Вероятность ошибочной оценки  $P < 0.05$ .

лись от контрольного показателя при вероятности ошибочной оценки не более чем в 5% случаев —  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пшеницу сорта Крошка подвергали влаготепловой обработке в диапазоне от 20 до 80°C и определяли экстрактивность основных белковых фракций. Содержание белка в выделенных фракциях в зависимости от температуры обработки пшеницы приведены в табл. 1. Увеличение температуры воздействия на зерно пшеницы приводило к уменьшению экстрактивности белковых веществ. Суммарное содержание извлеченного белка с повышением температуры обработки снижалось в среднем на 15.9%, что было связано, по-видимому, с изменением конформации белковых фракций и увеличением нерастворимого белкового остатка. На фоне уменьшения экстрактивности белковых фракций в глобулиновой фракции наблюдали сначала увеличение содержания белка до 8.77 мг/г при 50°C с последующим его снижением до 4.8 мг/г при 80°C. Данное явление, возможно, связано с тем, что глобулиновая фракция содержит в своем составе основную часть ферментов, в том числе протеаз, и повышение температуры обработки до 50°C способствует их активизации, сопровождаемой расщеплением и увеличением растворимости ранее не растворимых белковых компонентов. Дальнейшее увеличение температуры приводило к их ингибированию, вызванному частичной тепловой денатурацией. Полученные результаты хорошо согласуются с данными других исследователей, в том числе Буфф и Шофелда [1, 2], отмечающими уменьшение

гидрофобности белковых фракций при тепловой обработке их водных суспензий.

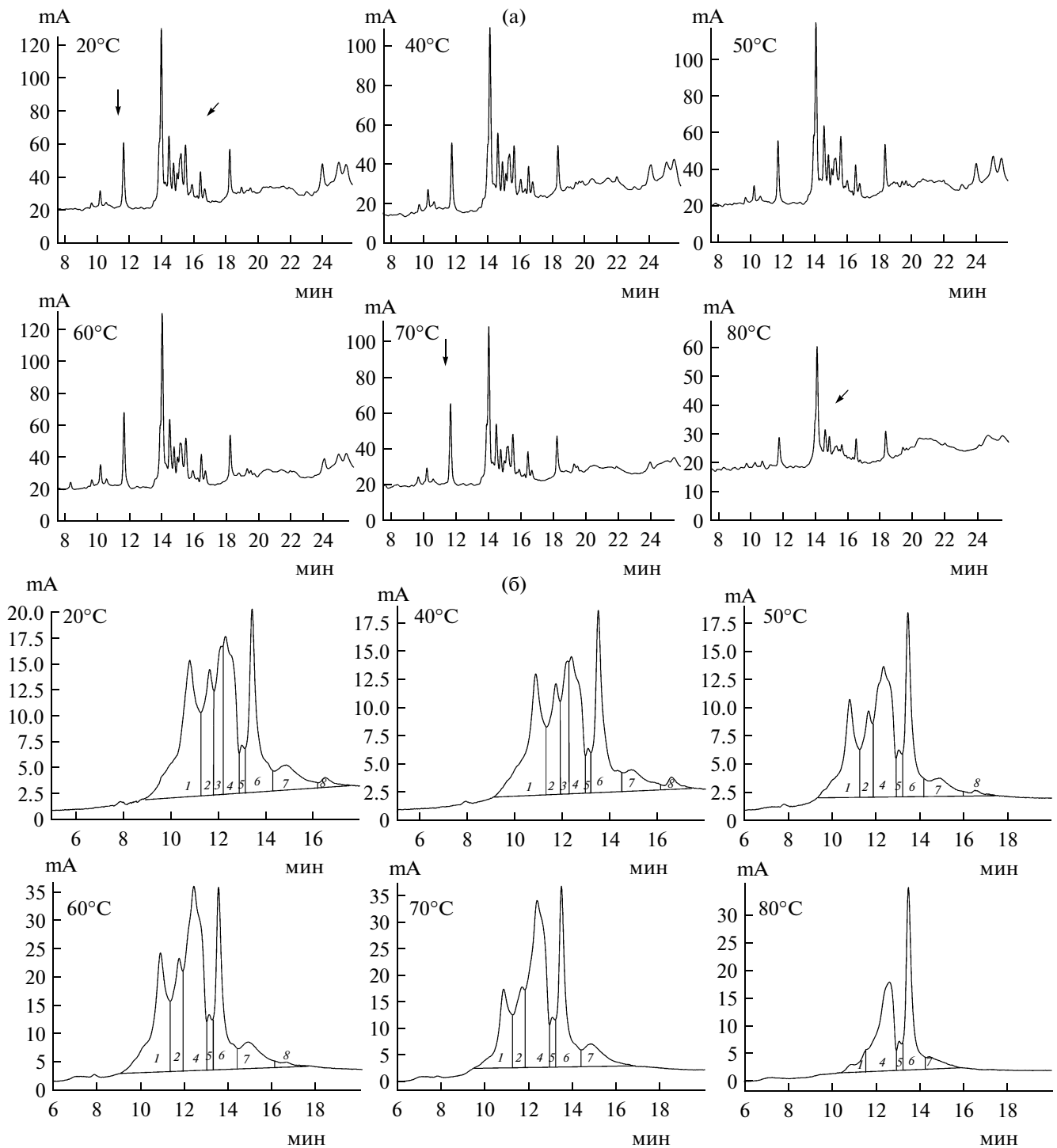
Влияние различной температуры влаготепловой обработки зерна пшеницы на белковые фракции определяли при помощи обращенно-фазовой и эксклюзионной ВЭЖХ.

На рис. 1 приведены хроматограммы профиля элюции альбуминовой фракции при влаготепловой обработке. Увеличение температуры до 60°C не вызывало каких-либо существенных изменений. Однако при 80°C наблюдали резкое уменьшение площади всех основных пиков, а также исчезновение минорных компонентов в диапазоне времени от 8 до 12 мин и от 14 до 16 мин (рис. 1а).

Изменения, происходящие с компонентами альбуминовой фракции различной молекулярной массы под влиянием влаготепловой обработки, приведены на рис. 1б.

Из полученных хроматограмм видно, что компоненты с разной молекулярной массой претерпевают неодинаковые изменения.

Первоначально альбуминовая фракция состояла из 8 компонентов (рис. 1б). В количественном соотношении преобладающими были компоненты с ММ 56.04 и 25.24 кДа. Увеличение температуры обработки от 20 до 80°C вызывало уменьшение содержания высокомолекулярных компонентов с ММ 56.04 кДа с 26.7 до 16.4%, а также приводило к полному расщеплению белков с ММ 42.14 и 27.04 кДа и одновременному увеличению низкомолекулярных — 25.24 и 12.82 кДа, площадь пиков которых увеличилась с 20.6 до 33.05% и от 18.1 до 37.9% соответственно (рис. 1б, табл. 2).



**Рис. 1.** Хроматограммы альбуминовой фракции при различных температурных режимах влаготепловой обработки: а – обращенно-фазовая хроматография; б – эксклюзионная хроматография, ММ компонентов (кДа): 1 – 56.04, 2 – 42.14, 3 – 27.04, 4 – 25.24, 5 – 17.21, 6 – 12.82, 7 – 5.39, 8 – 2.05.

Фракция глобулинов была довольно устойчива к воздействию температуры до 60°C (рис. 2а, 2б). На хроматограммах наблюдали расщепление основных пиков и изменение соотношения гидрофобных и гидрофильных белковых компонентов данной

фракции при увеличении температуры выше 60°C. Изменение температуры обработки пшеницы от 40 до 80°C приводило сначала к возрастанию количества гидрофильных (в области от 20 до 30 мин), а затем гидрофобных (в области от 30 до 40 мин) белко-

**Таблица 2.** Площадь пиков белковых компонентов (1–8) различной молекулярной массы во фракции альбуминов при влаготепловой обработке, % ( $n = 6$ )

Температура обработки, °С	Молекулярная масса компонентов (1–8), кДа							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	56.04 ± 0.1	42.14 ± 0.06	27.04 ± 0.03	25.24 ± 0.08	17.21 ± 0.13	12.82 ± 0.1	5.39 ± 0.08	2.05 ± 0.09
Контроль	26.71 ± 0.14	13.10 ± 0.20	9.63 ± 0.26	20.63 ± 0.31	2.10 ± 0.29	18.13 ± 0.20	7.13 ± 0.26	2.70 ± 0.11
40	24.40 ± 0.31*	13.10 ± 0.50	10.60 ± 0.23	19.80 ± 0.17	2.33 ± 0.30	20.87 ± 0.37*	6.40 ± 0.29	2.43 ± 0.20
50	20.86 ± 0.20*	11.76 ± 0.26*		32.73 ± 0.26*	3.50 ± 0.17*	21.47 ± 0.26*	7.16 ± 0.14	2.10 ± 0.20
60	20.53 ± 0.26*	12.17 ± 0.20*		34.43 ± 0.20*	2.70 ± 0.12	17.80 ± 0.32	8.60 ± 0.23*	3.70 ± 0.11*
70	15.53 ± 0.26*	10.86 ± 0.20*		38.13 ± 0.26*	3.00 ± 0.11*	21.13 ± 0.20*	11.16 ± 0.20*	
80	16.40 ± 0.28*			33.05 ± 0.32*	3.70 ± 0.29*	37.90 ± 0.40*	8.90 ± 0.35*	

\* Вероятность ошибочной оценки  $P < 0.05$ .

