

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	БИОСИНТЕЗ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ МИКРОМИЦЕТАМИ (ОБЗОР) Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Вайнштейн М.Б.	125-134	1
<input type="checkbox"/>	ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ПРОСТРАНСТВА МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ Ильина А.П., Куликова О.Г., Мальцев Д.И., Краснов М.С., Рыбакова Е.Ю., Скрипникова В.С., Кузнецова Е.С., Буряк А.К., Ямскова В.П., Ямсков И.А.	135-140	1
<input type="checkbox"/>	КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ESCHERICHIA COLI БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SURF-6, ТРАНСЛЯЦИОННО СЛИТОГО С ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗОЙ Кордюкова М.Ю., Зацепина О.В., Ползиков М.А.	141-145	1
<input type="checkbox"/>	ИЗУЧЕНИЕ НОВОЙ ГРУППЫ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО (PLANTAGO MAJOR L.) Краснов М.С., Ямскова В.П., Маргасюк Д.В., Куликова О.Г., Ильина А.П., Рыбакова Е.Ю., Ямсков И.А.	146-153	7
<input type="checkbox"/>	AN ACTIVATED BY COBALT ALKALINE AMINOPEPTIDASE FROM BACILLUS MYCOIDES Jankiewicz U., Wnuk A.	154-161	0
<input type="checkbox"/>	RECOMBINANT GLYCEROL DEHYDRATASE FROM KLEBSIELLA PNEUMONIAE XJPD-LI: INDUCTION OPTIMIZATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION Xu X.L., Zhang G.L., Lv B., Yuan Y.J., Li C.	162-167	0
<input type="checkbox"/>	ИММОБИЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗЫ В КСЕРОГЕЛЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И СВОЙСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Сапунова Л.И., Шляхотко Е.А., Лобанок А.Г.	168-175	1
<input type="checkbox"/>	АДСОРБЦИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК РОДОКОККОВ В ГИДРОФИБИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ШИРОКОПОРИСТОГО ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО КРИОГЕЛЯ Куокина М.С., Ившина И.Б., Рубцова Е.В., Иванов Р.В., Лозинский В.И.	176-182	3
<input type="checkbox"/>	ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙПРОДУЦЕНТОВ L-АСПАРАГИНАЗ Покровская М.В., Покровский В.С., Соколов Н.Н.	183-186	4
<input type="checkbox"/>	СПОСОБНОСТЬ К АНАЭРОБНОМУ РОСТУ И АКТИВНОСТЬ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ У МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ Кураков А.В., Хидиров К.С., Садыкова В.С., Звягинцев Д.Г.	187-193	4
<input type="checkbox"/>	ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ RHYNLORHORA CRISPA Мейчик Н.Р., Попова Н.И., Николаева Ю.И., Ермаков И.П., Камнев А.Н.	194-200	0
<input type="checkbox"/>	ВЫДЕЛЕНИЕ ЭТИЛЕНА И АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ В ПЛОДАХ ЯБЛОНИ И БАНАНА ПРИ ДЕЙСТВИИ СТИМУЛЯТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА ЭТИЛЕНА Буланцева Е.А., Проценко М.А., Торопкина А.С., Кораблёва Н.П.	201-208	0
<input type="checkbox"/>	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ МЕДИ И ЕЕ РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ ЭТИХ ВИДОВ Ловкова М.Я., Бузук Г.Н.	□КО 209-216	2
<input type="checkbox"/>	GLUCOSE OXIDASE-POLYPYRROLE ELECTRODES SYNTHESIZED IN P-TOLUENESULFONIC ACID AND SODIUM P-TOLUENESULFONATE Ozyilmaz G., Ozyilmaz A.T., Can F.	217-225	0
<input type="checkbox"/>	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КУЛЬТУР АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ Рогатых С.В., Докшукина А.А., Хайнасова Т.С., Мурадов С.В., Кофиади И.А.	226-230	3
<input type="checkbox"/>	МЕТОД АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ЕГО РЕАЛИЗАЦИЯ В МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЕ Мамаев Д.Д., Ходаков Д.А., Дементьева Е.И., Филатов И.В., Юрасов Д.А., Черепанов А.И., Василисков В.А., Смолдовская О.В., Зименков Д.В., Грядунов Д.А., Михайлович В.М., Заседателев А.С.	231-240	1
<input type="checkbox"/>	МИКРОЧИПОВАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В МИКРОРЕАКТОРАХ РЕАКТИВАМИ Наволоцкий Д.В., Перчик А.В., Маркьянов И.А., Ганеев А.А., Сляднев М.Н.	241-248	1

УДК 582.28:579.222.3.083.1

БИОСИНТЕЗ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ МИКРОМИЦЕТАМИ (ОБЗОР)

© 2011 г. Э. Г. Дедюхина*, Т. И. Чистякова*, М. Б. Вайнштейн*, **

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН им. Г.К. Скрыбина, Пущино, Московская область, 142290
e-mail: dedeg@rambler.ru

**Пущинский государственный университет, Пущино, Московская область, 142290

Поступила в редакцию 12.04.2010 г.

Арахидоновая кислота (АК, 5,8,11,14-цис-эйкозатетраеновая кислота) широко используется в медицине, фармацевтике, косметике, диетпитании, сельском хозяйстве и других областях. Расширение сфер применения АК и ее низкое содержание в природных источниках (печень свиней, надпочечная железа, яичный желток) диктуют необходимость развития микробиологического производства АК. В обзоре рассматриваются механизмы биосинтеза АК и пути регуляции активности ферментов, вовлеченных в этот процесс. Обобщены данные литературы об этапах микробиологического производства АК, методах селекции активных штаммов-продуцентов, путях физиологической регуляции синтеза АК у микромицетов (влияние фазы роста, состава среды, pH, температуры, аэрации), эффективных технологиях ферментации и выделения конечного продукта. Представлены сведения о полном биотехнологическом процессе получения АК – от подбора штамма до увеличения выхода и очистки продукта.

Арахидоновая кислота (АК, 5,8,11,14-цис-эйкозатетраеновая кислота) относится к омега-6 группе незаменимых полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и играет важную роль в метаболических процессах в качестве предшественника простагландинов (серии 2), лейкотриенов и ряда эйкозаноидов. АК является действующим началом лекарственных средств и компонентов диетпитания, предотвращающих атеросклероз, коронарные болезни сердца и ряд других заболеваний. Подробная информация относительно применения АК в медицине и диетпитании приведена в обзорах [1–3].

В последние годы одной из наиболее важных областей применения АК являются питательные смеси для грудных детей [1, 2, 4]. Согласно рекомендациям Всемирной организация здравоохранения (ВОЗ), рекомендуемая норма потребления АК для недоношенных и нормальных грудных детей составляет 60 и 40 мг/кг в день соответственно. Рынок детского питания в мире достигает 10 миллиардов долларов в год [2].

Перспективным является использование АК в качестве стимулятора устойчивости растений к фитопатогенам [5–10]. Принимая во внимание, что препараты арахидоновой кислоты экологически безопасны, их применение позволит снизить или даже заменить использование экологически вредных фунгицидов, которые загрязняют экосистемы, нарушают равновесие и опасны для здоровья людей. Известно также, что АК повышает чувствительность патогенных дрожжей *Candida albicans* и *C. dubliniensis* к фунгицидам [11].

Основными природными источниками АК являются печень и надпочечная железа животных, а также желток куриных яиц; однако содержание АК на-

столько мало, что они не могут удовлетворить растущую потребность в этой физиологически активной кислоте. Кроме того, желток куриных яиц содержит холестерин и фосфор, поэтому его использование в больших количествах в качестве добавки к детскому питанию считается нежелательным [12].

Таким образом, ограниченность природных источников АК диктует необходимость развития ее микробиологического производства.

В настоящее время процессы получения АК с использованием различных штаммов грибов рода *Mortierella* запатентованы в Европе, Китае, Японии и США [13–18]. Промышленное производство микробных липидов с высоким содержанием АК (40–70%) существует в Италии и Китае [1]. АК включена в состав смесей для грудных детей в 60 странах мира и широко применяется в качестве пищевой добавки [1].

Механизмы сверхсинтеза липидов и образования арахидоновой кислоты. Известно, что необходимы условия интенсивного накопления липидов в клетках так называемых “липидных” микроорганизмов (образующих более 20% липидов от сухой биомассы) является разобщение конструктивного и энергетического метаболизма в условиях, когда рост клеток лимитирован питательными компонентами или ингибирован неблагоприятными значениями pH и температуры при избытке источника углерода и энергии в среде [19, 20].

Биохимические механизмы интенсивного синтеза липидов у микроорганизмов были детально исследованы группой Рэтлidge [1, 21–24]. Предполагаются две основные причины сверхсинтеза липидов – интенсивный синтез ацетил-КоА в цитозоле и образование достаточного количества НАДФН [1,

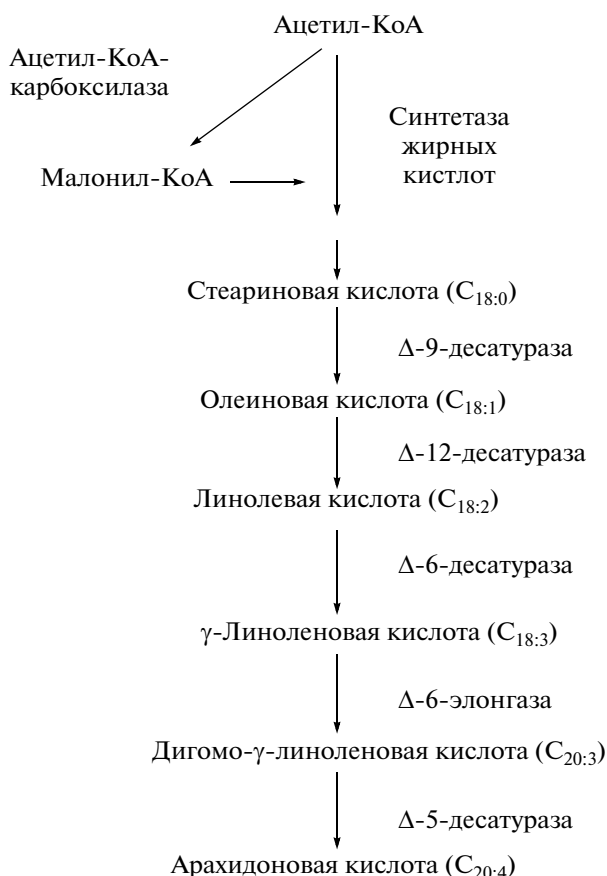


Схема биосинтеза арахидоновой кислоты [1, 3, 28].

22]. В настоящее время установлено, что активность малик-фермента, обеспечивающего запас НАДФН в клетке, лимитирует биосинтез жирных кислот у грибов [25, 26].

Биосинтез жирных кислот почти у всех организмов заканчивается образованием C_{16} - или C_{18} -насыщенных кислот, которые затем подвергаются серии реакций десатурации и удлинения с образованием полиненасыщенных жирных кислот. Известно, что десатуразы, являющиеся железосодержащими ферментами, вводят двойную связь в определенное положение от карбонильного конца жирной кислоты; эта реакция нуждается в молекулярном кислороде, НАД(Ф)Н, электрон-транспортной системе и концевой десатуразе [27]. Последовательность реакций удлинения жирных кислот такая же, как при синтезе жирных кислот *de novo*: основное различие заключается в том, что элонгаза является мембраносвязанным ферментом в отличие от синтетазы, которая является цитозольным ферментом [2].

Механизм биосинтеза АК представлен на рисунке [1, 3, 28]. Стеариновая кислота (C_{18}) превращается в олеиновую кислоту ($C_{18:1}$) с участием Δ -9-десатуразы. Установлено, что фермент, выделенный из *Mortierella alpina* 1S-4, является мембраносвязанным

белком ацил-КоА-типа, его аминокислотная последовательность имеет 45% сходство с аналогичным ферментом из *Saccharomyces cerevisiae* [28].

Превращение олеиновой кислоты в линолевую ($C_{18:2}$) происходит при участии мембраносвязанной Δ -12-десатуразы.

При участии Δ -6-десатуразы линолевая кислота превращается в γ -линоленовую кислоту ($C_{18:3}$ ω -6). Имеются данные, что в результате экспрессии гена Δ -6-десатуразы (Δ -6-1) из *M. alpina* 1S-4 в *Aspergillus oryzae* достигнуто усиление синтеза γ -линоленовой кислоты трансформантом [28].

Гамма-линоленовая кислота затем удлиняется до дигомо- γ -линоленовой кислоты (ДГЛК) ($C_{20:3}$ ω -6) при участии Δ -6-элонгазы. Предполагается, что именно активность Δ -6-элонгазы лимитирует скорость синтеза АК у *M. alpina* [29–31].

Как видно из рисунка, ДГЛК превращается в арахидоновую кислоту ($C_{20:4}$ ω -6) при участии Δ -5-десатуразы. Обнаружено, что мутант *M. alpina* 1S-4, характеризующийся отсутствием Δ -5-десатуразы, синтезировал ДГЛК и не образовывал АК [32, 33].

Для регуляции активности ферментов синтеза АК у грибов предлагается использовать как физиологические, так и генетические методы. В частности, известен прием повышения доли АК и других ПНЖК в липидах *Pythium debarianum* путем ингибирования активности липоксигеназы в присутствии витамина K_1 [34]. Показано, что активация Δ -12-десатуразы у дрожжей может быть достигнута при воздействии ионов металлов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) [27]. Было установлено, что экспрессия гена Δ -9-десатуразы у грибов подавлялась при добавлении ненасыщенных кислот в питательную среду и стимулировалась низкотемпературным стрессом [2, 27]. В последние годы приемы генной инженерии широко используются для регуляции синтеза АК. В частности, имеются данные, что экспрессия гена, кодирующего Δ -12-десатуразу, в мутантный штамм *M. alpina* JT-180 привела к усилению синтеза АК в 1.7 раза [28]. В результате экспрессии в *M. alpina* гена, кодирующего Δ -6-элонгазу, синтез АК у трансформанта усилился в 1.9 раза по сравнению с диким штаммом [28, 31].

Имеется информация, что экспрессия генов Δ -5-, Δ -6-, Δ -9- и Δ -12-десатураз из *M. alpina* в *A. oryzae*, *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Yarrowia lipolytica* превращала данные виды в потенциальные продуценты незаменимых жирных кислот [3, 35–38]. Генетически стабильные трансформанты являются также идеальными моделями для изучения механизмов липогенеза у грибов.

Продуценты арахидоновой кислоты. Изомеры ПНЖК относятся главным образом к ω -3- и ω -6-типам (цифра означает положение двойной связи от метильного конца молекулы жирной кислоты). Способность организмов к синтезу тех или иных

изомеров ПНЖК рассматривается в качестве таксономического признака [39]. Известно, что представители классов Basidiomycetes и Ascomycetes образуют ненасыщенные кислоты только ω -3-типа, тогда как представители Phycomycetes (подклассы Oomycetes и Zygomycetes) синтезируют преимущественно ω -6-ПНЖК.

В настоящее время мицелиальные грибы считаются наиболее перспективными продуцентами АК, хотя в ряде исследований в качестве потенциальных источников АК рассматриваются водоросли [40–42].

Исследованию синтеза АК представителями подкласса Oomycetes посвящена серия работ И.В. Коновой с соавт. [34, 43–48]. Синтез эйкозаполиеновых кислот ($C_{20:3}$, $C_{20:4}$, $C_{20:5}$), до 30% от суммы кислот был обнаружен у различных видов оомицетов из рода *Saprolegnia*. Наибольшее содержание АК (18.6–24.6% от липидов) отмечено у штаммов *S. blehamensis* на среде с глюкозой и бактопептоном [45]. У оомицетов рода *Phytophthora* в составе липидов преобладала эйкозапентаеновая кислота и доля АК не превышала 10% от суммы жирных кислот [44]. Следовые количества АК обнаружены у оомицетов *Absidia corymbifera* [48].

Имеются сведения о синтезе АК грибами *P. ultimum* (16.1% от липидов; 322 мг/л) [49], *P. debaryanum* (11.4–14.7% от суммы жирных кислот) [46, 47] и *P. insidiosum* (30–35% от липидов) [4].

Анализ данных литературы показывает, что наиболее перспективные продуценты АК были обнаружены среди видов *Mortierella* (класс Phycomycetes, подкласс Zygomycetes, семейство Mortierellaceae). Согласно классификации [50], виды *Mortierella* подразделяются на 7 секций (*Isabellina*, *Stylospora*, *Alpina*, *Jenkinia*, *Dichotoma*, *Hygrophila* и *Polycephala*), главным образом, по морфологическим признакам. Позднее данная классификация была модифицирована [51]: род *Mortierella* был разделен на 2 подрода (*Micromucor* и *Mortierella*). Было показано, что эти подроды различались по жирнокислотному составу липидов: подрод *Mortierella* содержал виды, синтезирующие АК, тогда как представители подрода *Micromucor* не обладали этой способностью [52–54].

Содержание АК у одного и того же вида, как правило, варьирует в широких пределах, что может объясняться как штаммовыми различиями, так и влиянием условий культивирования.

У представителей секции *Stylospora* (*M. humilis*, *M. camargensi*, *M. lignicola*, *M. sepedonioides*, *M. stylospora*, *M. zonata*) доля АК в липидах составляет от 6.2 до 27.5%. Наиболее активные штаммы относятся к виду *M. humilis* (*M. verticillata*) [53–55].

Представители секции *Jenkinia* (*M. dichotoma*, *M. jenkinsii*, *M. sclerotiella*) характеризуются сравнительно низким содержанием АК в липидах (5.9–11.8%) [56].

У фикомицетов секции *Hygrophila* (*M. elongata*, *M. bainieri*, *M. beljakovae*, *M. clonocystis*, *M. epigama*, *M. gemmifera*, *M. hyalina*, *M. hygrophila*, *M. kuhlmanni*, *M. marburgensis*, *M. minutissima*, *M. nigrescens*, *M. sarnyensis*, *M. sclerotiella*, *M. selenospora*, *M. zychae*) доля АК в липидах варьирует от 6.2 до 35.6%; наиболее активными продуцентами являются штаммы *M. elongata* [53–55, 57].

Синтез АК у представителей секции *Polycephala* (*M. polycephala*, *M. gamsii*, *M. nantahalensis*, *M. oligospora*, *M. parvispora*, *M. pulcheria*, *M. reticulata*, *M. spinosa* (*M. exigua*), *M. umbellata*) варьирует в пределах 6.2–41.8% от липидов; наиболее активные штаммы относятся к виду *M. polycephala* [53–55].

Секция *Alpina* включает виды, синтезирующие АК от 12.7 до 75% от липидов (*M. alpina*, *M. alliacea*, *M. clausenii*, *M. globalpina*, *M. globulifera*, *M. pusilla*, *M. strangulata*, *M. rostafinskii*). Следует отметить, что наиболее перспективными продуцентами являются штаммы вида *M. alpina*, липиды которых содержат более 40% АК [58–66]. Показано, что представители данного вида непатогенны, не образуют микотоксинов и потенциально аллергенных спор в условиях глубинной ферментации [67]. Липиды *M. alpina* не проявляют острой токсичности и не обладают мутагенной или кластогенной активностью [68], что особенно важно при использовании АК-содержащих липидов в качестве пищевых добавок.

Считается, что физиологически активные ПНЖК сосредоточены в основном в фосфолипидной фракции [69, 70]. Однако в исследованиях с грибами, относящимися к подклассу Oomycetes (*P. debaryanum* и *P. cryptogea*) было установлено, что АК, в отличие от эйкозапентаеновой кислоты ($C_{20:5}$), локализована преимущественно во фракции триацилглицеринов (ТАГ) [44, 71]. Подобная закономерность обнаружена и у грибов рода *Mortierella*; в частности, было показано, что у *M. hygrophila* основная часть внутриклеточного пула АК (83.7%) сконцентрирована в ТАГ и только 16.3% содержится в фосфолипидах [57]. Позднее было установлено, что основная масса АК в мицелии *M. alpina* также сконцентрирована в ТАГ [72, 73]. Было обнаружено, что АК в составе ТАГ у грибов *Mortierella* локализована преимущественно в положении 1 и, следовательно, легко высвобождается при воздействии панкреатической липазы [74]. Высокое содержание АК (до 50% от суммы жирных кислот), обнаруженное в спорах *M. alpina*, свидетельствует, по мнению авторов, о ее роли в качестве резерва углерода и энергии, который расходуется при прорастании спор [75].

Селекция продуцентов арахидоновой кислоты. Для селекции продуцентов АК разработан ряд приемов. Один из методов основан на использовании ацетилсалициловой кислоты (АСК). Известно, что АСК является ингибитором метаболизма АК, ацетилирует концевую аминогруппу одной из субъединиц простагландин-синтетазы и тормозит биосинтез про-

стагландинов [76]. В частности, было показано, что АСК в концентрации 1 мМ ингибирует синтез АК-метаболитов у дрожжей [77, 78]. При исследовании влияния различных концентраций АСК на рост 87 штаммов грибов рода *Mortierella* было обнаружено, что АСК в концентрации 0.84 г/л селективно ингибировала рост АК-образующих штаммов и не оказывала влияния на рост грибов, не способных к синтезу АК. Данный метод был использован для селекции грибов рода *Mortierella*, продуцентов АК [79].

Известен быстрый метод селекции продуцентов АК, основанный на корреляции между содержанием АК в липидах и интенсивностью окраски мицелия хлористым трифенилтетразолием [63].

В качестве одного из критериев при отборе мутантов грибов, продуцентов АК или эйкозапентаеновой кислоты, предложено использовать такой морфологический признак, как степень развития воздушного мицелия колоний, образованных на агаризованной среде [80].

Мутант *M. alpina* SAM2239, образующий до 75% АК от суммы жирных кислот, был получен при обработке исходного штамма *M. alpina* IFO8568 N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином [13].

В последние годы приемы генной инженерии (экспрессия генов, ответственных за те или иные промежуточные реакции синтеза АК) успешно используются для повышения синтеза АК у штаммов грибов рода *Mortierella* [28, 81, 82]. Мутанты, полученные в результате химического мутагенеза, подвергают прямой трансформации маркерами устойчивости к антибиотикам или маркерами урацил-ауксотрофии [28]. Показано, что мутант *M. alpina* JT-180, дефектный по Δ -12-десатуразе, проявлял повышенные активности Δ -5- и Δ -6-десатураз, поэтому экспрессия гена Δ -12-десатуразы в данный штамм привела к значительному усилению синтеза АК [28]. Примеры получения генетически стабильных трансформантов, характеризующихся повышенным синтезом тех или иных ПНЖК, приведены в работе [28].

Следует отметить, что селекция новых штаммов-продуцентов АК остается актуальной задачей. Необходимым условием развития промышленного производства АК является также разработка приемов физиологической регуляции синтеза АК, оптимизация ферментационного процесса.

Влияние условий культивирования на синтез арахиновой кислоты у грибов. Зависимость жирнокислотного состава микробных липидов от условий культивирования продуцентов (фаза роста, состав среды, pH и температура) обсуждается в ряде обзоров [2, 3, 83–85].

Представленная в данном разделе информация касается преимущественно регуляции синтеза АК у представителей рода *Mortierella*, поскольку они считаются наиболее перспективными продуцентами.

Считается, что интенсивный синтез липидов у микроорганизмов является типичным двухфазным процессом и происходит в стационарную фазу роста периодических культур [21]. Исключения из этого правила очень редки, известны лишь несколько штаммов дрожжей [86, 87] и штамм грибов *M. alpina* LPM-301 [60], характеризующихся уникальной способностью к интенсивному синтезу липидов в период активного роста. У штамма *M. alpina* LPM-301 синтез липидов совпадал по времени с активным ростом мицелия и достигал наибольшего значения в стационарную фазу роста. В условиях непрерывного культивирования штамма увеличение удельной скорости роста от 0.03 до 0.05 ч⁻¹ приводило к двукратному увеличению удельной скорости синтеза липидов [60]. Интересно отметить, что при периодическом культивировании штамма *M. alpina* LPM-301 содержание липидов в стационарной фазе оставалось неизменным, тогда как доля АК в липидах продолжала увеличиваться до конца ферментации (210 ч) за счет метаболизации как насыщенных жирных кислот, так и ненасыщенных АК-предшественников [60]. Превращение внутриклеточных жирных кислот в АК было также обнаружено у штамма *M. alpina* M6 после истощения глюкозы в среде [58].

Имеются данные, что инкубация отфильтрованного мицелия *M. alpina* при 28°C в течение 6 сут приводила к снижению содержания пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и линолевой кислот и увеличению доли АК до 67.4% от суммы жирных кислот [52]. Превращение олеиновой и линолевой кислот в АК в стационарную фазу роста было также обнаружено у штамма *M. alpina* SC9 [66].

Таким образом, для повышения доли АК в мицелиальных липидах можно рекомендовать продление стационарной фазы роста или инкубирование отфильтрованного мицелия в течение нескольких суток. Однако следует иметь в виду, что данные приемы не приводят к увеличению количества липидов в мицелии.

Необходимым условием интенсивного синтеза липидов у микроорганизмов является избыток в среде источника углерода и энергии и лимитирование роста недостатком минеральных компонентов (азот, фосфор, ионы металлов). Установлено, что в условиях лимитирования роста грибов недостатком азота концентрация избыточного углеродного субстрата оказывает существенное влияние как на образование липидов, так и на синтез АК. При концентрации глюкозы в среде выше 150 г/л снижался выход липидов и АК у *M. alpina* [12]. Отношение C/N в среде, оптимальное для синтеза АК различными штаммами рода *Mortierella*, варьирует от 5 до 60 [14, 15, 64, 88].

Наиболее часто используемым углеродным субстратом для синтеза АК фиккомицетами является глюкоза [12, 60, 89].

Имеются данные, что этанол стимулировал образование АК грибами [90–92]. Показано, что дробная добавка этанола к растущей культуре *M. alpina* ME-1 повышала образование АК в 1.7 раз (до 19.8 г/л) [91].

Недавно в качестве субстрата для синтеза АК грибами рода *Mortierella* был успешно использован глицерин [55]. Поскольку глицерин образуется в больших количествах в качестве побочного продукта при производстве биодизеля из растительных масел, его использование для производства АК следует считать перспективным.

Данные о влиянии растительных масел на синтез АК грибами *Mortierella* довольно противоречивы [52, 59, 93]. Анализ активности ферментов *M. alpina* при культивировании гриба на средах, содержащих жирные кислоты, показал, что экзогенные липиды подавляли *de novo* синтез жирных кислот, но не влияли на десатурацию или удлинение уже существующих жирных кислот [29]. Известно, что кунжутное масло оказывало значительное влияние на жирнокислотный состав липидов *M. alpina* 1S-4, увеличивая отношение ДГЛК к АК [94]. Позднее было обнаружено, что кунжутное масло содержит сезамин, который ингибирует Δ -5-десатуразу, ответственную за превращение ДГЛК в АК [95].

Имеются данные, что внесение стерина (эргостерин и холестерин) в питательную среду стимулировало рост оомицета *P. debaryanum* в 3.7–4.3 раза, что приводило к значительному повышению выхода АК (в расчете на объем среды) [46].

Для культивирования фикомицетов используют преимущественно комплексные азотсодержащие субстраты, такие, как соевая мука, мясной, кукурузный, дрожжевой экстракты [16, 65, 66, 94, 96]. Однако некоторые штаммы *Mortierella* могут успешно расти и синтезировать АК при ассимиляции индивидуальных источников азота – соли аммония, нитраты и мочевины [60, 64, 97]. В частности, при культивировании штамма *M. alpina* LPM-301 на средах с глюкозой и нитратом калия или мочевиной в качестве единственных источников азота образование АК достигало 4.5 и 4.2 г/л соответственно [60]. Имеются данные, что глутамат стимулировал синтез АК у *M. alpina*, однако механизм его действия не ясен [62, 98].

Влияние ионов металлов на синтез АК у грибов изучено очень слабо. Роль незаменимых ионов металлов (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Ni) в метаболизме микроорганизмов связывают, главным образом, с их участием в структуре и функционировании металлоферментов и в стабилизации клеточных мембран [27, 99–101].

Имеются данные о возможности замены ионов металлов в составе ферментов; образующиеся производные часто сохраняют активность, но отличаются от природных ферментов спектром ферментативной активности [85]. Эти наблюдения позволяют предположить, что метод замены ионов металлов

может быть использован для регуляции метаболизма микроорганизмов. В частности, замена ионов Zn^{2+} на Co^{2+} в хемотропной культуре липидообразующих дрожжей *Trichosporon pullulans* привела к усилению синтеза липидов [85]. Можно предположить, что подобный подход может быть использован для регуляции синтеза липидов и АК у грибов.

Было высказано предположение, что ионы цинка регулируют активность глицерол-3-фосфат дегидрогеназы в дрожжевых клетках и оказывают существенное влияние на синтез липидов [102]. Имеются сведения, что ионы цинка повышают активность Δ -12-десатуразы, которая участвует в синтезе линолевой кислоты из олеиновой [27].

Поскольку десатуразы являются железосодержащими ферментами [27], можно предположить, что концентрация ионов железа в среде должна оказывать влияние на синтез полиненасыщенных жирных кислот у грибов. Влияние ионов железа на метаболизм липидов, вероятно, также связано с их участием в регуляции синтеза цитрата, роль которого в образовании жирных кислот детально исследована [1, 21, 23, 24]. Обратная зависимость между концентрацией ионов железа в среде и содержанием липидов обнаружена у дрожжей [103]. Подобные результаты были также получены в исследованиях с грибами: добавление ионов Fe^{2+} (800 мг/л) в среду Чапека подавляло синтез липидов у штамма *Mortierella* sp. S-17 [104].

Группой японских авторов показано, что увеличение концентрации солей Na_2SO_4 , $CaCl_2$ и $MgCl_2$ на фоне комплексной среды с соевой мукой и дрожжевым экстрактом повышало выход АК у штамма *M. alpina* 1S-4 [105]. При одновременном лимитировании роста грибов ионами Fe^{3+} и Mg^{2+} наблюдалось нарушение обмена липидов у грибов *Zygomycetes* [106]. В исследованиях со штаммом *M. schmuckeri* S-12 было обнаружено, что снижение концентрации ионов магния в среде усиливало синтез АК [15].

Противоречивые результаты получены по влиянию ионов марганца на синтез липидов и АК у грибов: внесение ионов Mn^{2+} (2 мг/л) в среду Чапека стимулировало синтез липидов и АК у *Mortierella* sp. S-17 [104], в то же время ионы марганца не оказывали влияния на синтез липидов у грибов рода *Microascus* [107]. Очевидно, действие ионов марганца на синтез липидов и АК у грибов зависит от особенностей штаммов.

В заключение следует отметить, что концентрация ионов металлов в среде является эффективным, но еще мало изученным фактором регуляции синтеза липидов и АК у грибов.

Из физических факторов наибольшее влияние на жирнокислотный состав липидов оказывает температура. Считается, что адаптивные реакции микроорганизмов на действие температуры включают изменение уровня ненасыщенных жирных кислот в

Микробиологическое получение арахидоновой кислоты

Штамм	Образование АК	Ссылка
<i>Mortierella alpina</i> LPM-301	60.4% от суммы липидов; 18.8% от биомассы	[60]
<i>M. alpina</i> M-6	54.5% от суммы липидов; 20.9% от биомассы	[58]
<i>M. alpina</i>	18.8 г/л	[97]
<i>M. alpina</i> ME-1	19.8 г/л	[91]
<i>M. alpina</i> CBS 168.95	50–60% от суммы липидов	[17, 18]
<i>M. alpina</i> 1S-4	18.2 г/л	[16]
<i>M. schmuckeri</i> S12	40.3% от суммы липидов; 13.6% от биомассы	[14, 15]
<i>M. alpina</i> SAM2239	75% от суммы липидов; 4.1 г/л	[13]
<i>M. alpina</i> ATCC 42430	40% от триацилглицеринов	[4]

липидов мембран [108]. Как правило, снижение температуры культивирования стимулирует синтез ненасыщенных жирных кислот у грибов [3, 13, 69, 72]. Прием культивирования грибов в условиях низкой температуры был использован для селекции штаммов—продуцентов АК, большая часть которых принадлежала к виду *M. alpina* [78].