вых компонентов (рис. 2а), что также согласовалось с результатами по содержанию извлеченного белка в данной фракции, представленными в табл. 1.

На профиле элюции, полученном при помощи эксклюзионной хроматографии (рис. 2б) в данных условиях разделения, глобулиновая фракция необработанной пшеницы была представлена одним пиком с ММ 22.47 кДа. Проведение влаготепловой обработки уже при 40°C приводило к разделению данного пика на два, один из которых соответствовал первоначальному белковому компоненту с ММ 22.47 кДа, а второй – 19.22 кДа. Дальнейшее увеличение температуры вызывало только изменение соотношения данных компонентов. При температуре до 60°C наблюдали увеличение доли белкового компонента с молекулярной массой 19.22 кДа, площадь пика которого составила 42.20%, а при 80°C содер-

жание данного компонента уменьшалось с возрастанием доли более высокомолекулярного компонента с молекулярной массой 22.47 кДа (табл. 3).

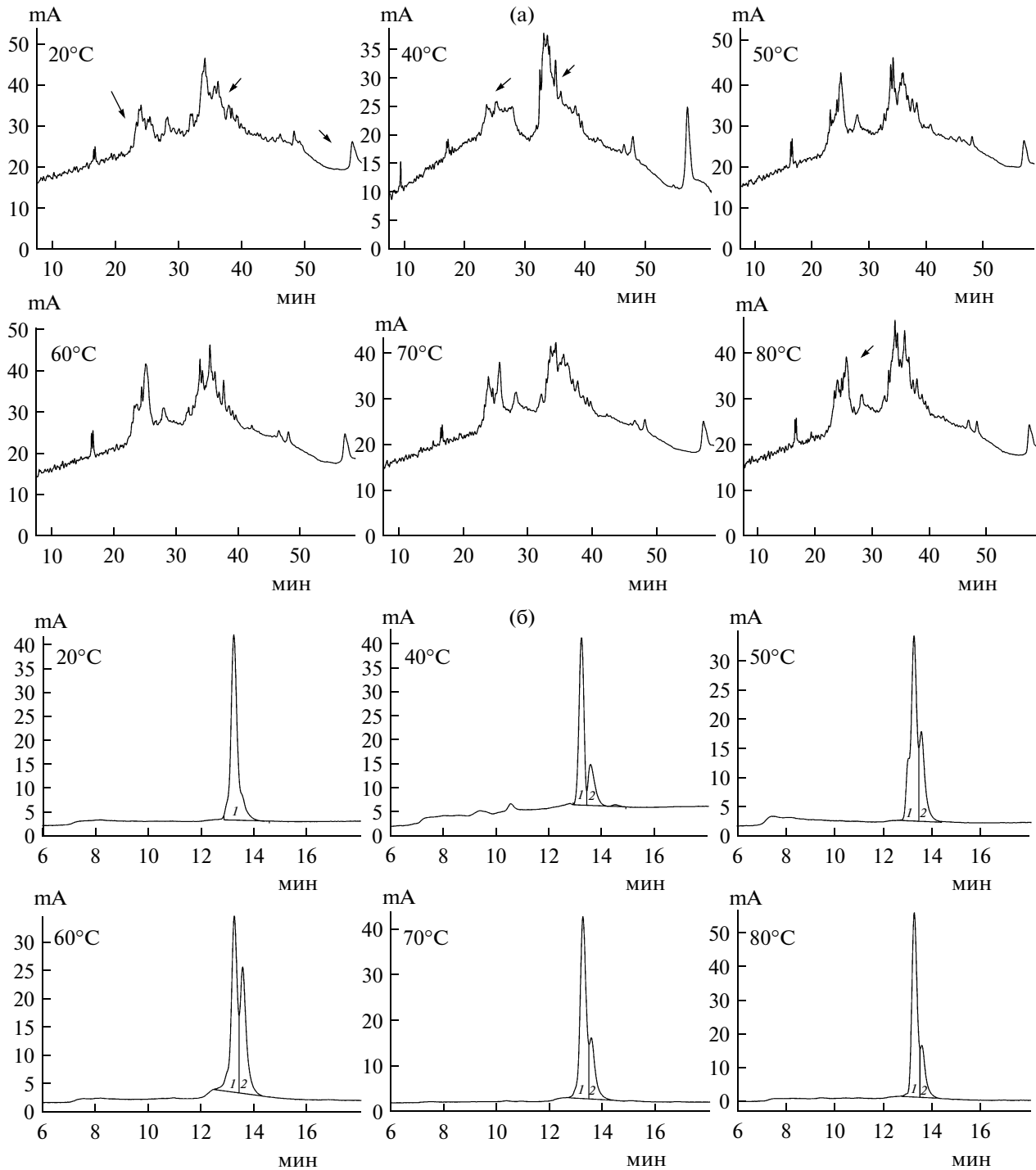
На рис. 3 представлены хроматограммы глиадиновой фракции. Как видно из приведенных данных, обработка зерна уже при 40°C вызывала расщепление основных пиков с образованием большого количества минорных компонентов. Дальнейшее увеличение температуры до 80°C приводило к заметному сглаживанию профиля элюции глиадиновой фракции за счет исчезновения минорных компонентов (рис. 3а).

Эксклюзионную хроматографию глиадиновой фракции проводили с использованием в качестве поверхностно-активного вещества (ПАВ) – додецилсульфата натрия (ДДС-Na). Фракция глиадинов необработанной пшеницы состояла из 3 групп белков с молекулярными массами: 38.15, 27.89 и 24.92 кДа (рис. 3б). Проведение процесса кондиционирования приводило к разделению данной фракции сначала на 4 белковых компонента при 40°C, затем на 5 – при 50°C, 6 – при 60°C и на 7 компонентов – при 70 и 80°C. При этом мы наблюдали агрегацию белковых компонентов с ММ 38.15 кДа и образование новых компонентов с ММ 52.55 кДа, а также появление новых низкомолекулярных компонентов ММ 17.04 кДа. При 50°C количественное соотношение площадей пиков с ММ 52.55 и 38.15 кДа стало практически равным, а пик, соответствующий белковому компоненту 7, разделялся уже на две фракции, одна из которых соответствовала первоначальной молекулярной массе, а другая – 16.20 кДа. Дальнейшее увеличение температуры до 60°C также приводило к появлению нового компонента 2 с ММ 48.53 кДа, образующегося за счет разделения пика, соответствующего компоненту 1. Увеличение температуры обработки до 70–80°C приводило к сокращению площади пика компонента 1 за счет его расщепления на компоненты с меньшей молекулярной массой (рис. 3, 2–5), а также увеличению площади пиков, соответствующих

**Таблица 3.** Площадь пиков белковых компонентов различной молекулярной массы во фракции глобулинов при влаготепловой обработке, % ( $n = 6$ )

Температура обработки, °С	Молекулярная масса компонентов 1, 2, кДа	
	1	2
	22.47 ± 0.02	19.22 ± 0.04
Контроль	100 ± 0.25	–
40	75.06 ± 0.69*	25.00 ± 0.69
50	70.90 ± 0.37*	29.10 ± 0.40*
60	57.80 ± 0.15*	42.20 ± 0.15*
70	76.3 ± 0.43*	23.66 ± 0.44
80	78.90 ± 0.41*	21.07 ± 0.40*

\* Вероятность ошибочной оценки  $P < 0.05$ .