Было показано, что активности Δ-6- и Δ-5-десатураз, участвующих в синтезе АК, возрастают при понижении температуры и, следовательно, для увеличения выхода АК желательнее культивирование продуцентов при пониженной температуре [9, 73]. Однако следует иметь в виду, что при понижении температуры может усиливаться синтез жирных кислот, более ненасыщенных, чем АК. В частности, было установлено, что оптимальная температура для синтеза АК представителями рода *Mortierella* (*M. hygrophila*, *M. zychae*, *M. elongata*, *M. parvispora*, *M. schmuckeri* и *M. alpina*), составляла 25–28°C, тогда как при понижении температуры синтезировалась преимущественно более ненасыщенная эйкозапентаеновая кислота (C_{20:5}) [94, 109, 110]. Подобная закономерность обнаружена и у оомицетов рода *Saprolegnia* [45].

Таким образом, понижение температуры культивирования продуцентов является эффективным приемом усиления синтеза АК. Рекомендуется использовать штаммы, не способные к синтезу кислот с более высокой степенью ненасыщенности, чем АК.

Анализ литературы показывает, что, как правило, pH не оказывает существенного влияния на синтез липидов у эукариотных микроорганизмов [83], хотя имеются данные, что содержание полиненасыщенных жирных кислот в липидах *M. rammaniana* var. *angulispora* возрастало с увеличением величины pH [3, 111].

Можно предположить, что более существенное влияние на синтез полиненасыщенных кислот у грибов должна оказывать степень аэрации, поскольку реакции десатурации жирных кислот требуют присутствия молекулярного кислорода. Исследованию влияния концентрации растворенного кислорода на морфологию грибов и синтез полиненасыщенных жирных кислот посвящен ряд публикаций [65, 69, 112]. Полученные данные относительно влияния кислорода на синтез АК довольно противоречивы. Исследования, проведенные с грибами *Entomophthora exitalis*, показали, что концентрация кислорода не оказывала заметного влияния на синтез АК и других полиненасыщенных жирных кислот [69]. Однако имеются данные, что увеличение концентрации кислорода в газовой смеси, подаваемой в ферментер, до 25% (по сравнению с 21%) при культивировании *M. alpina* повышало образование АК (г/л) на 60% [112]. Следует отметить, что перспективность использования данного приема при промышленном производстве АК требует экономического обоснования. Наши исследования с липидообразующими дрожжами *T. pullulans* показали, что потребность клеток в кислороде резко возрастала при лимитировании роста недостатком ионов железа [103]. Это наблюдение еще раз подтверждает необходимость тщательного подбора состава питательной среды при культивировании продуцентов АК.

Способы микробиологического производства арахидоновой кислоты. Возрастающая потребность в АК, главным образом в медицине, фармацевтике и диетпитании, диктует необходимость разработки эффективных микробиологических процессов ее производства.

В таблице представлены современные наиболее эффективные примеры получения АК с использованием грибов рода *Mortierella*.

Как показали наши исследования, при периодическом культивировании штамма *M. alpina* LPM-301 в течение 8 сут в ферментере объемом 100 л на среде с глюкозой и нитратом калия содержание АК достигало 60.4% от суммы липидов и 18.8% — от биомассы [60].

Во многих процессах промышленного получения АК используется метод культивирования продуцентов с дробным внесением углеродного субстрата, который позволяет избежать катаболической репрессии в присутствии высоких концентраций глюкозы. В частности, интенсивный синтез АК (54.5% от суммы липидов и 20.9% — от сухой биомассы) был достигнут при периодическом культивировании *M. alpina* M-6 с дробным внесением питательной среды, содержащей глюкозу и нитрат калия, на 3, 4 и 5 сут культивирования [58]. Процесс продолжался в течение 8 сут до полного потребления глюкозы. Концентрации добавляемых компонентов были рассчитаны на основании предварительного анали-

за динамики потребления субстратов данной культуры.

Образование АК в количестве 18.8 г/л грибом *M. alpina* было достигнуто методом периодического культивирования с подпиткой на среде с глюкозой и кукурузным экстрактом в течение 12.5 сут [97].

Двухстадийный процесс ферментации был применен для получения АК (19.8 г/л) с использованием штамма *M. alpina* ME-1 [91]. Для повышения выхода АК в ферментер вносили этанол (3 и 2%) на 5 и 7 сут культивирования соответственно.

Недавно предложен процесс получения АК (50–60% от липидов), включающий двухстадийное культивирование штамма *M. alpina* CBS 168.95 на среде, содержащей глюкозу, дрожжевой экстракт и минеральные соли [17, 18]. В первой стадии грибы выращивали в условиях избытка глюкозы, концентрацию которой поддерживали на уровне 20 г/л в течение 6–8 сут; во второй стадии (3–5 ч) глюкоза полностью потреблялась и доля АК в липидах увеличивалась до 60% за счет метаболизации других внутриклеточных жирных кислот. Следует подчеркнуть, что во второй фазе содержание липидов в мицелии не возрастало.

Разработан метод получения полиненасыщенных жирных кислот с использованием приема криоконсервации клеток [16]. При культивировании штамма *M. alpina* 1S-4 на среде, содержащей глюкозу, соевую муку и минеральные соли, в течение 306 ч содержание АК составляло 18.2 г/л. Стабильность ферментационного процесса достигалась использованием криоконсервированной культуры. Суспензию спор, глицерин и воду смешивали в соотношении 1 : 1 : 8 и криоконсервировали при –80°C.

Известен процесс получения АК (40.3% от суммы липидов; 13.6% от сухой биомассы), который включает культивирование штамма *M. schmuckeri* S-12 в течение 72 ч на среде, содержащей глюкозу, кукурузный экстракт, неорганические соли и витамины [14, 15]. Полученные липиды предложено использовать в качестве пищевых добавок или компонентов питательных смесей для детей.

Для получения липидов с высоким содержанием АК предложено использовать мутантный штамм *M. alpina* SAM2239, неспособный синтезировать эйкозапентаеновую ($C_{20:5}$) кислоту [13]. Грибы культивировали на среде, содержащей глюкозу, соевую муку и неорганические соли, при 24°C в течение 3 сут, затем температуру снижали до 12°C для усиления синтеза АК, содержание которой составляло 75% от суммы липидов и достигало 4.1 г/л.

Способ получения липидов с высоким содержанием АК (до 40% от ТАГ) и низкой долей $C_{20:5}$ -кислоты (не более 1/5 от уровня АК) разработан с использованием штамма *M. alpina* ATCC 42430 [4]. Культивирование продуцента проводили на среде с глюкозой и соевой мукой. Полученные липиды предлагается добавлять в смеси для детского пита-

ния в количестве, сравнимом с содержанием АК в женском молоке.

Методы выделения и очистки арахидоновой кислоты из микробных липидов. Физико-химические методы выделения и очистки полиненасыщенных жирных кислоты детально описаны в обзоре [2].

Предварительное увеличение доли полиненасыщенных жирных кислот в микробных липидах может быть достигнуто следующими приемами. (1) Выдерживание липидов при пониженной температуре, при этом насыщенные кислоты выпадают в осадок и могут быть отделены от ненасыщенных жирных кислот. (2) Гидролиз глицеридов до глицерина и свободных жирных кислот путем омыления липидов щелочью или с использованием липаз. (3) Комплексообразование насыщенных кислот с мочевиной. С этой целью добавляют мочевины и водный раствор этанола к смеси жирных кислот, затем комплексы насыщенных кислот с мочевиной удаляют центрифугированием или фильтрованием; фильтрат подкисляют и ненасыщенные кислоты экстрагируют гексаном. (4) Использование 2- или 1,3-специфичных липаз для концентрирования ПНЖК. Поскольку известно, что АК в липидах грибов рода *Mortierella* локализована преимущественно в 1-положении триацилглицеринов [74], можно предположить, что использование ферментативного метода будет эффективным для концентрирования АК. Известно, что липазы успешно применялись для получения эфиров АК с сахарами, которые использовались в косметике, диетпитании и фармацевтике [2].

Следует отметить, что выделение высокоочищенной АК из смеси ПНЖК представляет серьезные трудности. Предлагается использовать ферментативные методы, ионообменную или высокоэффективную жидкостную хроматографию [2]. Следовательно, при микробиологическом производстве АК очень важно применять продуценты и условия культивирования, обеспечивающие получение липидов с преимущественным содержанием АК.

Можно утверждать, что в ближайшем будущем промышленные микробиологические процессы станут основным источником АК для медицины, фармакологии, косметики и сельского хозяйства.

Для развития эффективного микробиологического производства АК особое внимание должно быть уделено селекции активных штаммов-продуцентов и разработке ферментационной технологии, обеспечивающей получение липидов с преимущественным содержанием АК.

Анализ литературы позволяет постулировать несколько основных положений и дать рекомендации к развитию микробиологического производства АК. Так, можно сделать заключение, что, хотя способность к синтезу АК широко распространена среди мицелиальных грибов, относящихся к классу *Phyco-*

mycetes, наиболее перспективными продуцентами АК являются представители вида *M. alpina*. Показано, что штаммы данного вида непатогенны и не образуют микотоксинов. Для физиологической регуляции синтеза АК грибами могут быть использованы различные приемы. В частности, повышение уровня АК в липидах может быть достигнуто увеличением продолжительности стационарной фазы или инкубированием отфильтрованного мицелия в течение нескольких суток. Понижение температуры культивирования рекомендуется для интенсификации синтеза АК у штаммов, неспособных к образованию более ненасыщенных, чем АК кислот. Следует отметить, что концентрация ионов металлов в среде является эффективным, но еще мало используемым фактором регуляции синтеза АК у грибов. Анализ имеющихся процессов промышленного производства АК показывает, что наиболее перспективным является дробное внесение углеродного субстрата или использование приема двухстадийного культивирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ratledge C.* // *Biochimie*. 2004. V. 8. P. 807–815.
2. *Ward O., Singh A.* // *Process Biochem*. 2005. V. 4. P. 3627–3652.
3. *Dyal S.D., Narine S.S.* // *Food Res. Intern*. 2005. V. 38. № 4. P. 445–467.
4. *Kyle D.J.* // Patent JP (Japan). 2007. № 319161(A).
5. *Bostock R.M., Kuc J.A., Laine R.A.* // *Science*. 1981. V. 212. № 4490. P. 67–69.
6. *Preisig C.L., Kuc J.A.* // *Arch. Biochem. Biophys*. 1985. V. 236. № 1. P. 379–389.
7. *Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 3. С. 325–339.
8. *Озерецковская О.Л., Ильинская Л.И., Васюкова Н.И.* // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 4. С. 626–633.
9. *Ильинская Л.И., Чаленко Г.И., Переход Е.А., Озерецковская О.Л., Аверьянов А.А.* // Докл. РАН. 1998. Т. 359. № 6. С. 828–831.
10. *Eroshin V.K., Dedyukhina E.G.* // *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2002. V. 18. № 2. P. 165–167.
11. *Ells R., Kock J.L., VanWyk P.W., Botes P.J., Pohl C.H.* // *J. Antimicrob. Chemother*. 2009. V. 63. № 1. P. 124–128.
12. *Zhu M., Yu L.J., Wu Y.X.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2003. V. 30. № 1. P. 75–79.
13. *Akimoto K., Higashiyama K., Shimizu A.* // Patent JP (Japan). 2000. № 2000069987.
14. *Barclay W.R.* // Patent EP (Europe). 2006. № 1726217 (A1).
15. *Barclay W.R.* // Patent US (United States). 2007. № 2007002050.
16. *Higashiyama K.* // Patent JP (Japan). 2006. № WO2006016702 (A1).
17. *Streekstra H., Brocken P.J.M.* // Patent US. 2008. № 7470527.
18. *Streekstra H., Brocken P.J.M.* // Patent US. 2009. № 2009003342 (A1).
19. *Работнова И.Л., Позмогова И.Н.* Хемостатное культивирование и ингибирование роста микроорганизмов. М.: Наука, 1979. 207 с.
20. *Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К.* // Успехи микробиологии. 1992. Т. 25. С. 126–142.
21. *Ratledge C.* *Biotechnology* / Eds. H. Kleinkauf, Von Dohren H. Weinheim: VCH, 1997. V. 7. P. 133–197.
22. *Botham P.A., Ratledge C.* // *J. Gen. Microbiol*. 1979. V. 114. № 2. P. 361–375.
23. *Boulton C.A., Ratledge C.* // *J. Gen. Microbiol*. 1981. V. 127. № 2. P. 169–176.
24. *Ratledge C., Evans C.T.* *The Yeasts* / Eds. Rose A.H., J.S. Harrison N.-Y.: Acad. Press, 1989. V. 3. P. 368–455.
25. *Zhang Y., Adams I.P., Ratledge C.* // *Microbiology*. 2007. V. 153. P. 2013–2025.
26. *Zhang Y., Ratledge C.* // *Mycol. Res*. 2008. V. 112. № 6. P. 725–730.
27. *Warude D., Joshi K., Harsulkar A.* // *Crit. Rev. Biotechnol*. 2006. V. 26. № 2. P. 83–93.
28. *Sakuradani E., Ando A., Ogawa J., Shimizu S.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2009. V. 84. № 1. P. 1–10.
29. *Wynn J.P., Ratledge C.* // *Microbiology*. 2000. V. 146. № 9. P. 2325–2331.
30. *Parker-Barnes J.M., Das T., Bobik E., Leonard A.E., Thurmond J.M., Chaung L.T., Huang Y.S., Mukerji P.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 15. P. 8284–8289.
31. *Takeno S., Sakuradani F., Murata S., Inohara-Ochiai M., Kawashima H., Ashikari T., Shimizu S.* // *Lipids*. 2005. V. 40. № 1. P. 25–30.
32. *Jareonkitmongkol S., Kawashima H., Shirasaka N., Shimizu S., Yamada H.* // *Appl. Environ. Microbiol*. 1992. V. 58. № 7. P. 2196–2200.
33. *Kawashima H., Akimoto K., Higashiyama K., Fujikawa S., Shimizu S.* // *J. Amer. Oil Chem. Soc*. 2000. V. 77. P. 1135–1138.
34. *Дюкова В.И., Демчева Е.А., Ткачевская Е.П., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Конова И.В., Евстигнеева Р.П.* // Биотехнология. 2003. № 6. С. 17–23.
35. *Michaelson L.V., Lazarus C.M., Griffiths G., Napier J.A., Stobart A.K.* // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. № 30. P. 19055–19059.
36. *Damude H.G., Gillies P.J., Macool D.J., Picataggio S.K., Pollak D.M.W., Raghianti J.J., Xue Z., Yadav N.S., Zhang H., Zhu Q.Q.* // Patent US. 2006. № WO2006055322.
37. *Xue Z., Yadav N.S., Macool D.J.* // Patent US. 2006. № WO2006052814.
38. *Li Y.T., Li M.T., Fu C.H., Zhou P.P., Liu J.M., Yu L.J.* // *Biotechnol. Lett*. 2009. V. 31. № 7. P. 1011–1017.
39. *Shaw R.* // *Advances in Lipid Research* / Eds. R. Paoletty, D. Kritchevsky. N.-Y.: Acad. Press, 1966. V. 4. P. 107–174.
40. *Bigogno C., Khozin-Goldberg I., Alderstein D., Cohen Z.* // *Lipids*. 2002. V. 37. № 2. P. 209–216.
41. *Cheng-Wu Z., Cohen Z., Khozin-Goldberg I., Richmond A.* // *J. Appl. Phycol*. 2002. V. 14. P. 453–460.
42. *Kyle D.J.* // Patent US. 2008. № 7396548.