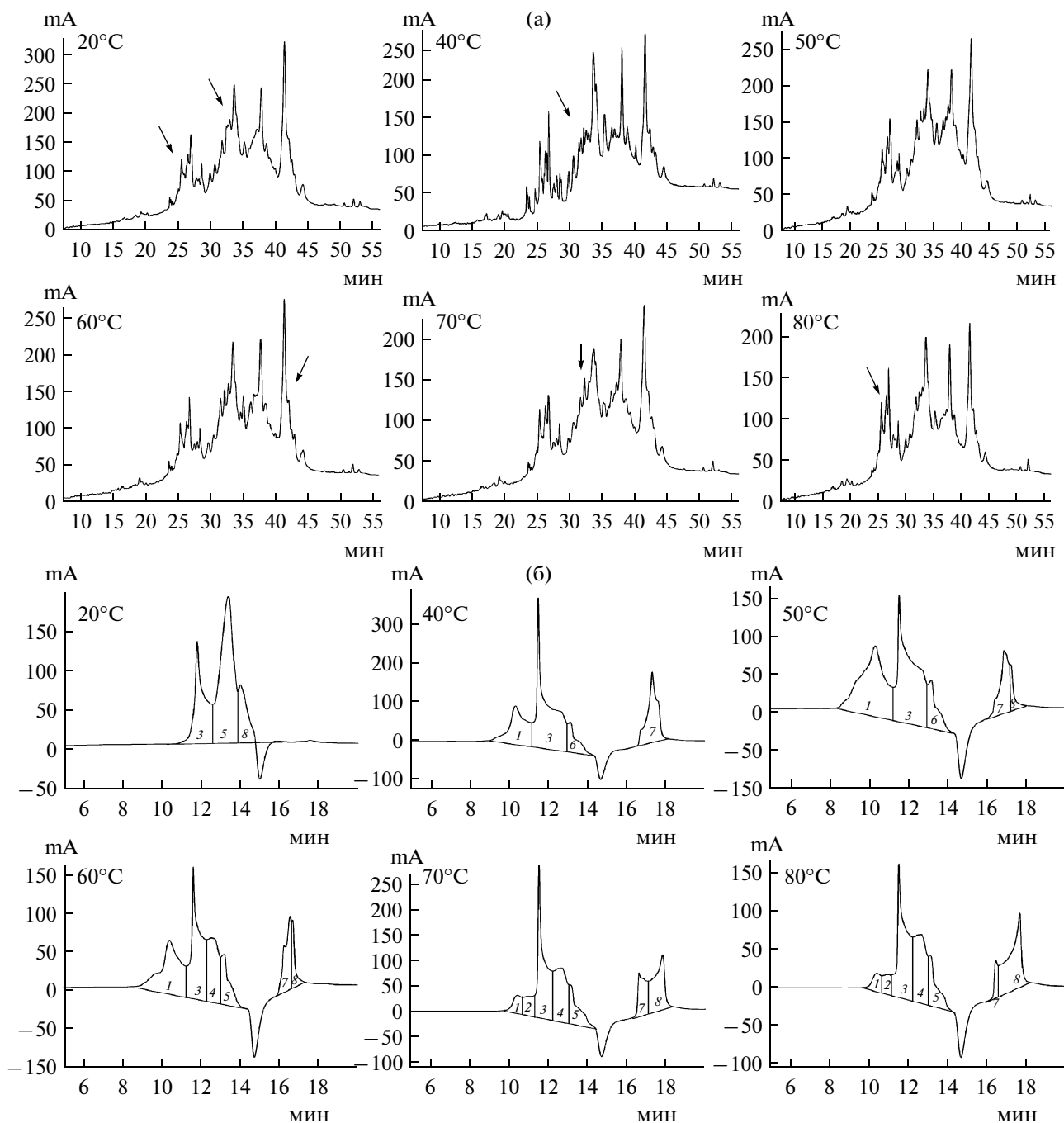


**Рис. 2.** Хроматограммы глобулиновой фракции при различных температурных режимах влаготепловой обработки: а – обращенно-фазовая хроматография, б – эксклюзионная хроматография, ММ компонентов (кДа): 1 – 22.47, 2 – 19.22.

низкомолекулярным компонентам (рис. 3, 7 и 8) (табл. 4). Полученные данные свидетельствовали о конформационных изменениях состояния белковых молекул.

На профиле элюции глютелиновой фракции, полученном при помощи обращенно-фазовой хроматографии (рис. 4а), при увеличении температуры обработки пшеницы до 60°C наблюдалось расщеп-





**Рис. 3.** Хроматограммы глиадиновой фракции при различных температурных режимах влаготепловой обработки: а – обращенно-фазовая хроматография, б – эксклюзионная хроматография, ММ компонентов (кДа): 1 – 52.55, 2 – 48.53, 3 – 38.15, 4 – 33.85, 5 – 27.89, 6 – 24.92, 7 – 17.04, 8 – 16.2.

ление основных пиков в диапазоне времени от 10 до 15 мин и от 30 до 40 мин и последующее сглаживание профиля элюции при 80°C.

Эксклюзионная хроматография позволила разделить глютелиновую фракцию на 6 белковых компонентов (рис. 4б). В количественном соотношении преобладающим был компонент под номером 2 с ММ 42.55 кДа. Увеличение температуры обработки

пшеницы до 80°C приводило к постепенному увеличению доли высокомолекулярного компонента глютелиновой фракции с ММ 113.42 кДа, площадь пика которого возросла с 6 до 14.7% (табл. 5).

При увеличении температуры обработки выше 50°C площадь пика основного белкового компонента 2 с ММ 42.55 кДа уменьшалась с одновременным увеличением доли компонента 3 с ММ

**Таблица 4.** Площадь пиков белковых компонентов (1–8) различной молекулярной массы во фракции глиадинов при влаготепловой обработке, % ( $n = 6$ )

Температура обработки, °С	Молекулярная масса компонентов 1–8, кДа							
	1	2	3	4	5	6	7	8
		52.56 ± 0.29	48.53 ± 0.07	38.15 ± 0.09	33.85 ± 0.1	27.89 ± 0.17	24.92 ± 0.08	17.04 ± 0.19
Контроль			30.49 ± 0.57		61.94 ± 0.54	7.57 ± 0.26		
40	18.40 ± 0.40		36.95 ± 0.15*		7.78 ± 0.29*		36.80 ± 0.43	
50	33.69 ± 0.20*		34.54 ± 0.37*		7.44 ± 0.33*		16.23 ± 0.33*	8.08 ± 0.30
60	28.78 ± 0.15*		26.98 ± 0.30*	17.15 ± 0.43	9.64 ± 0.26*		12.46 ± 0.30*	4.98 ± 0.13*
70	6.94 ± 0.20*	4.15 ± 0.37	28.84 ± 0.30	14.40 ± 0.35	7.56 ± 0.14*		10.64 ± 0.50*	27.40 ± 0.50
80	5.59 ± 0.23*	3.42 ± 0.16	27.88 ± 0.56*	19.09 ± 0.35	7.60 ± 0.23*		3.20 ± 0.14	33.07 ± 0.25

\* Вероятность ошибочной оценки  $P < 0.05$ .**Таблица 5.** Площадь пиков белковых компонентов (1–6) различной молекулярной массы во фракции глютенинов при влаготепловой обработке, % ( $n = 6$ )

Температура обработки, °С	Молекулярная масса компонентов 1–6, кДа					
	1	2	3	4	5	6
		113.42 ± 2.5	42.55 ± 0.05	34.79 ± 0.28	29.06 ± 0.07	24.51 ± 0.07
Контроль	6.01 ± 0.18	60.4 ± 1.40	17.06 ± 0.15	3.20 ± 0.23	8.23 ± 0.43	5.10 ± 0.64
40	6.40 ± 0.20	62.7 ± 1.40	18.50 ± 0.30*	4.20 ± 0.35	5.23 ± 0.72*	2.93 ± 0.55
50	6.56 ± 0.29	61.3 ± 1.45	21.10 ± 0.35*	4.68 ± 0.23*	4.08 ± 0.07*	2.62 ± 0.35*
60	8.83 ± 0.09*	54.43 ± 1.40*	23.80 ± 1.07*	4.90 ± 0.20*	5.13 ± 0.52*	3.13 ± 0.58
70	13.66 ± 0.35*	55.90 ± 2.10	19.40 ± 0.37*	3.90 ± 0.17	3.63 ± 0.26*	3.66 ± 0.23
80	14.70 ± 0.35*	56.33 ± 1.60	18.13 ± 0.49	4.73 ± 0.26*	3.60 ± 0.17*	2.53 ± 0.37*

\* Вероятность ошибочной оценки  $P < 0.05$ .

34.79 кДа. Соотношение низкомолекулярных компонентов с молекулярными массами 29.06, 24.51, и 23.17 кДа в диапазоне от 40 до 80°C оставалось относительно постоянным.