43. Галанина Л.А., Соловьева Н.Л., Конова И.В. // Микробиология. 1999. Т. 68. № 4. С. 473–479.
44. Панькина О.И., Конова И.В. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 2. С. 177–181.
45. Галанина Л.А., Конова И.В. // Микробиология. 1999. Т. 68. № 4. С. 480–484.
46. Галанина Л.А., Конова И.В. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 5. С. 636–641.
47. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Ткачевская Е.П., Конова И.В., Евстигнеева Р.П. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 2. С. 196–203.
48. Конова И.В., Галанина Л.А., Кочкина Г.А., Панькина О.И. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 5. С. 639–647.
49. Gandhi S.R., Weete J.D. // J. Gen. Microbiol. 1991. V. 137. № 8. P. 1825–1830.
50. Милько А.А. Определитель мукооральных грибов. Киев: Наукова думка, 1974. 303 с.
51. Gams W. // Persoonia. 1977. V. 9. P. 381–391.
52. Shinmen Y., Shimizu S., Akimoto K., Kawashima H., Yamada H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 31. № 1. P. 11–16.
53. Amano N., Shinmen Y., Akimoto K., Kawashima H., Amai T. // Mycotaxon. 1992. V. 44. № 2. P. 257–265.
54. Eroshin V.K., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Zhelifonova V.P., Kurtzman C.P., Bothast R.J. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 12. № 1. P. 91–96.
55. Hou C.T. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 6. P. 501–506.
56. Barclay W.R. // Patent US. 2003. № 6541049.
57. Желифонова В.П., Зинченко Г.А., Белов А.П., Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К. // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 4–5. С. 610–616.
58. Zhu M., Long-Jiang Yu., Wei L., Peng-Peng Z., Chun-Yan L. // Enzyme Microbial Technol. 2006. V. 38. № 6. P. 735–740.
59. Bajpai P.K., Bajpai P., Ward O.P. // J. Ind. Microbiol. 1991. V. 8. № 3. P. 179–186.
60. Eroshin V.K., Satroudinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I. // Process Biochem. 2000. V. 35. № 10. P. 1171–1175.
61. Singh A., Ward O.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. № 1. P. 1–5.
62. Yu L.J., Qin W.M., Lan W.Z., Zhou P.P., Zhu M. // Bioresour. Technol. 2003. V. 88. № 3. P. 265–268.
63. Zhu M., Yu L.J., Liu Z., Xu H.B. // Lett. Appl. Microbiol. 2004. V. 39. № 4. P. 332–335.
64. Jang H.D., Lin Y.Y., Yang S.S. // Biores. Technol. 2005. V. 96. № 15. P. 1633–1644.
65. Higashiyama K., Fujikawa S., Park E.Y., Shimizu S. // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2002. V. 7. P. 252–262.
66. Ho S.Y., Jiang Y., Chen F. // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 10. P. 3960–3966.
67. Streekstra H. // J. Biotechnol. 1997. V. 56. № 3. P. 153–165.
68. Hempenius R.A., Van Delft J.M., Prinsen M., Lina B.A. // Food Chem. Technol. 1997. V. 35. P. 573–581.
69. Kendrick A., Ratledge C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992. V. 37. P. 18–22.
70. Radwan S.S., Zriek M.M., Mulder J.L. // Mycol. Res. 1996. V. 100. P. 113–116.
71. Соловьева Н.Л., Конова И.В., Галанина Л.А., Бабанова Н.Л. // Микробиология. 1997. Т. 66. № 4. С. 475–480.
72. Shirashi A., Kawashima H. // Patent JP (Japan). 2007. № WO2007091731.
73. Ho S.Y., Chen F. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 17. P. 7903–7909.
74. Myher J.J., Kuksis A., Geher K., Park P.W., Diersen-Schade D.A. // Lipids. 1996. V. 31. № 2. P. 207–215.
75. Lounds C., Eagles J., Carter A.T., MacKenzie D.A., Archer D.B. // Arch. Microbiol. 2007. V. 188. № 4. P. 299–305.
76. Vane J.R. // Nature (New Biology). 1971. V. 231. № 5300. P. 232–235.
77. Botha A., Kock J.L.F., Coetzee D.J., Van Dyk M.S., Van Der Berg L., Botes P.J. // Syst. Appl. Microbiol. 1992. V. 15. P. 148–154.
78. Botha A., Paul I., Roux C., Kock J.L., Coetzee D.J., Strauss T., Maree C. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. V. 75. № 3. P. 253–256.
79. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Желифонова В.П., Ботаст Р.Дж. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 1. С. 31–36.
80. Галанина Л.А., Аганова Е.В. // Микробиология. 1994. Т. 63. № 2. С. 205–210.
81. Takeno S., Sakuradani F., Tomi A., Inohara-Ochiai M., Kawashima H., Ashikari T., Shimizu S. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 9. P. 5124–5128.
82. Ochiai M., Kawashima H., Shimizu S. // Patent JP (Japan). 2006. № EP1666584.
83. Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К. // Биологические науки. 1984. № 2. С. 5–16.
84. Дедюхина Э.Г., Ерошин В.К. // Успехи микробиологии. 1984. Т. 19. С. 221–235.
85. Dedyukhina E.G., Eroshin V.K. // Process Biochem. 1991. V. 26. № 1. P. 31–37.
86. Pedersen T.A. // Acta Chem. Scand. 1961. V. 15. P. 651–662.
87. Дедюхина Э.Г., Камзолова С.В., Ерошин В.К. // Микробиология. 1994. Т. 63. № 6. С. 1007–1014.
88. Koike Y., Cai H.J., Higashiyama K., Fujikawa S., Park E.Y. // J. Biosci. Bioeng. 2001. V. 91. № 4. P. 382–389.
89. Stredanska S., Slugen D., Sted'ansky M., Grego J. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 9. P. 511–513.
90. Jin M.J., Huang H., Xiao A.H., Peng C., Ren L.J., Liu X., Zhu H. // Food Ferm. Ind. 2007. V. 33. P. 52–54.
91. Jin M.J., Huang H., Xiao A.H., Zhang K., Liu X., Li S., Peng C. // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. № 6. P. 1087–1091.
92. Jin M.J., Huang H., Xiao A.H., Gao Z., Liu X., Peng C. // Bioprocess Biosyst. Eng. 2009. V. 32. № 1. P. 117–122.
93. Shinmen Y., Yamada H., Shimizu S. // Patent JP (Japan). 1988. № EP0276541.
94. Shimizu S., Akimoto K., Kawashima H., Shinmen Y., Yamada H. // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989. V. 66. № 2. P. 237–241.

95. Shimizu S., Akimoto K., Shinmen Y., Kawashima H., Sugano L.M., Yamada H. // *Lipids*. 1991. V. 26. P. 512–516.
96. Park E.Y., Koike Y., Higashiyama K., Fujikawa S., Okabe M. // *J. Biosci. Bioeng.* 1999. V. 88. № 1. P. 61–67.
97. Hwang B.H., Kim J.W., Park C.Y., Park C.S., Kim Y.S., Ryu Y.W. // *Biotechnol. Lett.* 2005. V. 27. № 10. P. 731–735.
98. Lan W.Z., Qin W.M., Yu L.J. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2002. V. 35. № 4. P. 357–360.
99. Уэбб Э., Диксон М. Ферменты. М.: Мир, 1961. С. 165–234.
100. Failla M.L. *Microorganisms and minerals* / Ed. E.D. Weinberg. N.-Y.: Marcell Dekker, 1977. P. 152–213.
101. Speckhard D.C., Felica Y.H. Wu, Cheng-Wen Wu // *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 5228–5234.
102. Naganuma T., Uzuka Y., Tanaka K., Iizuka H. // *J. Basic Microbiol.* 1987. V. 27. № 1. P. 35–42.
103. Дедюхина Э.Г., Крылова Н.И. // *Микробиология*. 1988. Т. 57. № 4. С. 586–590.
104. Sajbidor J., Kozelouhova D., Certik M. // *Folia Microbiol.* 1992. V. 37. № 4. P. 404–406.
105. Higashiyama K., Yaguchi T., Akimoto K., Fujikawa S., Shimizu S. // *JAOCS*. 1998. V. 75. № 11. P. 1501–1505.
106. Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M., Aggelis G. // *J. Appl. Microbiol.* 2004. V. 97. № 4. P. 867–875.
107. Hansson L., Dostalek M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988. V. 28. P. 240–246.
108. Erwin J.H. *Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms* / Ed. J.A. Erwin. N.-Y.: Acad. Press, 1973. P. 41–143.
109. Linberg A., Molin G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993. V. 39. P. 450–455.
110. Sakuradani E., Abe T., Iguchi K., Shimizu S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 66. № 6. P. 648–654.
111. Leman J., Brakoniecka-Sikorska A. // *Polish J. Food Nutr. Sci.* 1996. V. 46. P. 111–120.
112. Higashiyama K., Murakami K., Tsujimura H., Matsuoto N., Fujikawa S. // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. V. 63. P. 442–448.

Biosynthesis of Arachidonic Acid by Micromycetes (Review)

E. G. Dedyukhina^a, T. I. Chistyakova^a, and M. B. Vainshtein^{a, b}

^a Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

^b Pushchino State University, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

e-mail: dedeg@rambler.ru

Received April 12, 2010

Abstract—Arachidonic acid (ARA, 5,8,11,14-*cis*-eicosatetraenoic acid) is widely used in medicine, pharmaceuticals, cosmetics, dietary nutrition, agriculture, and other fields. Microbiological production of ARA is of increased interest since the natural sources (pig liver, adrenal glands, and egg-yolk) cannot satisfy its growing requirements. Mechanisms for ARA biosynthesis as well as the regulation of enzymes involved in this process are considered. Review summarizes literature data concerning individual stages of microbiological ARA production, methods for screening of active strains—producers, physiological regulation of ARA synthesis in micromycetes (the effect of growth phase, medium composition, pH, temperature, and aeration), and effective technologies of fermentation and the product recovery. Information on the whole biotechnological process from strain selection to the ARA yield improvement and purification of the end product is presented.

УДК 543.5:547.96:577.112

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ПРОСТРАНСТВА МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2011 г. А. П. Ильина*, О. Г. Куликова*, Д. И. Мальцев*, М. С. Краснов**, Е. Ю. Рыбакова**, В. С. Скрипникова**, Е. С. Кузнецова***, А. К. Буряк***, В. П. Ямскова**, И. А. Ямсков*

* *Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991*
e-mail: Yamskov@mail.ru

** *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334*
e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru

*** *Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119991*
e-mail: AKBuryak@ipcjrssi.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Методом матричной лазерной десорбционной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) проведен анализ пептидов, входящих в состав ранее не изученных биорегуляторов, выделенных из межклеточного пространства тканей различных органов млекопитающих, а также растений и грибов. В исследовании были включены 15 различных тканей млекопитающих, 13 видов растений и 2 вида грибов. На примере исследования биорегуляторов, выделенных из разных тканей глаза, было показано, что в их состав входят пептидные компоненты с одинаковыми значениями молекулярных масс. В состав биорегуляторов, выделенных из тканей различных органов млекопитающих или разных видов растений и грибов входят пептиды с различными значениями молекулярных масс. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения об основной функции биорегуляторов данной группы – участии в регуляции органно-тканевого гомеостаза в биологических системах.

В различных тканях млекопитающих и растений была обнаружена новая, ранее не изученная группа биорегуляторов, которые в сверхмалых дозах (10^{-8} – 10^{-15} мг белка/мл) оказывают влияние на миграцию и адгезию клеток, клеточную пролиферацию и дифференцировку. Показано, что свойство биорегуляторов данной группы стимулировать восстановление и репарацию в патологически измененных тканях связано с их способностью дополнительно активировать клеточные источники регенерации [1–10]. На основании своеобразия их свойств и активности данные биорегуляторы выделены в отдельную группу мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ).

Установлено, что МГТБ в сверхмалых дозах стимулируют восстановительные процессы в патологически измененных тканях, а их биологическая активность характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности. На основе МГТБ разработаны и применяются в медицине фармакологические препараты, например, Адгелон для лечения кератопатий различной этиологии, заболеваний суставов и переломов. Большие перспективы использования МГТБ обуславливают большой интерес к их поиску и выделению из различных биологических объектов (млекопитающие, растения, микроорганизмы и т.д.).

К настоящему времени установлено, что МГТБ имеют сложный состав: методом ЯМР было показа-

но присутствие в них не только белковой, но также углеводной и липидной компонент, однако остается не известной их функциональная значимость в составе МГТБ [6, 11–13]. Наиболее изучена белковая компонента МГТБ – пептиды (мол. масса 1–8 кДа), ответственные за их активность, а также белки-модуляторы, оказывающие влияние на биологическое действие пептидов и взаимодействующие с ними по Ca^{+2} -связывающему механизму [13, 14]. Кроме того, установлено, что МГТБ имеют внеклеточную локализацию, например, МГТБ, выделенный из печени крысы, локализован в ней в области синусоида, МГТБ, выделенный из сыворотки крови крупного рогатого скота, – в межгепатоцитарном пространстве; из сетчатки глаза быка – на поверхности отростков фоторецепторов, а МГТБ, выделенный из листьев подорожника большого, – в межклеточном пространстве ткани листа [8, 15–17]. Для выделения и очистки биорегуляторов данной группы был разработан оригинальный метод, включающий биохимические методики, метод биотестирования и методы физико-химического исследования белков [1, 18]. Применение этого методического подхода позволило получить небольшие количества очищенных пептидов, входящих в состав МГТБ, что определило применение методов масс-спектрометрии для их исследования. Высокая чувствительность MALDI-TOF масс-спектрометрии (10^{-4} – 10^{-8} М) позволяет обнаруживать минорные компоненты сложных

белковых смесей и устанавливать молекулярные массы этих белков на всех этапах исследования.

Следует отметить, что основным этапом очистки МГТБ является отделение их от примесных белков при высаливании тканевого экстракта в насыщенном растворе сернокислого аммония. В этих условиях МГТБ остаются в растворенном состоянии, а остальные белки переходят в осадок. Поэтому фракции надосадочной жидкости (супернатанты), полученные после высаливания тканевых экстрактов, содержат, в основном, МГТБ, представленные комплексом, образованным биологически активными пептидами и модулятором, состоящим из белков с молекулярной массой от 15 до 66 кДа [14]. В связи с этим исследование состава пептидов на данной стадии представляется весьма актуальным, поскольку это дает возможность выявить наиболее полно пептидные компоненты, входящие в состав МГТБ.

В настоящем исследовании были идентифицированы пептиды, входящие в состав МГТБ, выделенных из различных источников: тканей млекопитающих, растений, а также грибов. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа были проанализированы супернатанты 15 тканевых экстрактов животного происхождения, 18 — растительного и 2 видов грибов.

Цель работы — определение молекулярной массы пептидных компонентов, входящих в состав фракций супернатантов, содержащих МГТБ.

МЕТОДИКА

Биологический материал. Ткани глаза (склера, роговица, хрусталик, радужка, стекловидное тело, сетчатка, пигментный эпителий, цилиарное тело) получали из свежезнуклеированных глаз молодых бычков *Bos taurus Taurus* L. возрастом до 1 года (всего 60 глаз), которые так же, как и печень (1.5 кг) бычков были предоставлены Таганским мясоперерабатывающим комбинатом г. Москвы. Печень, мозг, сердце и кость выделяли из крыс Вистар, обоего пола, массой 180–250 г, содержащихся в виварии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Использовали препарат “Сыворотка крови крупного рогатого скота, стерильная, инактивированная, питательная добавка при культивировании клеток и тканей”, произведенный в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, и эмбриональную телячью сыворотку фирмы “Seriva” (Германия).

Растительное сырье (лук *Allium cepa* L., чеснок *Allium sativum* L., алоэ *Aloe arborescens* L., чистотел *Chelidonium* L., свекла *Beta vulgaris* L., арбуз *Citrullus lanatus* Thunb., дыня *Cucumis melo* L., тыква *Cucurbita pepo* L., хрен *Armoracia rusticana* Gilib., лимон *Citrus limon* L., подорожник *Plantago major* L., полынь *Artemisia absinthium* L. и одуванчик *Taraxacum officinale*

Wigg.) было получено из Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН, грибы (лисичка *Cantharellus cibarius* Fr. и трутовик *Fomes fomentarius* L.) были собраны в экологически чистом регионе Владимирской области.

Выделение биорегуляторов. Ткани млекопитающих, в том числе глаза быка, отделяли друг от друга микрохирургическим способом, и так же, как и ткани растений и грибов, разрезали на фрагменты размером 1–1.5 см и экстрагировали 2 ч при 4°C в водно-солевом растворе (0.15 М NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM Hepes). После центрифугирования тканевого экстракта (3000 г, 30 мин) надосадочную жидкость собирали и высаливали сухим сернокислым аммонием до получения насыщенного раствора соли (780 г/л) в присутствии 10⁻² М ЭДТА, и оставляли на 80–90 ч при 4°C. Полученный солевой раствор смеси белков центрифугировали (10500 г, 45 мин). После этого супернатант отделяли от осадка и длительно диализовали против воды до полного удаления соли. Полученные бессолевы супернатанты экстрактов концентрировали, используя вакуумный роторный испаритель при 40°C, определяли в них количественное содержание белка по методу Варбурга и Кристиана [19], мембранотропную активность адгезиометрическим методом [2] и исследовали MALDI-TOF масс-спектрометрическим методом.

Масс-спектрометрический анализ. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI-TOF масс-спектрометра UltraFlex 2 (“Bruker Daltonics”, Германия), оснащенного азотным лазером 337 нм при частоте импульсов до 20 Гц. Все измерения проводили в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Для накопления масс-спектров мощность лазерного излучения устанавливали на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции–ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона *m/z* от 1000 до 20000. Внешнюю калибровку проводили с использованием точных значений масс известных белков. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 серий спектров по 50 импульсов лазера для каждой. Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы “Bruker Daltonics” (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11). Точность измерения масс составляла ±2 Да. В качестве матрицы применяли α-циано-4-гидроксикоричную кислоту “Sigma-Aldrich” (Германия) в виде насыщенного раствора в смеси 50%-ного ацетонитрила и 2.5%-ной трифторуксусной кислоты. Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальные для масс-спектрометрии.

Таблица 1. Сигналы масс-спектров пептидов, идентифицированных в супернатантах тканевых экстрактов крысы и быка

Источник	M, m/z	Концентрация белка, мг/мл
Склера глаза <i>Bos taurus Taurus L.</i>	4171, 4302, 4531, 4819	0.039
Роговица глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	1442, 3376, 3973, 4302, 4418, 4531, 4817, 8604	0.0105
Хрусталик глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4302, 4529, 4817, 8604	0.0041
Радужка глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	3944, 4301	0.083
Цилиарное тело глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4301	0.068
Стекловидное тело глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4300, 4370, 4420	0.081
Сетчатка глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4302, 4528, 4819, 8603	0.068
Пигментный эпителий глаза <i>Bos taurus taurus L.</i>	4303, 4532, 4819	0.0017
Сыворотка крови КРС	1666, 1812, 1915, 2016	0.072
Эмбриональная сыворотка крови КРС	4301, 8601	0.100
Печень быка <i>Bos taurus taurus L.</i>	2112, 2170, 2866, 2940, 3009, 3151, 5026, 5237	1.370
Печень крысы Вистар	3649, 5025	1.000
Мозг крысы Вистар	2820, 3481, 4300, 4331, 4403, 4671, 4801, 9945	1.690
Сердце крысы Вистар	3049, 3262, 7565, 7684, 8463, 8581, 8766, 8967, 9094, 9951, 10404	1.520
Кость крысы Вистар	4301	0.050

Интерпретация масс-спектров. При интерпретации масс-спектров исходили из предположения, что большая часть регистрируемых сигналов соответствует белковым молекулам, а определяемые массы – массам целых (нефрагментированных) белков. Идентификацию белков проводили путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в соответствующих базах данных (SwissProt/TrEMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://www.uniprot.org>). При вводе параметра “молекулярная масса” использовали экспериментальное значение массы, измеряемое с точностью ± 2 Да. В случае неудачи проводили повторный поиск со значением массы, соответствующим утрате N-концевого метионина, учитывая возможность посттрансляционной модификации белков.

Статистическая обработка. Для формирования промежуточных таблиц, осуществления элементарных расчетов, описательной статистики, построения диаграмм использовали программные ресурсы пакета Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании были изучены 15 фракций МГТБ, полученных из различных тканей мле-

копитающих, а также 18 фракций биорегуляторов данной группы 13 видов растений и биорегуляторы, полученные из 2 видов грибов (табл. 1, 2). Как было установлено ранее, при высаливании в насыщенном растворе серноокислого аммония происходило осаждение всех примесных белков [4, 6]. Осажденные белки не проявляли мембранотропную активность, поэтому эту фракцию далее не исследовали. В супернатанте содержались биорегуляторы, оказывающие мембранотропное действие в сверхмалых дозах. В связи с этим представлялось актуальным провести сравнительное исследование пептидного состава биорегуляторов, выделенных из различных объектов на данной стадии очистки, в том числе, для идентификации минорных компонентов, входящих в состав биорегуляторов [6, 13]. Концентрация суммарного белка в исследуемых фракциях супернатантов варьировала от 2 мкг/мл до 1.7 мг/мл для белков животного происхождения (табл. 1) и от 60 мкг/мл до 3 мг/мл для белков растительного и фунгального происхождения (табл. 2). В работе был использован стандартный протокол масс-спектрометрии с применением матриц и параметров снятия масс-спектров, позволяющих регистрировать преимущественно белковые молекулы. Были проанализированы три наиболее распространенных матрицы для ионизации образца MALDI-TOF масс-спектромет-

Таблица 2. Сигналы масс-спектров пептидов, идентифицированных в супернатантах тканевых экстрактов растений и грибов

Источник	M, m/z	Концентрация белка, мг/мл
Лук <i>Allium cepa</i> L.	4037	2.690
Чеснок <i>Allium sativum</i> L.	2997, 3308, 3646, 3833, 6838, 7675, 8256, 8350, 8478	0.798
Алоэ <i>Aloe arborescens</i> L.	1142, 1807, 1974, 2908, 3032, 3256, 3331, 3412, 4213, 4349	0.160
Чистотел <i>Chelidonium</i> L.	4844, 9688	0.364
Свекла <i>Beta vulgaris</i> L.	1616, 2154, 2611	0.057
Арбуз (кожура) <i>Citrullus lanatus</i> Thuhb.	3486	0.396
Арбуз (мякоть) <i>Citrullus lanatus</i> Thuhb.	3725, 4146, 7450	0.684
Дыня (кожура) <i>Cucumis melo</i> L.	4444, 4590, 8887, 9179	0.154
Дыня (мякоть) <i>Cucumis melo</i> L.	3894, 3978, 4148, 4673, 4714, 7958, 9348, 9436	0.422
Тыква (семена) <i>Cucurbita pepo</i> L.	2560, 2721, 3009, 3135, 3206, 3365, 3704, 4299, 4819, 6156, 6420, 8600	0.125
Тыква (мякоть) <i>Cucurbita pepo</i> L.	1233, 1284, 2940, 4556	0.705
Хрен <i>Armoracia rusticana</i> Gilib.	3725	0.466
Лимон (семена) <i>Citrus limon</i> L.	3365, 3438, 3480, 3570, 3610, 3756, 3803, 3862	0.116
Лимон (мякоть) <i>Citrus limon</i> L.	1837, 1891, 3465, 3805, 6931	0.400
Лимон (кожура) <i>Citrus limon</i> L.	2814, 3196, 4071, 4359, 8152	0.208
Подорожник <i>Plantago major</i> L.	2374, 2963	0.064
Полынь <i>Artemisia absinthium</i> L.	4815	0.165
Одуванчик <i>Taraxacum officinale</i> Wigg.	2871, 3124, 5750, 6256, 7227, 7253, 7542, 8371, 8430, 8794, 9371, 10345	1.400
Лисичка <i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	3650	3.000
Трутовик <i>Fomes fomentarius</i> L.	4421	1.000

рии. В результате оценки воспроизводимости масс-спектров, разрешения сигналов, соотношения сигнала к шуму, числа сигналов, их интенсивность и диапазона значений масса/заряд, регистрируемых в ходе анализа, нами была выбрана для исследований α -циано-4-гидроксикоричная кислота. Снятие масс-спектров осуществляли в диапазоне 1000–20000 m/z , в основном, сигналы регуляторных пептидов фиксировали от 2000 до 10000 m/z , что соответствовало данным, полученным при исследовании МГТБ другими методами [11, 13, 14]. Большинство информационных сигналов располагалось в области от 2000 до 5000 m/z (табл. 1, 2).

Анализ значений сигналов масс-спектров пептидов, содержащихся в супернатантах экстрактов различных тканей крысы и быка, показал, что в нескольких тканях органов, таких, как мозг и кость (большая берцовая) крысы, эмбриональная сыворотка крови крупного рогатого скота (КРС), сетчатка, хрусталик, стекловидное тело, радужка, цилиарное тело, пигментный эпителий, склера и роговица глаза быка, присутствовал пептид с молекулярной

массой 4301 ± 2 Да (табл. 1). Данный пептид не был обнаружен в биорегуляторах, выделенных из сыворотки крови и печени взрослых особей КРС и печени и сердца крысы (табл. 1). Следует отметить, что в биорегуляторах, выделенных из тканей глаза быка, были идентифицированы еще сигналы со значениями m/z , равными 4530 и 4818 (табл. 1). Возможно, что в состав МГТБ тканей одного органа – глаза, входят одинаковые по молекулярной массе пептиды. Будут ли данные пептиды идентичны друг другу, подтвердят результаты анализа их первичной аминокислотной последовательности. Важно отметить, что данные по исследованию специфической активности МГТБ, выделенных из тканей глаза, показывают, что она характеризуется наличием тканеспецифического, но не видоспецифического действия [9, 20]. Можно предположить, что тканеспецифичный характер активности МГТБ могут определять другие пептиды, свойственные только данному типу ткани. Например, полученные нами данные показали, что ряд таких пептидов присутствовал в супер-

натантах экстрактов тканей роговицы, склеры, стекловидного тела (табл. 1).

В препаратах растительного происхождения не было обнаружено пептидов со сходными значениями молекулярных масс. Было показано, что не только в супернатантах, выделенных из растений одного и того же семейства, таких, как лук и чеснок (семейство Луковые), арбуз, дыня и тыква (семейство Тыквенные), полынь и одуванчик (семейство Астровые) содержались пептиды с молекулярными массами, отличными друг от друга. Только в случае биорегуляторов, выделенных из мякоти арбуза и дыни, были зафиксированы схожие сигналы m/z – 4146 и 4148 соответственно (табл. 2). Но даже пептиды, выделенные из разных тканей одного вида растения (кожура, мякоть и семена арбуза, дыни, тыквы и лимона), отличались по молекулярным массам (кроме сигналов 3803 и 3805 m/z , идентифицированных в супернатантах семян и мякоти лимона соответственно) (табл. 2). Аналогичное расхождение в значениях сигналов m/z наблюдали и при исследовании супернатантов, выделенных из экстрактов тканей грибов (табл. 2). Очевидно, такое различие в молекулярных массах пептидов обусловлено различием МГТБ, выделенных из растений и грибов.

Таким образом, полученные данные предполагают, что в состав биорегуляторов, выделенных из тканей одного органа (глаза быка) входят пептиды с одинаковыми значениями молекулярных масс, которые определяют участие данных МГТБ в регуляции органно-тканевого гомеостаза. Другие пептиды биорегуляторов тканей глаза с отличающимися значениями молекулярных масс, возможно, определяют тканеспецифический характер МГТБ [4, 21–23]. Важно отметить, что тканевые экстракты, содержащие МГТБ, проявляли тканеспецифический характер биологического действия [1, 4]. После высаливания все фракции супернатантов, выделенных из различных объектов, оказывали мембранотропное действие на модели органной культуры печени мыши. Эти данные указывают на то, что имеющие сложный состав МГТБ, структура которых характеризуется определенной пространственной архитектурой, имеют общую для всех биорегуляторов данной группы компоненту. Возможно, что пептид с молекулярной массой 4301 ± 2 Да, обнаруженный не только в биорегуляторах тканей глаза быка, но и в биорегуляторах, выделенных из тканей мозга и кости крысы и эмбриональной сыворотки КРС, входил в ее состав. Данное предположение является предметом наших дальнейших исследований.

Проведя идентификацию полученных масс-спектрометрических сигналов путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в электронных базах данных (SwissProt/TrEMBL), нами не было найдено соответствий. Данный факт подтверждает уникаль-

ность группы МГТБ, контролирующей органно-тканевой гомеостаз в сверхмалых дозах, и является предпосылкой для дальнейшего исследования и установления первичной структуры белков и пептидов этой группы биорегуляторов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-00706-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Левенталь В.И., Ланковская Т.П., Бочарова О.К., Маленков А.Г. // Биофизика. 1977. Т. 22. № 1. С. 168–174.
2. Маленков А.Г., Модянова Е.А., Ямскова В.П. // Цитология. 1978. Т. 20. № 8. С. 957–962.
3. Буверова Э.И., Брагина Е.В., Резникова М.М., Ямскова В.П., Хрущов Н.Г. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. № 1. С. 158–160.
4. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общ. биологии. 1991. Т. 52. № 2. С. 181–191.
5. Гундорова Р.А., Хорошилова-Маслова И.П., Ченцова Е.В., Илатовская Л.В., Ямскова В.П., Романова И.Ю. // Вопросы офтальмологии. 1997. Т. 113. № 2. С. 12–15.
6. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н., Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусынина М.М., Рыбакова Е.Ю. // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 5. С. 34–39.
7. Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 2. С. 74–79.
8. Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. № 1. С. 22–36.
9. Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П., Богуславский Д.В., Ямсков И.А. // Радиационная биология и радиоэкология. 2003. Т. 43. № 3. С. 265–268.
10. Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямскова В.П., Григорян Э.Н., Ямсков И.А. // Офтальмология. 2005. Т. 2. № 3. С. 81–87.
11. Ямсков И.А., Виноградов А.А., Даниленко А.Н., Маслова Л.А., Рыбакова Е.Ю., Ямскова В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 1. С. 36–42.
12. Скрипникова В.С., Краснов М.С., Березин Б.Б., Бабушкина Т.А., Борисенко А.В., Измайлов Б.А., Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Докл. РАН. 2007. Т. 417. № 5. С. 697–699.
13. Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С., Борисенко А.В., Маргасюк Д.В., Вечеркин В.В., Скрипникова В.С., Назарова П.А., Битко С.А., Березин Б.Б., Яминский И.В., Мешков Г.Б., Грачев С.А., Серебрякова М.В., Рыбакова Е.Ю., Ямскова В.П. // Известия РАН. Серия хим. 2009. № 3. С. 623–628.
14. Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А., Ильина А.П., Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Борисенко А.В., Березин Б.Б., Кузнецова Е.С., Бурак А.К., Ямсков И.А. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. С. 1195–1203.
15. Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Ямсков И.А., Ямскова В.П. // Радиационная биология и радиоэкология. 2003. Т. 43. № 3. С. 269–272.

16. *Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E. Yu., Vecherkin V.V., Borisenko A.V., Yamskov I.A.* // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 71–78.
17. *Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A.* // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 35–45.
18. *Ямскова В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г.* // Молекулярная биология. 1977. Т. 11. № 5. С. 1147–1154.
19. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
20. *Борисенко А.В., Ямскова В.П., Благодатских И.В., Березин Б.Б., Краюхина М.А., Ямсков И.А.* // Биол. мембраны. 2007. Т. 24. № 3. С. 244–250.
21. *Margusyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A.* // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 47–59.
22. *Krasnov M.S., Gurmizov V.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A.* // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 21–33.
23. *Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А.* Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения. М.: МАКС Пресс, 2009. 84 с.

MALDI-TOF Mass Spectrometric Identification of Novel Intercellular Space Peptides

A. P. Il'ina^a, O. G. Kulikova^a, D. I. Maltsev^a, M. S. Krasnov^b, E. Yu. Rybakova^b, V. S. Skripnikova^b,
E. S. Kuznetsova^c, A. K. Buryak^c, V. P. Yamskova^b, and I. A. Yamskov^a

^a *Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
e-mail: Yamskov@mail.ru

^b *Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*
e-mail: Yamskova-vp@yandex.ru

^c *Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
e-mail: AKBuryak@ipcjrssi.ru

Received May 12, 2010

Abstract—We performed the matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) analysis of the peptides entering into the composition of not yet explored bioregulators derived from the extracellular matrix of the tissues of the various organs of the mammals, and also plants and fungi. The study included 15 different mammalian tissues, 13 species of plants, and 2 species of fungi. Exploring the bioregulators derived from eye tissues, we demonstrated that their composition includes peptide components with the same values of the molecular weight. The composition of the bioregulators derived from the tissues of various organs of mammals or different species of plants and fungi includes the peptides with different values of molecular weight. Obtained data indicate the growing evidence of the assumptions about the major function of the bioregulators of this group—their involvement in the regulation of tissue-organ homeostasis in the biological systems.