Известно [29], что влаготепловая обработка, проводимая на зерноперерабатывающих предприя-

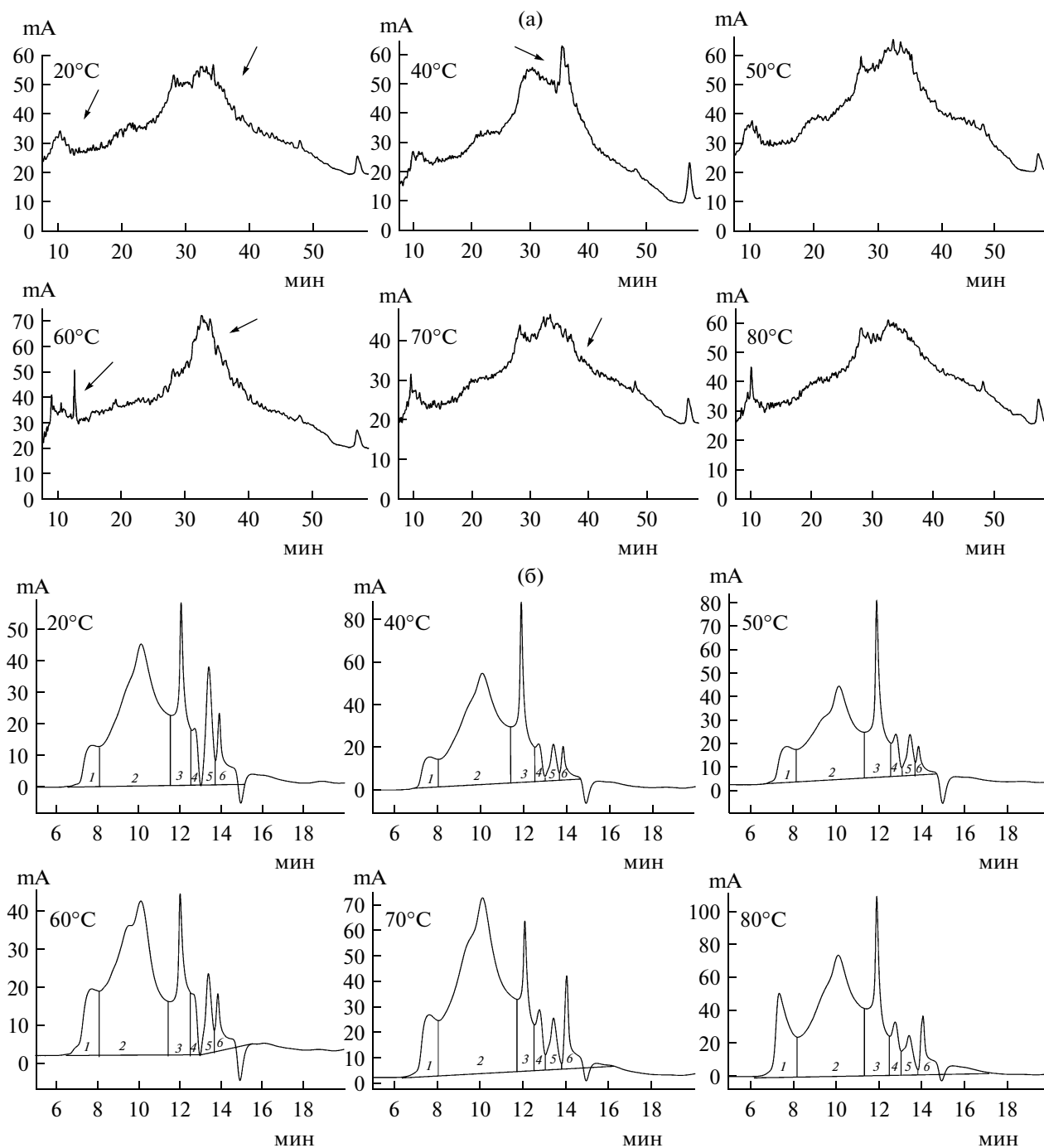
тиях, влияет на физико-химические свойства клейковины.

Как видно из данных, представленных в табл. 6, увеличение температуры процесса до 70°C вызывало уменьшение выхода сырой клейковины, а также ее укрепление, выраженное в изменении показате-

**Таблица 6.** Изменение реологических свойств клейковины и показатели качества пробной лабораторной выпечки хлеба при различных температурных режимах влаготепловой обработки ( $n = 6$ )

Температура влаготепловой обработки пшеницы, °С	Содержание клейковины, %	Показатель ИДК, ед.	Группа качества клейковины	Объемный выход хлеба, см <sup>3</sup>	Формо-устойчивость хлеба, Н/D (отношение высоты к диаметру подового хлеба)
Контроль	25.27 ± 0.12	110	III (неудов.)	334	0.19
40	22.03 ± 0.12*	100	III (неудов.)	—	—
50	20.07 ± 0.14*	100	III (неудов.)	404	0.40
60	20.00 ± 0.15*	95	II (удов.)	—	—
70	18.00 ± 0.26*	90	II (удов.)	385	0.30
80	Не отмыв.	—	—	—	—

\* Вероятность ошибочной оценки  $P < 0.05$ .



**Рис. 4.** Хроматограммы глютеиновой фракции при различных температурных режимах влаготепловой обработки: а – обращенно-фазовая хроматография, б – эксклюзионная хроматография, ММ компонентов (кДа): 1 – 113.42, 2 – 42.55, 3 – 34.79, 4 – 29.06, 5 – 24.51, 6 – 23.17.

ля индекса деформации клейковины (**ИДК**) от 110 до 95–90 единиц. Таким образом, влаготепловая обработка пшеницы при 60°C позволяла улучшить реологические свойства клейковины до удовлетворительного качества, что также было подтверждено пробной лабораторной выпечкой хлеба.

Изменение содержания свободных сульфгидрильных групп в клейковине пшеницы и ее белковых фракциях при проведении влаготепловой обработки от 40 до 80°C представлено в табл. 7.

Повышение температуры влаготепловой обработки вызывало уменьшение количества свободных

**Таблица 7.** Изменение содержания свободных сульфгидрильных групп в клейковине пшеницы и ее фракциях, мкМ/г белка при влаготепловой обработке ( $n = 6$ )

Фракция	Температура обработки, °С					
	контроль	40	50	60	70	80
Клейковина	8.03 ± 0.07	6.51 ± 0.30	4.45 ± 0.23*	3.75 ± 0.12*	3.06 ± 0.5*	3.08 ± 0.16*
Глиадин	1.21 ± 0.29	1.54 ± 0.11	2.42 ± 0.30*	1.36 ± 0.50*	1.28 ± 0.44	1.07 ± 0.48
Глютенин	7.76 ± 0.38	7.59 ± 0.16	6.83 ± 0.36	6.67 ± 0.02	6.24 ± 0.14	6.11 ± 0.04

\* Вероятность ошибочной оценки  $P < 0.05$ .

сульфгидрильных групп в клейковине и ее фракциях за счет их окисления с образованием новых, межмолекулярных дисульфидных связей, что приводило к агрегации белков и укреплению клейковины. Это также отражалось в уменьшении экстрактивности клейковины и ее фракций и изменении показателя ИДК от 110 до 95 ед. (табл. 1, 2). Полученные данные согласуются с результатами Б. Лагрейна и П. Вигельса с соавт. [9, 10, 13].

Характерно, что в клейковине содержание свободных сульфгидрильных групп меньше, чем в сумме изолированных фракций глиадина и глютеина. Мы предполагаем, что данное явление вызвано образованием новых дисульфидных связей между молекулами глиадина, глютеина и растворимых белков в процессе формирования клейковины.

Результаты проведенных исследований показали, что при проведении влаготепловой обработки зерна пшеницы в диапазоне от 40 до 80°С наблюдалось уменьшение экстрактивности белковых веществ, а также изменение соотношения компонентов с различной молекулярной массой. При этом повышение температуры обработки пшеницы выше 60°С во всех случаях, за исключением фракции глютеинов, приводило к уменьшению соотношения высокомолекулярных субъединиц и одновременному увеличению количества низкомолекулярных. По-видимому, глютеиновая фракция была более подвержена воздействию высоких температур и обладала большей способностью к агрегации, происходящей в основном за счет компонента с молекулярной массой 113.42 кДа. Уменьшение количества свободных сульфгидрильных групп в клейковине при повышении температуры обработки указывало на их окисление с образованием новых, межмолекулярных дисульфидных связей, способствующих возникновению больших белковых агрегатов.

Полученные данные хорошо согласуются с проведенными нами ранее исследованиями микроstructures клейковины и ее белковых фракций [31].