УДК 576.8

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ И ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ *Escherichia coli* БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА SURF-6, ТРАНСЛЯЦИОННО СЛИТОГО С ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗОЙ

© 2011 г. М. Ю. Кордюкова, О. В. Зацепина, М. А. Ползиков

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997

e-mail: zatsepina_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 20.07.2010.

Аmplифицировали и клонировали в вектор pGEX-2T кДНК гена *Surf-6* человека (*hSurf-6*) для экспрессии hSURF-6, трансляционно слитого с глутатион-S-трансферазой, в бактериальной системе. Полученный вектор назван pGEX-2T-GST-hSurf-6. На основе штамма *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL получен суперпродукцент химерного белка GST-hSURF-6, выделение и очистку которого производили методом аффинной хроматографии на L-глутатион-сефарозе. В оптимизированных условиях доля рекомбинантного GST-hSURF-6 составляла не менее 15% от суммарного бактериального белка, а из 1 л культуры штамма-продукента выделялось до 7 мг белка. Конечная фракция элюата содержала около 80% GST-hSURF-6. Количество и чистота выделенного белка достаточны для иммунизации животных и получения антител. Белок GST-hSURF-6 может быть также использован в качестве аффинного лиганда для выявления белковых партнеров hSURF-6 в клетках человека.

Согласно последним данным протеомного анализа, ядрышки клеток человека содержат около 4000 белков, значительная часть которых необходима для осуществления основной функции ядрышка — синтеза рибосом [1–7]. Однако около трети белков, выявляемых в составе выделенных ядрышек, изучены недостаточно, а их роль в клеточном метаболизме до сих пор остается невыясненной. К таким белкам относится, в частности, белок SURF-6.

SURF-6 впервые описан в 1996 г. как продукт экспрессии гена *Surf-6*, являющегося шестым членом локуса *Surfeit* в геноме мыши *Mus musculus* [8]. Позднее его ортологи обнаружены у представителей других таксономических групп от дрожжей до человека [9, 10]. На сегодняшний день наиболее хорошо изучен SURF-6 мыши. Доказано, что он является жизненно необходимым белком, пост-транскрипционный нокдаун которого приводит к гибели соматических и эмбриональных клеток [11, 12]. Специфическая локализация в ядрышках и связь с ядрышковой РНК предполагают участие SURF-6 мыши в биогенезе рибосом [13], а увеличение содержания SURF-6 в фибробластах и лимфоцитах мыши, активированных к пролиферации [14], указывает на участие SURF-6 в процессах клеточной пролиферации. В совокупности, описанные свойства свидетельствуют в пользу многофункциональности SURF-6 мыши и, возможно, его гомолога, белка hSURF-6, у человека. Ген *Surf-6* человека и продукт его экспрессии — hSURF-6 (361 аминокислотных остатков) описаны в 2000 г. [9], однако, функции SURF-6 человека на сегодняшний день практически не изучались.

Цель данной работы — клонирование, экспрессия в бактериальной системе (*Escherichia coli*) и выделение рекомбинантного белка GST-hSURF-6 для получения специфических антител к SURF-6 человека.

МЕТОДИКА

Клеточные культуры. Клетки человека линии HeLa приобретены в Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (“Ну-Clone”, США), 2 mM L-глутамин, антибиотики пенициллин и стрептомицин (по 250 ед./л каждого), при 37°C и в атмосфере 5% CO₂.

Клонирование полноразмерной кДНК гена *Surf-6* человека. Для клонирования кДНК гена *Surf-6* человека был выбран вектор pGEX-2T, позволяющий экспрессировать целевой ген под контролем индуцибельного *tac*-промотора. Последовательность кДНК *Surf-6* человека получена из [9]. Суммарную РНК выделяли из клеток HeLa (10⁶) с помощью набора RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США), следуя рекомендациям производителя. Выделенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК *hSurf-6* методом обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей M-MLV (“Promega”, США) и oligo(dT)₁₈ праймеров. кДНК *hSurf-6* амплифицировали с помощью ПЦР, используя специфические праймеры к гену *hSurf-6*: 5'-cgggaattctgatggcctctctactcgcgaaggac (сайт рестрикции EcoRI подчеркнут)

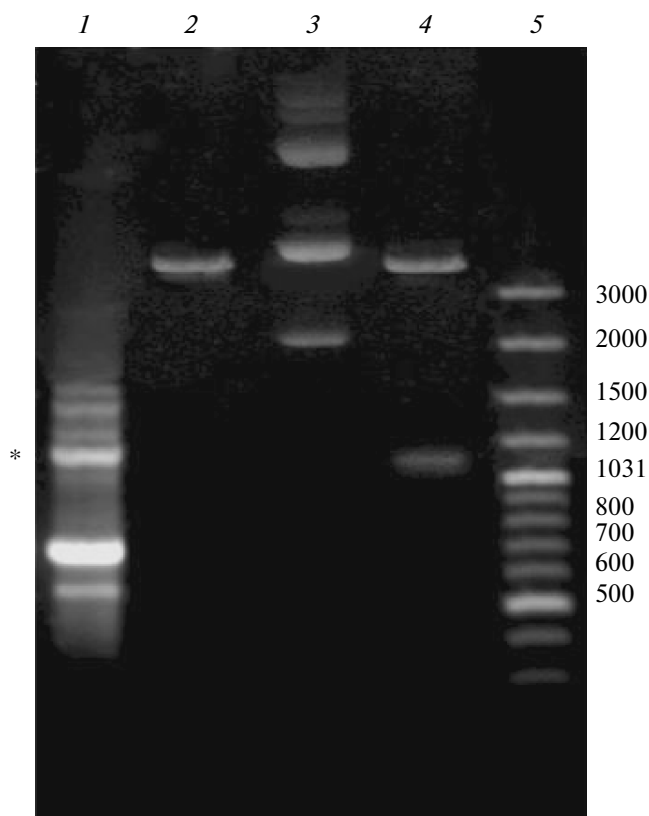


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов ПЦР с кДНК SURF-6 человека (1), вектора pGEX-2T, обработанного эндонуклеазами EcoRI и BamHI (2), вектора pGEX-2T-GST-hSurf-6 (3) и продуктов его рестрикции эндонуклеазами EcoRI и BamHI (4); 5 – маркеры (цифрами указаны п.н.). Звездочкой обозначен фрагмент, подвижность которого соответствует подвижности кДНК *Surf-6* человека (1086 п.н.).

и 3'-gcgggaccctcagaccaggcctgcgcgctccag (сайт рестрикции BamHI подчеркнут). Амплификацию производили на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия) в следующем режиме: денатурация при 94°C 3 мин, затем 40 циклов по 45 с при 94°C, 45 с при 65°C и 1 мин при 72°C, общая элонгация продолжалась 3 мин при 72°C. Продукты ПЦР разделяли методом гель-электрофореза в стандартных условиях. ДНК, соответствующую расчетной подвижности кДНК *hSurf-6* (1086 п.н.), вырезали из геля и очищали с помощью набора для очистки ДНК Whizard SV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США). Амплификат и вектор pGEX-2T (“GE Healthcare”, Великобритания) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и EcoRI (“Promega”, США), очищали с помощью набора Whizard SV Gel and PCR Clean-Up System (“Promega”, США) и лигировали ДНК-лигазой T4 в молярном соотношении 1 : 1 (“Promega”, США). Продукт лигирования трансформировали в клетки *Escherichia coli* штамма XL-1 Blue (“Stratagene”, США) по стандартной методике [15]. Клетки высевали на LB-агар с ампицил-

лином (100 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 16 ч. Из нескольких выросших колоний выделяли плазмидную ДНК с помощью набора Whizard Plus SV Minipreps DNA purification System (“Promega”, США). Наличие вставки в клонах, соответствующей по размеру кДНК *hSurf-6*, определяли гидролизом эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BamHI. Плазмиды, предположительно содержащие вставку *hSurf-6*, затем подвергали секвенированию с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 и автоматического секвенатора ДНК ABI PRISM 3730 (“Applied Biosystems”, США).

Экспрессия и выделение рекомбинантного белка GST-hSURF-6. Клетки *E. coli* штамма BL21-Codon-Plus(DE3)-RIL (“Stratagene”, США) трансформировали плазмидой pGEX-2T-GST-hSurf-6 и высевали на чашки Петри по стандартной методике. Отдельную колонию с чашки пересевали в 10 мл среды LB [15], содержащей 100 мкг/мл ампициллина, с последующей инкубацией в течение ночи с горизонтальным перемешиванием (250 об/мин) при 37°C. Ночную культуру переносили в 0.5 л среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) и выращивали до достижения оптической плотности 0.6 при 590 нм. Экспрессию GST-hSURF-6 индуцировали добавлением 0.1 мМ изопропилтиогалактозида (ИПТГ, “Sigma”, США) 3 ч при 37°C и горизонтальном перемешивании (250 об/мин). Клетки осаждали центрифугированием (1000 g, 20 мин), осадок ресуспендировали в 20 мл ледяного буфера А, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА-Na, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ), 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), коктейль протеазных ингибиторов (“Sigma”, США). Для уменьшения протеолитической деградации белка все этапы выделения проводили при 4°C. Все растворы для выделения содержали протеазные ингибиторы (1 мМ ФМСФ, 1 мМ ЭДТА-Na), а раствор для лизиса бактерий – коктейль протеазных ингибиторов (“Sigma”, США). Клетки разрушали на льду с помощью ультразвукового дезинтегратора (20 импульсов по 1 мин каждый) и добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 1%. Суспензию центрифугировали (12000 g, 10 мин) при 4°C, к полученному супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 0.5 М и 1 мл L-глутатион-сефарозы 4В (“GE Healthcare”, Великобритания), предварительно уравновешенной буфером А, содержащим 0.5 М NaCl и 1% тритона X-100, и инкубировали 30 мин с интенсивным перемешиванием при 4°C. Суспензию переносили в колонку и промывали последовательно 100 мл буфера В, содержащим 20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 1 М NaCl, 1% тритона X-100, 1 мМ ЭДТА-Na, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ ДТТ, 100 мл буфера В без NaCl, 100 мл буфера В без NaCl и без тритона X-100. Все операции производили при 4°C. Белок элюировали 5 мл буфера С, содержащим 20 мМ трис-НСl (рН 8.0), 20 мМ L-глутатион, 1 М NaCl, 1% тритон X-100, 1 мМ ЭДТА-Na, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ

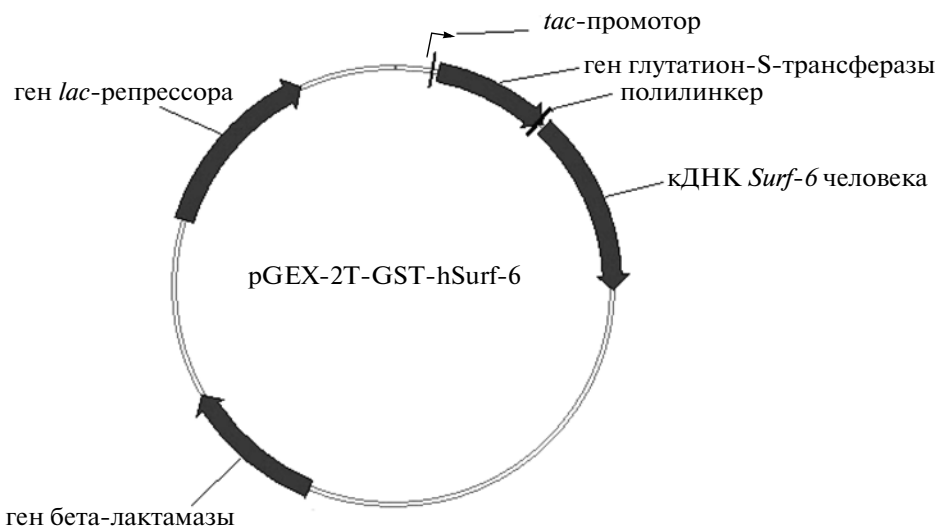


Рис. 2. Схема полученного вектора pGEX-2T-GST-hSurf-6 с указанием основных функциональных элементов.

ДТТ. Собирали фракции по 1 мл и анализировали их электрофорезом в 12%-ном ПААГ, содержащим 0.1% ДДС-Na [16].

Иммуноблоттинг. Фракции, полученные после элюции, разделяли электрофорезом в 12%-ном ПААГ [16]. На каждую дорожку наносили не более 10 мкг суммарного белка. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в камере для полусухого переноса ("Bio-Rad", Великобритания). Перед переносом гель и мембрану инкубировали 30 мин в буфере, содержащем 48 мМ трис (рН 8.3), 39 мМ глицин, 20% метанола, 0.0385% ДДС-Na. Перенос белков из геля на мембрану проводили при постоянном напряжении 25 В в течение 1 ч. Мембрану инкубировали в 5%-ном растворе обезжиренного молока в буфере TBS-T, содержащем 20 мМ трис-HCl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 0.05% твин-20, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с поликлональными антителами к белку SURF-6 мыши [8] в разведении 1 : 500 в течение 1 ч, 40 мин с антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена ("Jackson ImmunoResearch Laboratories", США), в разведении 1 : 15000 в буфере TBS-T. После двукратной отмывки в буфере TBS-T мембрану проявляли с помощью набора ECL+Plus Detection Kit ("GE Healthcare", Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование кДНК *Surf-6* человека и создание вектора pGEX-2T-GST-hSurf-6. Результаты ПЦР кДНК *Surf-6* представлены на рис. 1 (дорожка 1). Кроме целевого продукта, размером около 1086 п.н., на дорожке присутствовали несколько дополнительных продуктов размером от 300 до 2500 п.н. Наличие нескольких продуктов амплификации можно

объяснить тем, что при ПЦР специфические праймеры, помимо кДНК целевого гена могут отжигаться на другие последовательности ДНК, присутствующие в образце. Так, обратный праймер (3' → 5'), комплементарный 3'-концу последовательности кДНК *Surf-6* человека, имеет некоторую гомологию к двум внутренним участкам кДНК *Surf-6*, что может объяснить появление продуктов ПЦР размером 500–700 п.н. (рис. 1, дорожка 1). ДНК, соответствующая расчетному размеру полноразмерной кДНК *Surf-6* человека (1086 п.н.), была очищена и подвергнута гидролизу эндонуклеазами рестрикции EcoRI и BamHI. Аналогичному расщеплению подвергали также вектор pGEX-2T.

Очищенный ПЦР-продукт и гидролизованный вектор pGEX-2T (рис. 1, дорожка 2) были лигированы. Продукт лигазной реакции был трансформирован в штамм бактерий XL-1 Blue для последующего клонирования. Плазмиды, выделенные из полученных клонов, проверены рестриктным анализом на наличие вставки, соответствующей по размеру кДНК *Surf-6* (рис. 1, дорожка 4).

ДНК положительных клонов была подвергнута секвенированию, результаты которого показали, что последовательность клонированной кДНК полностью соответствует кодирующей последовательности гена *Surf-6* человека, известной из литературы [9].

Вектор, содержащий последовательность кДНК *Surf-6* человека, слитую с геном GST, созданный в работе, назван pGEX-2T-GST-hSurf-6 (рис. 1, дорожка 3, рис. 2).