Таким образом, укрепление клейковины, наблюдаемое при проведении процесса влаготепловой обработки, вызвано изменениями в составе и соотношении белковых фракций зерна пшеницы при повышении температуры обработки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Booth M.R., Bottomly R.C., Ellis J.R.S., Malloch G., Timms M.F., Shoffeld J. // Ann. Tech. Ag. 1980. V. 29. P. 399–408.
2. Shoffeld J.D., Bottomley R.C., Timms M.F., Booth M.R. // J. Cereal Sci. 1983. V. 1. P. 241–253.
3. Guerrieri N., Alberti E., Lavelli V., Cerletti P. // Cereal Chemistry. 1996. V. 73. P. 368–374.
4. Lefebvre J., Popineau Y., Cornec M. // Gluten Proteins. Detmold: Association of Cereal Research, 1994. P. 180–189.
5. Carceller J.L., Aussenac T. // J. Cereal Sci. 2001. V. 33. P. 134–142.
6. Lemelin F., Aussenac T., Viollean F., Salvo I., Lein V. // Cereal Chemistry. 2005. V. 82. P. 28–33.
7. Stevenson S.G., Preston K.R. // J. Cereal Sci. 1996. V. 21. P. 121–131.
8. Kieffer R., Wieser H. // The Gluten Proteins. Cambridge: Royal Soc. Chem. 2004. P. 235–238.
9. Weegels P.L., de Groot A.M.G., Verhoek J.A., Hamer R.J. // J. Cereal Sci. 1994. V. 19. P. 31–38.
10. Weegels P.L., de Groot A.M.G., Verhoek J.A., Hamer R.J. // J. Cereal Sci. 1994. V. 19. P. 39–47.
11. Stathopoulos C.E., Tsiami A.A., Dobraszchuk B.J., Schofield D.J. // J. Cereal Sci. 2006. V. 43. P. 322–330.
12. Singh H., Mac Richue F. // J. Cereal Sci. 2004. V. 39. P. 297–340.
13. Lagrain B., Brijs K., Wim S.V., Delcour J.A. // J. Cereal Sci. 2005. V. 42. P. 327–333.
14. Wieser H., Antes S., Seilmeier W. // Cereal Chemistry. 1998. V. 75. P. 644–650.
15. Kieffer R., Shurer F., Kohler P., Wieser H. // J. Cereal Sci. 2007. V. 45. P. 285–292.
16. Lagrain B., Brijs K., Delcour J.A. // J. Cereal Sci. 2006. V. 44. P. 49–53.
17. Hayta M., Schofield J.D. // J. Cereal Sci. 2004. V. 40. P. 245–256.

18. *Shomer I., Lookhart G., Salomon R., Vasiliver R., Bean S.* // *J. Cereal Sci.* 1995. V. 22. P. 237–249.
19. *Yinping Wan, Linli Liu, Huixian Zhao* // *J. Cereal Sci.* 2006. V. 44. P. 174–181.
20. *Kim W., Choi S.G., Ken W.L., Jonson J.W., Gaines C.S.* // *J. Cereal Sci.* 2004. V. 40. P. 9–16.
21. *Stathopoulos C.E., Tsiami A.A., Dobraszchuk B.J., Schofield J.D.* // *J. Cereal Sci.* 2008. V. 47. P. 134–143.
22. *Dreese P.C., Faubion J.M., Hosney R.C.* // *Cereal Chemistry.* 1988. V. 65. P. 348–353.
23. *Weegels P.L., Hamer R.J., Schofield J.D.* // *J. Cereal Sci.* 1996. V. 23. P. 1–18.
24. *Tsiami A.A., Bot A., Agterof W.G.M., Groot R.D.* // *J. Cereal Sci.* 1997. V. 26. P. 15–27.
25. *Бутковский В.А., Мельников Е.М.* Технология мукомольного, крупяного и комбикормового производства. М.: Агропромиздат, 1989. 208 с.
26. *Конарев В.Г.* Белки пшеницы. М.: Колос, 1980. С. 11–12.
27. *Бэйли Д.* Методы химии белков. М.: Мир, 1965. С. 266.
28. *Василенко И.* Справочник по качеству зерна. М.: Агропромиздат, 1987. С. 84.
29. *Казаков Е.Д., Кретович В.Л.* Биохимия зерна и продуктов его переработки. М.: Агропромиздат, 1989. С. 302–309.
30. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
31. *Кораблёва Н.В., Касымова Т.Д.* // Докл. АН РУз. 2008. № 5. С. 62–67.

## Influence of a Moist-Heat Treatment on Protein Fractions of Wheat

N. V. Korableva and T. D. Kasymova

*Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent, 100170 Uzbekistan*  
*e-mail: nadya1477@rambler.ru*

Received December 9, 2009

**Abstract**—Influence of different temperature modes of a moist-heat treatment on the protein fractions of wheat, grown in Uzbekistan, has been studied within a temperature range from 40 to 80°C. Using inverted phase and exclusion chromatography, we have revealed that moist-heat treatment reduces the extract content and causes some changes in the ratio between high- and low-molecular components. If the treatment temperature exceeded 60°C, then, in all cases, except the glutenin fraction, the content of high-molecular components decreased, whereas the content of low-molecular components increased. The glutenin fraction was more subjected to heat influence and demonstrated a higher ability to aggregation, occurring mainly due to the component whose molecular weight was 113.42 kDa. Reduction of the number of free sulfhydryl groups in wheat gluten and its fractions in the case of a temperature increase indicates the oxidation of these groups with formation of new intermolecular disulphide bonds, which, in turn, results in the aggregation of proteins and strengthening of gluten. The obtained results agree with data of our earlier studies of gluten microstructure and fractioning during a moist-heat treatment.

УДК 677.47.3

## АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНОВ: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СТРУКТУРЫ И СПОСОБА ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ

© 2011 г. В. Н. Давыдова, В. П. Нагорская, В. И. Горбач, А. А. Калитник, А. В. Реунов, Т. Ф. Соловьёва, И. М. Ермак

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, 690022

e-mail: piboc@eastnet.febras.ru

Поступила в редакцию 21.11.2009 г.

Проведен ферментативный (действие лизоцима) и химический (пероксид водорода) гидролиз хитозанов с различной степенью ацетилирования (СА): 25, 17, 1.5%. Очистку и фракционирование продуктов гидролизом проводили методами диализа, ультрафильтрации и гелепроницающей хроматографии. Получены низкомолекулярные (НМ) производные полисахарида с молекулярными массами от 17 до 2 кДа. Изучена их противовирусная активность в отношении вируса табачной мозаики (ВТМ) и показано, что данные образцы ингибируют образование локальных некрозов, индуцированных вирусом, на 50–90%. Антивирусная активность НМ-хитозанов существенно возрастает с уменьшением степени их полимеризации. При этом продукты ферментативного гидролиза обладают меньшей активностью, чем образцы хитозанов, полученные в результате химического гидролиза. Установлено, что проявление антивирусной активности слабо зависит от степени ацетилирования образцов.

Хитозан (деацетилированное производное хитина) — нетоксичный, биоразрушаемый, биосовместимый полисахарид — обладает разнообразной биологической активностью, включая антибактериальную, антивирусную, антиопухолевую, антихолестериновую и др., что обеспечивает возможность его широкого использования в медицине и фармации [1]. Значительный интерес вызывает иммуностимулирующая способность хитозана, позволяющая использовать это соединение в защите организмов от стрессовых воздействий и различных заболеваний [2].

В последние годы все большее внимание исследователей привлекает способность хитозана повышать устойчивость растений к вирусам [3–8]. Показано, что хитозан может уменьшать число и размеры вирусиндуцированных локальных некрозов на листьях сверхчувствительных растений-хозяев, а также ингибировать распространение вирусов в системно поражаемых растениях [4].

По имеющимся данным, уровень противовирусной устойчивости, индуцированной хитозаном, зависит от вида растения [4]. В то же время антивирусная активность хитозана определяется его структурой и, прежде всего, степенью полимеризации молекулы [9–11]. Так, сообщалось [9], что высокополимерные препараты полисахарида обладают более высокой противовирусной активностью. С другой стороны, было показано [10, 11], что ферментативная деградация высокополимерных хитозанов хитиназами гриба *Aspergillus fumigatus* значительно повышает их антивирусную активность, что выра-

жается в подавлении местных некрозов, образующихся при инокуляции листьев табака вирусом табачной мозаики (ВТМ).

Таким образом, данные о зависимости антивирусной активности хитозана от его структуры, в частности степени полимеризации, достаточно противоречивы, что может быть обусловлено разнообразием источников выделения хитозана [4]. Более того, образцы хитозана, выделенные из одних и тех же источников, имеют различные физико-химические характеристики (молекулярная масса, количество и характер распределения ацетатных групп в полимерной цепи), что может являться причиной расхождения данных по биологической активности этих полисахаридов [12, 13].

Известно, что практическое применение коммерческого хитозана ограничено высокой вязкостью его растворов и плохой растворимостью в воде. Он, как правило, растворим при низких значениях pH, но не растворим в нейтральных и основных растворах. Для получения водорастворимых образцов полисахарида проводят деполимеризацию хитозана химическим или ферментативным гидролизом. Способы деполимеризации исходных высокомолекулярных (ВМ) образцов хитозана и методы очистки также могут влиять на биологическую активность его НМ-производных [14].

Одним из наиболее простых и распространенных способов химической деполимеризации хитозана является гидролиз под действием пероксида водорода. Однако этот процесс зависит от условий протекания реакции и, наряду с получением оли-

госахаридов с низкой молекулярной массой, может приводить к образованию побочных продуктов реакции, способных вызывать изменение биологических свойств НМ-производных. Так, было показано, что противовирусная активность продуктов химического гидролиза хитозана увеличивается с ростом молекулярной массы [14], в то время как активность олигомеров хитозана, полученных ферментативным гидролизом, падает с увеличением их молекулярной массы [5]. Предполагается [14], что повышение антибактериальной активности НМ-образцов хитозана, в случае химического гидролиза, обуславливается не столько изменением степени полимеризации полисахарида, сколько появлением окисленных групп на олигомерных молекулах. В отличие от химического гидролиза, деполимеризация под действием ферментов исключает возможность появления окисленных групп в олигосахаридах. Вместе с тем образцы НМ-хитозанов, полученные с помощью химического и ферментативного гидролиза из одного и того же источника, могут различаться по распределению ацетатных остатков [15], что также будет влиять на проявление их биологической активности.

Цель работы – получение НМ-образцов хитозана разной степени ацетилирования с помощью ферментативного и химического гидролиза и изучение взаимосвязи их физико-химических характеристик (молекулярная масса, количество N-ацетатных групп) с антивирусной активностью.

## МЕТОДИКА

**Материалы.** Использовали коммерческий хитозан (ООО “Биополимеры” г. Партизанск, Россия); хитозан, выделенный в ТИБОХ ДВО РАН из панциря камчатского краба; лизоцим из куриного яйца, активность  $20 \times 10^3$  ед.,  $\text{pH}_{\text{опт}}$  6.24, (“Applichem GmbH”, Германия); сефадекс G-50 (“Pharmacia”, Швеция); мембраны для ультрафильтрации (“Millipore”, США); диализные мешки (“Orange Scientific”, Бельгия). Все остальные реактивы имели классификацию х.ч. (“Реахим”, Россия) и использовались без дополнительной очистки.

**Аналитические методы.** Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР полисахаридов получены на приборе DPX-300 (75.46 МГц) (“Bruker”, Германия) в растворе  $\text{D}_2\text{O}$  при  $60^\circ\text{C}$ . В качестве внутреннего стандарта использовали уксусную кислоту ( $\delta = 23.52$  относительно тетраметилсилана). Степень N-ацетилирования (СА) НМ-образцов хитозанов определяли согласно методике, приведенной в работе [16]. ИК-спектры исследуемых образцов регистрировали на спектрофотометре Vector 22 (“Bruker”, Германия) с разрешением  $4 \text{ см}^{-1}$ . СА высокомолекулярных хитозанов определяли по методу Доузи [17].

Содержание белка в хитозанах определяли по методу Лоури [18]. Молекулярные массы (ММ)

образцов рассчитывали по методу, основанному на реакции восстанавливающих сахаров с ферроцианидом [19], или вискозиметрическим методом [20] используя уравнение Марка–Хаувинка–Куна:

$$|\eta| = K_M M^\alpha,$$

где  $|\eta|$  – характеристическая вязкость, М – молекулярная масса,  $K_M$  и  $\alpha$  – эмпирические константы, значения которых взяты из работы [21]. Вязкость растворов определяли в модифицированном вискозиметре Убеллоде (СКБ “Пушино”) с диаметром капилляра 0.3 мм в 0.1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ –0.2 М  $\text{NaCl}$ .

**Деацетилирование хитозана.** Хитозан со СА 17% и ММ 300 кДа, определенной вискозиметрическим методом, деацетилировали по методике [22].

**Химический гидролиз.** Гидролиз пероксидом водорода проводили при  $25$  и  $37^\circ\text{C}$ , как описано ранее [23].

**Ферментативный гидролиз.** Растворяли 2 г ВМ-хитозана в 200 мл 1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , разбавляли до 400 мл 0.4 М  $\text{NaCl}$  и доводили рН среды до 6.0 с помощью  $\text{NaOH}$ , добавляли раствор лизоцима (1 мг/мл) в 0.1 М  $\text{KCl}$  из расчета 10 мг фермента на 1 г хитозана. Реакционную смесь выдерживали при  $37^\circ\text{C}$ . Каждые 20 мин из раствора отбирали аликвоты и определяли вязкость при  $25^\circ\text{C}$ . В момент соответствия вязкости гидролизуемого раствора вязкости образца, полученного химическим гидролизом при  $25^\circ\text{C}$ , реакционную смесь охлаждали до  $25^\circ\text{C}$ , доводили до рН 10.0 добавлением 6 М  $\text{NaOH}$  и делили на 2 части. Одну часть кипятили 30 мин для инактивации фермента нагреванием, затем осаждали полисахарид этанолом. Во второй части фермент инактивировали обработкой этанолом. Осадки отделяли центрифугированием при 2500 г, растворяли в воде при добавлении 1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и диализовали против воды в течение 48 ч.

НМ хитозан последовательно фракционировали с помощью диализных мешков MWCO 12000–14000 и 3500 и ультрафильтрационной мембраны (Pellicon, 1000, Millipore). К фракции хитозана с ММ выше 14 кДа добавляли 1 мл раствора лизоцима (1 мг/мл), смесь выдерживали 24 ч при  $37^\circ\text{C}$ , после чего проводили инактивацию фермента двумя способами, описанными выше, ультрафильтрацию и диализ продуктов гидролиза.

**Гельпроникающая хроматография.** Для очистки хитозанов и их фракционирования по молекулярным массам использовали метод гельпроникающей хроматографии на колонке с сефадексом G-50. Полисахарид (20 мг) растворяли в 0.1 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ –0.2 М  $\text{NaCl}$  буфере, наносили на колонку ( $24 \times 1.5$  см), элюировали тем же буфером и собирали фракции объемом 2.5 мл. Калибровку колонки проводили декстранами с ММ 10 и 20 кДа и ламинараном с ММ 6 кДа. Содержание полисахаридов в собранных фракциях определяли по реакции аминокруппы хитозана с тринитробензолсульфокислотой [24].

Образцы хитозана лиофилизировали. Относительное содержание ацетатных групп в образцах определяли с помощью ЯМР-спектроскопии.

**Антивирусная активность.** Антивирусную активность препаратов хитозана оценивали по отношению к штамму ВТМ, выделенному из зараженных растений *Nicotiana tabacum* L. сорта Самсун по методике Отсуки и др. [25]. Исследования проводили на локально поражаемых ВТМ листьях 4-недельных растений *N. tabacum* L. сорта Ксанти-нк, выращенных в теплице. Листья среднего яруса отделяли от растений, разрезали вдоль средней жилки и напыляли карборундом. Затем опытные половинки листьев инокулировали смесью вируса и хитозана, а контрольные – только вирусом. Инокулированные листья промывали водой и переносили во влажные камеры. Через 4 сут после заражения листьев подсчитывали число образующихся на них локальных некрозов, определяющих инфекционность вируса [26]. В каждом из 3 проведенных опытов использовали половинки 10 листьев. Антивирусную активность препаратов определяли по их ингибиторному действию на образование вирусиндуцированных локальных некрозов на листьях и выражали в процентах относительно контроля как  $(100 - N_0 100 / N_k)$ , где  $N_0$  и  $N_k$  – числа локальных некрозов, образующихся соответственно на опытных и контрольных половинках листьев. Относительную ошибку средних (30 повторностей) значений вычисляли с использованием критерия Стьюдента при доверительной вероятности, равной 0.95 [27].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**НМ-производные хитозана.** Данные литературы показывают, что основными факторами, влияющими на антивирусную активность производных хитозана, являются: молекулярная масса НМ-образцов [5], источники выделения исходного хитозана [4], способ деполимеризации – ферментативный или химический гидролиз [14], химическая структура полисахаридов, в частности степень их N-ацетилирования [28].

В настоящей работе был проведен анализ влияния этих факторов на антивирусную активность хитозанов.

Для получения различных НМ-производных хитозана были использованы 2 исходных образца полисахарида с высокой степенью полимеризации. Один из них с ММ 300 кДа и СА 17% (ТИБОХ ДВО РАН, **Х-ВМ-300**), другой – коммерческий образец с ММ 500 кДа и СА 25% (**Х-ВМ-500**), изготовлен ООО “Биополимеры”. Из образца Х-ВМ-300 методом дезацетилирования получен продукт с ММ 130 кДа и СА 1.5% (**Х-ВМ-130**).