Получение бактериального штамма—суперпродукента гибридного белка GST-hSURF-6. Открытая рамка считывания *Surf-6* человека содержит редкие для *E. coli* кодоны — 10 кодонов АГГ и 1 кодон АГА (оба кодона кодируют остаток аргинина), которые могут быть причиной неполной трансляции белка в

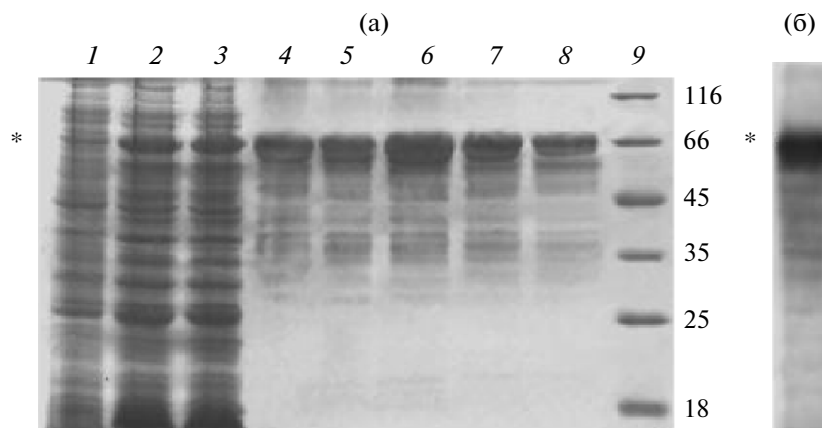


Рис. 3. Анализ экспрессии GST-hSURF-6 в *E. coli* и его очистка с помощью хроматографии; а – электрофореграмма в 12%-ном ПААГ: 1 – суммарный лизат неиндуцированной культуры бактерий; 2 – лизат культуры через 3 ч после индукции ИПТГ; 3 – осветленный лизат индуцированной культуры; 4–8 – пять последовательных фракций, полученных в ходе хроматографической элюции GST-hSURF-6, 9 – маркеры молекулярных весов; б – иммуноблоттинг пятой фракции белка GST-hSURF-6, полученный с использованием антител к SURF-6 [8]. Положение GST-hSURF-6 указано звездочками.

бактериях. Поэтому для экспрессии плазмиды pGEX-2T-GST-hSurf-6 был выбран бактериальный штамм BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Этот штамм содержит плазмиду с заклонированными последовательностями транспортной РНК для аргинина, лейцина, изолейцина, что облегчает экспрессию генов, содержащих такие кодоны. Кроме того, штаммы серии BL-21 характеризуются низким уровнем экспрессии протеаз, а их геномы содержат ген *lacI*, экспрессирующий *lac*-репрессор, снижающий фоновую активность *lac*-промотора.

Индукцию экспрессии белка GST-hSURF-6 вызывали с помощью 0.1 мМ ИПТГ при оптической плотности культуры D_{590} 0.6 и последующей инкубации культуры при 37°C в течение 3 ч. Время индукции синтеза белка более 3–4 ч не приводило к увеличению продукции белка (не иллюстрировано). Экспрессия GST-hSURF-6 не вызвала гибели бактериальной культуры, что указывает на сниженную токсичность химерного белка в штамме BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

На рис. 3а показано, что белок GST-hSURF-6 имеет электрофоретическую подвижность около 66 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка GST-hSURF-6, равной 65 кДа. Анализ отсканированного изображения геля, приведенного на рис. 3, с помощью программы Scion Image, версия 4.0.3.2 (“Scion Corporation”, США), показал, что доля белка GST-hSURF-6 составляла 15–20% от суммарного белка штамма–продукта. Большая часть экспрессируемого белка содержалась в надосадочной жидкости после центрифугирования лизата клеток при 16000 г в течение 10 мин, т.е. его осветления. На основании этого мы сделали вывод, что химерный белок GST-SURF-6 не образовывал тельца

включения в клетках бактерий и являлся растворимым (рис. 3).

Выделение и очистка гибридного белка GST-hSURF-6. Клетки бактерий разрушали ультразвуковой дезинтеграцией на льду. Для повышения растворимости рекомбинантного белка к лизату добавляли 1% неионного детергента тритон X-100 и освобождали от клеточного дебриса (осветляли) центрифугированием при 16000 г 10 мин. GST-hSURF-6 из осветленного лизата очищали с помощью аффинной хроматографии на носителе – L-глутатион-сефарозе, обладающей повышенным сродством к GST. Для оптимизации условий выделения GST-hSURF-6 в процедуру хроматографической очистки на L-глутатион-сефарозе, рекомендуемой производителем (“GE Healthcare”, Великобритания), внес ряд модификаций. Так, подобрано оптимальное время связывания белка с носителем, которое составило 30 мин. При увеличении времени инкубации до 2 ч возникали трудности с элюцией белка, а при уменьшении – белок связывался с носителем лишь частично. Для повышения эффективности элюции концентрация L-глутатиона в буфере для элюции повышена с 5 до 20 мМ. Кроме того, для уменьшения неспецифического связывания GST-hSURF-6 с носителем в элюирующий буфер добавляли NaCl до конечной концентрации 1 М и тритон X-100 до концентрации 1%. Оптимальный объем элюирующего буфера составлял 5 мл.

При перечисленных выше условиях общий выход GST-hSURF-6 составлял 7 мг белка из 1 л бактериальной культуры. Выделенный белок узнавался поликлональными антителами к SURF-6 [8] на иммуноблотах (рис. 3б). Белковые полосы меньшей молекулярной массы, присутствующие на дорожке, скорее всего являются фрагментами белка, возника-

ющими в результате неполной трансляции рекомбинантного белка в бактериях, но не являются продуктами его деградации, возникающими при выделении. Так, понижение температуры инкубации бактерий до 30°C, позволяющее существенно снизить протеолиз экспрессируемых белков в *E. coli*, и добавление ингибиторов протеаз к культивируемым бактериям и используемым при выделении растворам не приводило к исчезновению минорных полос, распознаваемых антителами к SURF-6. Тем не менее, содержание полноразмерного GST-hSURF-6 в образцах после выделения составляло не менее 80%.

В полипептидной цепи SURF-6 человека присутствуют сайты расщепления тромбином. Это не позволило нам произвести отщепление глутатион-S-трансферазы от белка SURF-6 тромбином. Однако условия экспрессии и очистки белка GST-hSURF-6 позволяют выделить его в количествах, достаточных для иммунизации животных с целью получения антител к SURF-6 человека, а также для использования в качестве аффинного лиганда в экспериментах по выявлению белковых партнеров hSURF-6 человека.

Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант 07-04-00401).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carmo-Fonseca M., Mendes-Soares L., Campos I. // Nat. Cell Biol. 2000 V. 2. № 6. P. 107–112.
2. Scherl A., Coutü Y., Düon C., Callü A., Kindbeiter K., Sanchez J.C., Greco A., Hochstrasser D., Diaz J.J. // Mol. Biol. Cell. 2002. V. 13. № 11. P. 4100–4109.
3. Bernardi R., Pandolfi P.P. // Nat. Med. 2003. V. 9. № 1. P. 24–25.
4. Olson M.O. // Sci. Signalling. 2004. V. 2004. № 224. P. 10.
5. Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K., Ong S.E., Lyon C.E., Lamond A.I., Mann M. // Nature. 2005. V. 6. № 433. P. 77–83.
6. Ahmad Y., Boisvert F.M., Gregor P., Cobley A., Lamond A.I. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. P. 181–184.
7. Boisvert F.M., Lam Y.W., Lamont D., Lamond A.I. // Mol. Cell Proteomics. 2010. V. 9. № 3. P. 457–470.
8. Magoulas C., Fried M. // DNA Cell Biol. 1996. V. 15. № 4. P. 305–316.
9. Magoulas C., Fried M. // Gene. 2000. V. 243. P. 115–123.
10. Polzиков M., Zatsepina O., Magoulas C. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2005. V. 327. P. 143–149.
11. Romanova L.G., Anger M., Zatsepina O.V., Schultz R.M. // Biol. Reproduction. 2006. V. 75. P. 690–696.
12. Polzиков M.A., Magoulas C., Zatsepina O.V. // Mol. Biol. Rep. 2007. V. 34. № 3. P. 155–160.
13. Гурченков В.В., Ползиков М.А., Магоулас К., Романова Л.Г., Зацепина О.В. // Биоорг. химия. 2005. Т. 31. № 6. С. 578–585.
14. Моралева А.А., Малышева М.В., Магоулас Х., Ползиков М.А., Зацепина О.В. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2009. Т. 147. № 5. С. 578–582.
15. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
16. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

Cloning, Expression, and Isolation from *Escherichia coli* of Human Protein SURF-6 Translationally Fused to Glutathione S-transferase

M. Yu. Kordyukova, O. V. Zatsepina, and M. A. Polzikov

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

e-mail: zatsepina_olga@mail.ru

Received July 20, 2010

Abstract—cDNA of human gene *Surf-6* (*hSutf-6*) was amplified and cloned into vector pGEX-2T for the expression in the bacterial system of protein hSURF-6 translationally fused to glutathione S-transferase. The resulting vector is named as pGEX-2T-GST-hSurf-6. Superproducer of chimeric protein GST-hSURF-6 was obtained on the basis of *Escherichia coli* strain BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Its purification was performed by the affinity chromatography on L-glutathione-sepharose. The proportion of recombinant protein GST-hSURF-6 in the optimized conditions was not less than 15% of the total bacterial protein, and up to 7 mg of the protein was isolated from 1 liter of culture of the producer strain. The final fraction of eluate contained approximately 80% of GST-hSURF-6. The amount and the purity of the isolated protein were sufficient to immunize animals and obtain antibodies. Protein GST-hSURF-6 can also be used as an affinity ligand for revealing protein partners of hSURF-6 in human cells.

УДК 543.5;547.96;577.112

ИЗУЧЕНИЕ НОВОЙ ГРУППЫ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОДОРОЖНИКА БОЛЬШОГО (*Plantago major* L.)

© 2011 г. М. С. Краснов*, В. П. Ямскова*, Д. В. Маргасюк**, О. Г. Куликова**, А. П. Ильина**, Е. Ю. Рыбакова*, И. А. Ямсков**

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва 119334
e-mail: embrmsk@mail.ru

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991
e-mail: yamskov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

В листьях подорожника большого (*Plantago major* L.) были обнаружены биорегуляторы, проявляющие физико-химические свойства и биологическую активность, сходные с мембранотропными гомеостатическими тканеспецифическими биорегуляторами, ранее найденными в различных тканях животных. Для изучения специфической активности данных растительных биорегуляторов впервые разработана экспериментальная модель роллерного органотипического культивирования ткани кожи тритона (*Pleurodeles waltli*) *in vitro*. Показано, что изучаемые растительные белки оказывают свойственное данному лекарственному растению ранозаживляющее действие на кожу позвоночных животных *in vitro* и *in vivo*.

Проблема поиска и исследования биологически активных веществ, ответственных за лекарственные свойства растений, до сих пор остается весьма актуальной. Несмотря на то, что в лекарственных растениях обнаружены такие группы биологически активных веществ, как витамины, флавоноиды, терпены, фитонциды, гликозиды и др., вопрос о том, какие вещества обуславливают эффективность применения ряда растений для профилактики и лечения определенных патологий, в настоящее время не находит четкого ответа. В этом аспекте нами был изучен подорожник большой (*Plantago major* L.) как растение, проявляющее выраженное ранозаживляющее действие [1]. В настоящем исследовании была предпринята попытка идентификации в этом растении новой группы биорегуляторов, которые могут влиять на репаративные свойства кожи у позвоночных животных.

Ранее в различных тканях животных нами были обнаружены биорегуляторы, которые в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих концентрациям 10^{-8} – 10^{-15} мг/мл, влияют на важнейшие биологические процессы — миграцию, адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток [2–8]. Было установлено, что биорегуляторы локализованы во внеклеточном пространстве, а их активность характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. Биорегуляторы данной группы стимулируют репаративные процессы в патологически измененных тканях, способствуя восстановлению их нарушенной структуры [9]. По сути, их можно отнести к группе регуляторных молекул, которые функционируют как “настройщики” органо-тканевого гомеостаза.

На основании сходства физико-химических свойств и биологического действия биорегуляторы,

выделенные из различных тканей и секретов животных, получили название мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ). МГТБ животного происхождения имеют сложный состав, в них обнаружены углеводы, липиды, белки [10]. Белковая компонента ответственна за проявление биологического действия МГТБ. Показано, что мембранотропное действие проявляли небольшие пептиды (значения их молекулярной массы не превышает 6 кДа), а связанные с ними высокомолекулярные белки модулировали их активность. Комплекс между пептидами и белками-модуляторами образуется по механизму углевод-белкового взаимодействия в присутствии ионов кальция [11]. МГТБ, выделенные из тканей животных, проявляли устойчивость к воздействию денатурирующих факторов, их вторичная структура характеризовалась преобладанием β -структур. Показано, что в водном растворе МГТБ присутствовали в виде частиц размером 50–150 нм [5–8, 12].

Цель работы — идентификация в листьях подорожника большого биорегуляторов данной группы и изучение их специфической активности с использованием экспериментального подхода, разработанного ранее для выделения и очистки МГТБ животного происхождения, включающий в себя получение тканевого экстракта, методику очистки, а также метод биотестирования и экспериментальные модели для изучения их специфической активности.

МЕТОДИКА

Подорожник большой (*Plantago major* L.) был получен из питомника главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. В работе использовали сернокислый аммоний, нитрат аммония, нитрат калия,

гидрат сульфата магния, фосфат калия, гидрат хлорида кальция, азид натрия марки “х.ч.”. Была использована очищенная вода (16 МОм). Органотипическое культивирование проводили в питательной среде 199. Исследование биологической активности растительных биорегуляторов проводили на мышах-гибридах F1 линии C57BL/СВА (самцы весом 18–20 г), а также на взрослых половозрелых тритонах (*Pleurodeles waltl*) обоего пола, содержащихся, соответственно, в стандартных условиях вивария и аквариальной Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. В работе был использован роллер марки “Assistant RM5” (Германия). Центрифугирование проводили на центрифуге Т 32А (“Janetzki”, Германия).

Выделение и очистка биорегулятора. Для экстракции использовали свежие листья подорожника, нарезанные на небольшие фрагменты, размером 1–1.5 см, которые помещали в экстрагирующий раствор (2.06×10^{-2} М NH_4NO_3 , 1.88×10^{-2} М KNO_3 , 3×10^{-3} М $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5×10^{-3} М $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.25×10^{-3} М KH_2PO_4) на 5–6 ч при температуре 8–10°C. Полученный экстракт фильтровали через несколько слоев марли, центрифугировали (3000 г, 30 мин), осадок отбрасывали и далее не использовали. К раствору растительного экстракта добавляли сухой сернистый аммоний при постоянном перемешивании до образования насыщенного раствора соли (780 г/л), поддерживая рН раствора 7.5–8.0 путем добавления раствора гидроксида аммония. Полученную белковую смесь оставляли на 95–100 ч при 4°C. Осадок белков отделяли центрифугированием (25000 г, 30 мин при 4–8°C). Полученную таким образом фракцию супернатанта и осадка диализовали против воды до полного удаления сернистого аммония и затем концентрировали при 37–40°C при помощи роторного вакуумного испарителя.

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ). Использовали градиент плотности сахарозы на колонке LKB-440 (Швеция) при 4°C в течение 96 ч и напряжении 500–2000 В. Детекцию белковых фракций осуществляли спектрофотометрически при 280 нм.

Концентрацию белка в растительном экстракте и его фракциях определяли спектрофотометрическим [13] и колориметрическим методами [14].

На каждой стадии очистки присутствие биорегулятора во фракциях определяли адгезиометрическим методом, разработанным ранее для идентификации МГТБ [2]. Для подсчета количества выделившихся клеточных ядер адгезиометрическим методом использовали камеру Горяева. Фрагменты ткани печени подвергали деформационному стандартному воздействию при помощи стеклянного дезинтегратора.

Метод динамического лазерного светорассеяния. Исследование проводили методом динамического светорассеяния на приборе “PhotoCorr Complex” (Россия), снабженном автоматическим гониомет-

ром, псевдкорреляционной системой счета фотонов PhotoCorr-PC2, характеризующейся отсутствием послеимпульсов, что позволяет измерять размеры наночастиц порядка 1 нм и выше, одноплатным мультитиммерным коррелятором реального времени “PhotoCorr-FC” (Россия), использованном в логарифмической конфигурации (интервал времен задержки $0.01\text{--}5 \times 10^5$ мс), и гелий-неоновым лазером “Uniphase 1135P” (Россия) мощностью 20 мВт с длиной волны 633 нм [4–7, 14]. Измерения проводили при интервале величин угла рассеивания 60–120° при 23°C. Растворы, содержащие биорегулятор, предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны с диаметром пор 0.45 мкм “Millipore” (США).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез проводили по методу Леммли [15]. Применяли маркерные белки 14.4–94 кДа “Хеликон” (Россия), для идентификации пептидов в данную смесь была добавлена окисленная В-цепь инсулина из поджелудочной железы быка 3.5 кДа “Sigma” (Германия) из расчета конечного разведения 1 мг/мл. Электрофорез белковых фракций проводили также в неденатурирующих условиях в 7.5%-ном ПААГ [16].