Очистку и фракционирование НМ-продуктов проводили методами диализа и ультрафильтрации. Затем образцы очищали от низкомолекулярных при-

**Таблица 1.** Характеристика производных хитозанов, полученных в результате гидролиза пероксидом водорода

Хитозан	Условия гидролиза		Выход, %	Молекулярная масса, кДа
	°С	ч		
Х-ВМ-500, СА 25%	37	48	5.7	6.0
	37	24	13.8	6.0
	25	48	39.6	10.5
	25	24	30.4	17.0
Х-ВМ-300, СА 17%	37	48	18.1	17.0
Х-ВМ-130, СА 1.5%	37	48	25.5	15.0
	37	72	15.2	5.0

месей методом гельпроникающей хроматографии на колонке с сефадексом G-50. Фракции образцов, характеризующиеся узким молекулярно-массовым распределением, были выделены, лиофилизованы и использованы для анализа их антивирусной активности.

Образцы Х-ВМ-130, Х-ВМ-300 и Х-ВМ-500 были подвергнуты химическому гидролизу с использованием пероксида водорода при 37°С, и получены НМ-производные хитозана с ММ в пределах 5–17 кДа (табл. 1). Образец Х-ВМ-500 был более эффективно подвержен действию пероксида водорода, чем Х-ВМ-300. При 37°С наблюдалась значительная фрагментация ВМ-полисахарида с образованием производных хитозанов с ММ, не превышающими 6 кДа, выход которых был низким (не более 13%). В связи с этим деполимеризацию Х-ВМ-500 проводили при 25°С, в этом случае выход НМ-производных хитозана возрастал до 40%, а их ММ составили – 10.5 и 17 кДа (табл. 1).

Таким образом, Х-ВМ-300 и Х-ВМ-130 более устойчивы к гидролизу под действием пероксида водорода при 37°С. Можно предположить, что это обусловлено более высокой степенью ацетилирования Х-ВМ-500 по сравнению с двумя другими хитозанами. Так, было показано, что скорость деградации хитозана под действием ультразвука [29] или ферментов крови человека увеличивалась пропорционально степени N-ацетилирования образца [30].

Параллельно химической модификации, образец Х-ВМ-500 подвергали ферментативному гидролизу. В качестве фермента для деполимеризации был выбран лизоцим. Выбор лизоцима был не случаен, поскольку в последнее время хитозан широко используется в качестве биологически активной добавки (**БАД**), а лизоцим, присутствующий в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта млекопитающих, является наиболее эффективным



**Таблица 2.** Характеристика производных хитозана, полученных в результате ферментативного гидролиза лизоцимом образца X-ВМ-500

Способ инактивации фермента	Молекулярная масса, кДа	Содержание белка, %
Кипячение, 100°C	160.0	1.31 ± 0.22
	—	—
Обработка этанолом	2.2	1.36 ± 0.3
	160.0	0.73 ± 0.3
	12.0	0.86 ± 0.2
	4.4	0.85 ± 0.3

**Таблица 3.** Антивирусная активность хитозанов, полученных путем ферментативного и химического гидролиза

Гидролизующий агент	Молекулярная масса, кДа	Антивирусная активность, %
Хитозан, СА 1.5%		
Пероксид водорода	130	32 ± 3.8
	15.0	75 ± 8.1
	5.0	87 ± 9.0
Хитозан, СА 25%		
Пероксид водорода	17.0	84 ± 8.7
	6.0	75 ± 7.9
Лизоцим	160	17 ± 2.0
	12.0	58 ± 6.1
	4.0	60 ± 6.5

**Таблица 4.** Антивирусная активность хитозанов с разной СА

СА, %	Молекулярная масса, кДа	Антивирусная активность, %
1.5	15.0	75 ± 8.1
17	17.0	73 ± 7.8
25	17.0	84 ± 8.9
1.5	130	32 ± 3.5
9*	130	22 ± 2.3
15*	130	34 ± 3.8

\* Образцы получены методом частичного N-ацетилирования.

ферментом для расщепления частично дезацетилированного хитозана [31].

Деполимеризацию проводили при 37°C, pH 6.0. Для инактивации фермента использовали кипячение и обработку этанолом. Общепринятым мето-

дом инактивации лизоцима является кипячение реакционной смеси в течение 30 мин. В нашем случае при температурной инактивации фермента после осаждения полисахарида этанолом, его диализа и гель-фильтрации получали два образца НМ-производных хитозана с ММ 2.2 и 160 кДа. В то же время, осаждение продуктов деполимеризации хитозана этанолом, без предварительного кипячения, приводило к образованию 3 НМ-фракций (табл. 2). Можно предположить, что в результате термической обработки происходит дополнительная деполимеризация.

Результаты свидетельствуют о том, что одним из продуктов ферментативного гидролиза является фракция хитозана с ММ 160 кДа (табл. 2), которая не подвергается дальнейшей деградации под действием фермента. Как было предположено ранее [32], для начала гидролиза необходимо образование комплекса лизоцима с полисахаридом, которое происходит в результате взаимодействия гексасакхаридного фрагмента молекулы хитозана, имеющего специфическую конформацию углеводных колец, с активным центром фермента. В нашем случае этот процесс может быть затруднен вследствие способности молекул ВМ-хитозана образовывать в растворе ассоциаты за счет межмолекулярных взаимодействий и водородных связей [23, 33].

Для оценки влияния СА на биологические свойства НМ-хитозанов из исходного образца с ММ 130 кДа и СА 1.5% методом частичного N-ацетилирования были получены образцы хитозана, содержащие различное количество N-ацетатных групп — 9 и 15%.

**Антивирусная активность.** Проведен сравнительный анализ антивирусной активности НМ-производных хитозана в отношении ВТМ, которая проявлялась в уменьшении количества вирусиндуцированных локальных некрозов, образующихся на листьях табака Ксанти-нк при инокуляции их смесью ВТМ и хитозана, в сравнении с листьями, инокулированными только вирусом.

Исследуемые образцы НМ хитозанов были разделены на 3 группы.

Первая группа включала хитозаны, полученные деполимеризацией X-ВМ-130 под действием пероксида водорода, с разной молекулярной массой и СА 1.5%. (табл. 3). Вторая группа — продукты ферментативного и химического гидролиза X-ВМ-500, СА 25% (табл. 3). Третья группа — НМ-производные ВМ хитозанов (пероксид водорода) с различной СА: 25% (из X-ВМ-500), 17% (из X-ВМ-300) и 1.5% (из X-ВМ 130 кДа) и ММ от 15 до 17 кДа, а также образцы хитозанов, полученные путем ацетилирования хитозана с ММ 130 кДа (табл. 4).

Анализ данных, представленных в табл. 3–4, свидетельствует о том, что наиболее высокой антивирусной активностью обладали образцы хитозана с относительно низкой молекулярной массой. Для НМ-производных, образующихся в результате гидролиза

пероксидом водорода X-ВМ-130, при уменьшении молекулярной массы исходного ВМ-полисахарида в 8.7 раз его антивирусная активность возрастала более чем в 2 раза. Однако дальнейшее уменьшение ММ олигомера до 5 кДа не вызывало существенного изменения его антивирусной активности (табл. 3). Антивирусная активность НМ-производных с ММ 17 и 6 кДа, полученных из X-ВМ-500 под действием пероксида водорода, также существенно не различалась (табл. 3). Аналогичная зависимость прослеживается и для продуктов ферментативного гидролиза X-ВМ-500. При уменьшении ММ от 160 до 12 кДа наблюдалось увеличение активности в 3.4 раза, в то время как активность олигомеров с ММ 12, 4 и 2.2 кДа существенно не отличалась (табл. 3). Как видно из табл. 3, способ инактивации фермента не оказывает существенного влияния на антивирусную активность НМ-хитозанов. Вместе с тем активность НМ продуктов ферментативного гидролиза несколько ниже активности образцов, полученных при обработке пероксидом водорода (табл. 3).

Для образцов с ММ 130 кДа, полученных путем введения ацетатных групп с помощью реакции ацетилирования, отмечается возрастание антивирусной активности при росте СА от 9 до 15% (табл. 4).

Данные о зависимости противовирусной активности хитозана от его молекулярной массы достаточно противоречивы [5, 14]. Так, Чирков с соавт. [9] показали, что противовирусная активность хитозана в отношении вируса мозаики люцерны возрастала с увеличением его молекулярной массы. Аналогичная зависимость была обнаружена при изучении влияния хитозана на системную инфекцию, обусловленную X-вирусом картофеля [34]. Вместе с тем для хитозана, полученного методом ферментативного гидролиза с использованием хитиназ, на модели ВТМ было отмечено повышение противовирусной активности полисахарида с уменьшением его молекулярной массы [10]. Куликов с соавт. [5] высказали предположение, что это противоречие обусловлено разными источниками выделения хитозана, а также исходной гетерогенностью НМ-производных этого полисахарида. Используя образцы хитозанов с достаточно узким молекулярно-массовым распределением, авторы показали, что противовирусная активность хитозана в отношении вируса мягкой мозаики фасоли возрастала с уменьшением молекулярной массы хитозана [5].

Эти данные согласуются с нашими результатами, показывающими, что антивирусная активность хитозанов возрастает с уменьшением их молекулярной массы. Наиболее значительное увеличение антивирусной активности наблюдается при уменьшении ММ хитозанов от 500–130 до 15–17 кДа, тогда как при дальнейшем снижении молекулярной массы олигосахаридов значительной разницы в их активности не наблюдается (табл. 3). Эта зависимость наблюдается как в случае ферментативного, так и хи-

мического гидролиза (табл. 3). В то же время в результате химического гидролиза образовывались производные хитозана с большей активностью (табл. 3). Причиной более высокой активности может быть образование в процессе гидролиза пероксидом водорода побочных продуктов, что, как отмечалось ранее, может влиять на антивирусную активность хитозана [35]. Однако в ЯМР- и ИК-спектрах наших образцов отсутствовали сигналы, свидетельствующие о наличии каких-либо посторонних продуктов деградации. Это согласуется с работой Лина и соавт. [36], которые, проведя тщательный анализ продуктов химического гидролиза хитозана, показали, что они имеют структуру, полностью соответствующую структуре исходного полимера.

Причиной более низкой активности НМ-продуктов ферментативного гидролиза (табл. 3) может быть также разное распределение ацетатных остатков в молекулах производных хитозана. Так, известно, что олигомеры – НМ-продукты химического и ферментативного гидролиза одного и того же хитозана могут отличаться по распределению остатков уксусной кислоты [15]. Однако согласно данным, приведенным в табл. 4, антивирусная активность хитозанов с разной СА, выделенных как из природных источников, так и химически модифицированных, существенно не отличается. В то же время полностью исключить влияние этого параметра мы не можем, так как не имеем исчерпывающих данных о надмолекулярной структуре и характере распределения ацетильных групп в препаратах, полученных в результате ферментативного и химического гидролиза.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что антивирусная активность НМ-производных хитозанов повышается с уменьшением их молекулярной массы, что справедливо для образцов, полученных как химическим, так и ферментативным гидролизом. Антивирусная активность НМ-производных хитозанов природного происхождения и химически модифицированных мало зависит от СА.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и ДВО–УрО РАН № 09-П-УО-05-001.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. 368 с.
2. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Зиновьева С.В. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. С. 339–345.
3. *Pospieszny H., Atabekov J.G.* // Plant Sci. 1989. V. 62. № 1. P. 29–31.
4. *Чирков С.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 5–13.

5. Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 224–228.
6. Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J.G. // Plant Sci. 1991. V. 79. № 1. P. 63–68.
7. Iriti M., Sironi M., Gomasca S., Casazza A.P., Soave C., Faoro F. // Plant Physiol. Biochem. 2006. V. 44. № 11–12. P. 893–900.
8. Zhao X.M., She X.P., Du Y.G., Liang X.M. // Pestic. Biochem. Physiol. 2007. V. 87. № 1. P. 78–84.
9. Чирков С.Н., Сургучева Н.А., Гамзада А.И., Абдулабеков И.М., Поспешны Г. // Докл. РАН. 1998. Т. 360. № 2. С. 271–273.
10. Pospieszny H., Struszczyk H., Cajza M. // Chitin enzymology / Ed. R.A.A. Muzzarelli. Ancona: Atec. Grottamare, 1996. V. 2. P. 385–389.
11. Struszczyk M.H., Pospieszny H., Schanzenbach D., Peter M.G. // Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives / Ed. H. Struszczyk. Lodz: Polish Chitin Soc. 1998. V. 5. P. 71–77.
12. Otterlei M., Vårum K.M., Ryan L., Espevik T. // Vaccine. 1994. V. 12. № 9. P. 825–832.
13. Prasitsilp M., Jenwithisuk R., Kongsuwan K., Damrongchai N., Watts P. // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2000. V. 11. № 12. P. 773–778.
14. Rhoades J., Roller S. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 1. P. 80–86.
15. Cabrera J.C., Van Custem P. // Biochem. Enj. J. 2005. V. 25. № 2. P. 165–172.
16. Hasegawa M.I., Isogai A., Onabe F. // Carbohydr. Res. 1994. V. 262. № 1. P. 161–166.
17. Dowzy J., Roberts G.I. // Macromol. Chem. 1985. V. 186. № 8. P. 1671–1677.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
19. Душе З. // Методы химии углеводов / Ред. Н.К. Кочетков. М.: Мир, 1967. С. 53, 54.
20. Жэнь-Юань Ц. Определение молекулярных весов биополимеров / Ред. С.Р. Рафиков. М.: Изд-во ИЛ, 1962. 234 с.
21. Maghami G.G., Roberts G.A.F. // Macromol. Chem. 1988. V. 189. № 1. P. 195–200.
22. Набережных Г.А., Горбач В.И., Лихацкая Г.Н., Давыдова В.Н., Соловьева Т.Ф. // Биохимия. 2006. Т. 73. № 3. С. 530–541.
23. Давыдова В.Н., Ермак И.М., Горбач В.И., Дроздов А.Л., Соловьева Т.Ф. // Биофизика. 2000. Т. 45. № 4. С. 641–647.
24. Imman J., Dintzins H. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 8. P. 4074–4082.
25. Otsuki Y., Takebe I., Onho T., Fukuda M., Okada Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 5. P. 1913–1917.
26. Мэтьюз Р. Вирусы растений. М.: Мир, 1973. 600 с.
27. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1973. 352 с.
28. Day R.B., Okada M., Ito Y., Tsukada K., Zaghoulani H., Shibuya N., Stacey G. // Plant Physiol. 2001. V. 126. № 3. P. 1162–1173.
29. Trzcinski S., Staszewska D.U. // Carbohydr. Polym. 2004. V. 56. № 4. P. 489–498.
30. Vårum K.M., Myhr M.M., Hjerde R.J., Smidsrød O. // Carbohydr. Res. 1997. V. 299. № 1–2. P. 99–101.
31. Nordtveit R.J., Vårum K.M., Smidsrød O. // Carbohydr. Polym. 1996. V. 29. № 2. P. 163–167.
32. Рус Э., Стернберг М. Введение в молекулярную биологию. М.: Мир, 2002. С. 48–50.
33. Philippova O.E., Volkov E.V., Sitnikova N.L., Khokhlov A.R. // Biomacromolecules. 2001. V. 2. № 2. P. 483–490.
34. Чирков С.Н., Ильина А.В., Сургучева Н.А., Летунова Е.В., Варицев Ю.А., Татарина Н.Ю., Варламов В.П. // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 6. С. 890–896.
35. Kim S.-K., Rajapakse N. // Carbohydr. Polym. 2005. V. 62. № 4. P. 357–368.
36. Lin F., Jia X.C., Lei W.X., Li Z.J., Zhang T.Y. // Spectroscopy and Spectral Analysis. 2009. V. 29. № 1. P. 43–47.

## Chitosan Antiviral Activity: Dependence on Structure and Depolymerization Method

V. N. Davydova, V. P. Nagorskaya, V. I. Gorbach, A. A. Kalitnik, A. V. Reunov, T. F. Solov'eva, and I. M. Ermak

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia  
e-mail: piboc@eastnet.febras.ru

Received November 21, 2009

**Abstract**—Enzymatic (the action of lysozyme) and chemical (hydrogen peroxide) hydrolysis of chitosans with various degree of acetylation (DA)—25, 17, and 1.5%—was performed. Purification and fractioning of the hydrolysis products were performed using dialysis, ultrafiltration, and gel-penetrating chromatography. Low-molecular (LM) derivatives of the polysaccharide with molecular masses from 17 to 2 kDa were obtained. The study of their antiviral activity against the tobacco mosaic virus (TMV) showed that these samples inhibited the formation of local necroses induced by the virus for 50–90%. The antiviral activity of the LM chitosans significantly increased with the lowering of their polymerization degree. Furthermore, the products of the enzymatic hydrolysis possessed higher activity than the chitosan samples obtained as a result of chemical hydrolysis. It was revealed that the exhibition of the antiviral activity weakly depended on the degree of acetylation of the samples.