Масс-спектрометрический анализ. Анализ молекулярной массы пептидов проводили методом лазерной десорбционной ионизации (MALDI-TOF) на времяпролетном масс-спектрометре “UltraFlex 2” (Германия). Времяпролетные масс-спектры фиксировали в линейном режиме и режиме рефлектора. Образцы для масс-спектрометрического анализа получали упариванием досуха, с последующим разведением в 70%-ном ацетонитриле, содержащем 0.1%-ную трифторуксусную кислоту. В качестве матрицы использовали α -циано-4-гидроксицианомовую кислоту.

Роллерное органное культивирование *in vitro*. Тритоны были наркотизированы в 2%-ном растворе этилуретана на физиологическом растворе для амфибий (0.65% NaCl) или 0.1%-ном растворе MS-222 “Sigma” (Германия). Далее животных ополаскивали в спирте, декапитировали, брали кожу с верхней части спины животного, с помощью скальпеля кожу нарезали на фрагменты размером 5 × 5 мм, которые помещали во флаконы для культивирования ткани. Среда для культивирования ткани кожи содержала: 70 мл среды 199, 10 мл эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота, 30 мл кипяченой бидистиллированной воды, 200 мкл 4%-ного сульфата гентамицина. Среда для культивирования перед внесением в пузырьки проходила холодную стерилизацию через мембранные фильтры типа “CA” фирмы “Nalgene” (США) с размером пор 0.2 мкм.

В опытных сериях культивирование проводили в среде (4 мл) с добавлением 40 мкл фракций, выделенных из подорожника большого; в контрольной серии к 4 мл культуральной среды добавляли 40 мкл

дистиллированной воды. Все флаконы закрывали в стерильных условиях, и далее культивировали, вращая в роллере при 22°C в течение 7 сут.

Изучение ранозаживляющего действия биорегулятора, выделенного из подорожника, на экспериментальной модели кожной раны у мыши *in vivo*. Животных разделяли на три группы по 5 шт. в каждой. У каждого экспериментального животного под эфирным наркозом на спине вырезали лоскут кожи диаметром около 1 см. Контрольную группу мышей, которым наносили травму, не подвергали никакому воздействию. Другой контрольной группе мышей после нанесения травмы ежедневно вносили в область раны 100 мкл физиологического раствора. Опытной группе мышей после нанесения травмы ежедневно вносили в область раны 100 мкл фракции, выделенной из подорожника.

На 11 сут после нанесения экспериментальной раны всех животных выводили из эксперимента в атмосфере эфира, аккуратно вырезали ткань в области травмы и приготавливали поперечные парафиновые гистологические срезы толщиной 7 мкм. Фиксацию тканей проводили в растворе Буэна, срезы толщиной 7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. Просмотр гистологических препаратов производили с помощью световой микроскопии на микроскопе фирмы "Olympus" (Япония).

Получение антисыворотки. Эксперимент проводили на кролике породы Шиншилла, самец, возраст — 2 мес, масса — 1 кг. Раствор антигена вводили инъекционно подкожно в спину 0.5 мл и внутримышечно в бедро 0.5 мл. Первую инъекцию проводили смесью (1 мл), содержащей полный адъювант Фрейнда и водный раствор слабодиссоциированной фракции белка (рН 3.9–4.8), выделенной из подорожника (0.3 мг/мл) в соотношении 1 : 1. Последующие инъекции антигеном кролика проводили с интервалом в 7 сут смесью (1 мл), содержащей неполный адъювант Фрейнда и водный раствор белка (0.3 мг/мл) в соотношении 1 : 1. Забор проб крови производили, начиная со 2 нед после первой иммунизации путем надреза ушных сосудов, и исследовали на наличие антител методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA с интервалом в 7 сут.

Иммуноферментный анализ антител (ELISA). Метод основан на определении количества антител, присоединившихся к сорбированному на плашке антигену, с помощью конъюгата антивидовых антител пероксидазы. Измеряемая ферментативная активность пероксидазы пропорциональна количеству присоединившихся антител.

В лунки 96-луночного планшета для иммуноферментного анализа вносили по 100 мкл белка, 5 мкг белка/мл фосфатного буферного раствора (на 1 л: 0.2 г/л KCl, 1.44 г/л Na₂HPO₄, 0.24 г/л KH₂PO₄, 2 мл 5 M NaCl; рН 7.4), и инкубировали ночь при 4°C или 1 ч при 37°C. Избыток антигена отмывали 3 раза

фосфатным буфером, содержащим 0.05%-ный Твин-20, и вносили по 100 мкл антисыворотки в концентрации от 2–3 нг/мл до 1–2 мкг/мл в растворе фосфатного буфера, содержащего 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 0.1%-ный Твин-20. Титрование проводили с разведением антисыворотки 1 : 3. После инкубации при 37°C в течение 1 ч, несвязавшиеся антитела отмывали 5 раз (после третьего — встряхивание) по 100–200 мкл фосфатным буфером, содержащим 0.05%-ный Твин-20. Для выявления антител, присоединившихся к антигену (белку), в лунки вносили по 100 мкл конъюгата антивидовых антител с пероксидазой из листьев хрена в растворе фосфатного буфера, содержащего 0.1%-ный Твин-20, инкубировали 1 ч при 37°C и отмывали 5 раз фосфатным буфером, содержащим 0.05%-ный Твин-20 (после третьего — встряхивание).

Для измерения каталитической активности пероксидазы в лунки вносили по 100 мкл свежеприготовленной субстратной смеси следующего состава: 1 таблетка орто-фенилендиамина, 10 мл буферного раствора (цитратно-фосфатный — 92 мл 0.1 M лимонной кислоты; 102 мл 0.2 M Na₂HPO₄ · 2H₂O; рН 4.5–5.0), 20 мкл 30%-ного пероксида водорода. Развитие окраски происходило в течение 15–30 мин при легком перемешивании субстратной смеси при комнатной температуре. Остановку окрашивания производили путем добавления к содержимому каждой лунки по 20 мкл 3 M соляной кислоты. Спектрофотометрически при 492 нм определяли величину оптического поглощения для всех приготовленных растворов, в качестве контроля исследовали раствор, к которому не добавляли антитела.

Иммуногистохимическое окрашивание с использованием FITC-меченых вторичных антител. Для изучения экспрессии слабодиссоциированного белка, выделенного из подорожника, предварительно получали кроличью антисыворотку, которую использовали в качестве первых антител к данному белку в разведении 1 : 10. Применяли метод непрямого иммуноокрашивания с применением вторых, меченых FITC-антител (fluorescein isothiocyanate) (IgG, полная молекула, "Sigma"), антикроличьими антителами в разведении 1 : 35 [17]. Для контроля использовали срезы, окрашенные только вторыми антителами, а также окрашенные антисывороткой от неиммунизированного кролика. Изучение локализации и приготовление изображений проводили с помощью микроскопа фирмы "Olympus" (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе очистки было проведено фракционирование экстракта подорожника путем высадки белков сернокислым аммонием. При создании насыщенного раствора соли в растительном экстракте примесные белки переходили в осадок, а в супернатанте оставались изучаемые биорегуляторы (таблица). На рис. 1 приведена диаграмма, отражаю-

Характеристика фракций подорожника большого

Фракция	Объем, мл и масса, г	Исходная концентрация, мг/мл	Интервалы разбавлений, при которых наблюдался биологический эффект
Экстракт*	3000 мл	0.2	10^{11} , 10^{10} , 10^7 , 10^5 , 10^4
Супернатант	65 мл	0.4	10^2 – 10^8 , 10^{15}
Осадок	0.4 г	0.1	Не активен

* Получен из 800 г веса свежих листьев подорожника.

щая мембранотропную активность супернатанта подорожника, которая характеризовалась полимодальной дозовой зависимостью. Следует отметить, что экстракт подорожника также проявлял активность данного типа. Фракцию осадка далее не исследовали, поскольку она не была биологически активной (таблица).

Фракция супернатанта, выделенная из подорожника, была исследована несколькими методами. Методом динамического лазерного светорассеяния было показано, что в растворе этой фракции содержатся частицы размером от 100 ± 5 до 120 ± 6 нм. Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии в супернатанте подорожника были обнаружены сигналы со значениями m/z , равными 2374, 2591, 2963, 3403. Проведя идентификацию полученных масс-спектрометрических сигналов путем поиска совпадений значений экспериментальных масс с массами пептидов, аннотированных в соответствующих базах данных (SwissProt/TrEMBL) с использованием ресурсов ExPASy-сервера (<http://ca.exPASy.org/srs5/>) не было найдено соответствия с уже известными пептидами.

После разделения фракции супернатанта методом ИЭФ были собраны три рН-фракции: 1–1.8–

3.0; 2–3.9–4.8; 3–8.5–9.5. Методом биотестирования было установлено, что все полученные фракции обладали биологической активностью. Мембранотропная активность, проявляемая данными ИЭФ-фракциями, характеризовалась полимодальной дозовой зависимостью и проявлялась в СМД (10^{-15} – 10^{-11} мг белка/мл). При помощи электрофореза в ПААГ были изучены биологически активные ИЭФ-фракции. Было показано наличие трех белковых компонент в области молекулярных масс менее 6 кДа, 10–15 кДа и 67–80 кДа (рис. 2б). Следует отметить, что при электрофорезе в нативных условиях наиболее четко проявлялись белки с высокой подвижностью (рис. 2а). Возможно, что белки, входящие в ИЭФ-фракции, способны образовывать межмолекулярные ассоциаты, которые при воздействии ДДС-Na и других денатурирующих агентов распались на отдельные компоненты, обладающие различной электрофоретической подвижностью. Поэтому мы наблюдали различное распределение белковых компонент в нативных и денатурирующих условиях. Такая картина разделения компонентов по электрофоретической подвижности наблюдалась во всех исследуемых фракциях подорожника. Следует отметить, что в случае МГТБ животного проис-

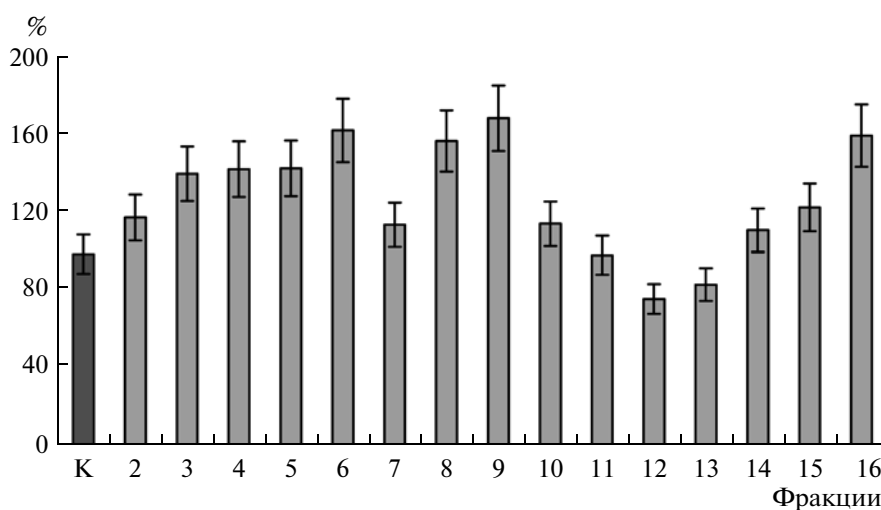


Рис. 1. Дозовая зависимость мембранотропной активности (%) фракции супернатанта экстракта подорожника. По оси абсцисс: степень 10-кратного последовательного разбавления фракции (исходная концентрация 0.4 мг/мл), К – контроль.

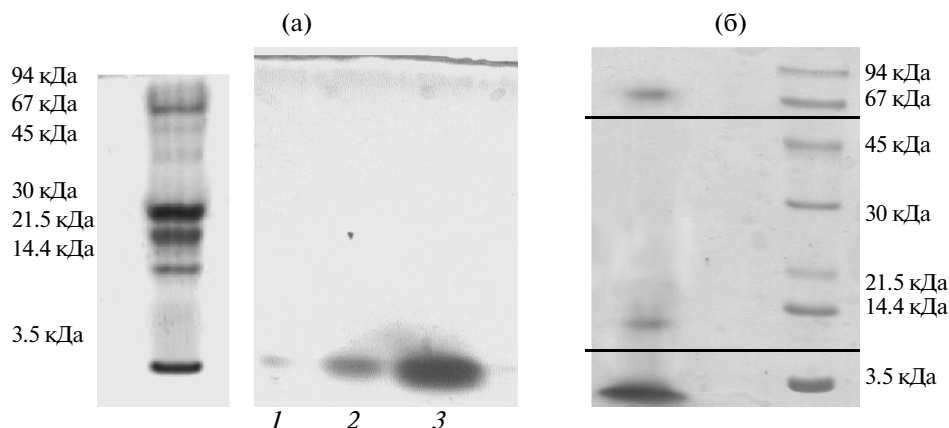


Рис. 2. Электрофорез в 7.5%-ном ПААГ фракций белков подорожника в нативных условиях (а) фракций, содержащих биорегулятор, выделенный из подорожника: 1 – (рН 1.8–3.0); 2 – ИЭФ-фракция белков (рН 3.9–4.8); 3 – ИЭФ-фракция белков (рН 8.5–9.5) и электрофорез ИЭФ-фракции белков (рН 1.8–3.0) в присутствии ДДС-Na (б). Окрашивание Кумаси G-250.

хождения также удалось идентифицировать пептиды, входящие в состав биорегуляторов данной группы и показать, что они взаимодействуют с другими белками, образуя межмолекулярные ассоциаты с различным значением молекулярных масс [6, 12]. Поскольку картина разделения фракций 1–3 в случае электрофореза в нативных условиях была схожей, для дальнейших исследований нами была выбрана наиболее количественно представленная фракция 2 (рН 3.9–4.8). В связи с этим она была использована в качестве антигена для получения поликлональной антисыворотки у кролика с целью изучения локализации биорегулятора в листе подорожника. Было установлено, что биорегулятор локализован в межклеточном пространстве между плазматической мембраной клетки и клеточной стенкой (рис. 3). Данные по локализации биорегулятора подорожника на поверхности клеток согласо-

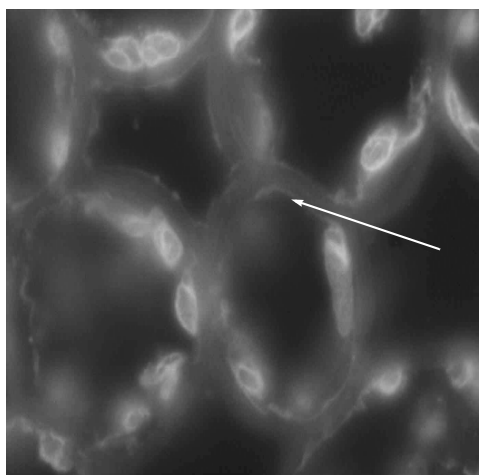


Рис. 3. Локализация биорегулятора подорожника в межклеточном пространстве листьев (см. стрелку).

ются с данными по локализации МГТБ животного происхождения, которые также были обнаружены на поверхности клеток соответствующих тканей [5–7]. Локализация биорегуляторов на поверхности клеток ткани объясняет то, что они в процессе экстракции при условии отсутствия механической и ферментативной обработки легко переходят в раствор.

Таким образом, полученные данные показывают, что, применив экспериментальный подход, разработанный для МГТБ животного происхождения, в подорожнике большом были обнаружены биорегуляторы, проявляющие в СМД мембранотропную активность, которая характеризуется полимодальной дозовой зависимостью. В водном растворе биорегулятора обнаруживаются наноразмерные частицы. В составе фракции растительного биорегулятора были обнаружены пептиды с молекулярными массами не более 4 кДа. Методом ИЭФ было показано, что растительные биорегуляторы, так же, как и МГТБ животного происхождения, представляют собой, в основном, кислые белки. Результаты исследования биорегулятора, выделенного из подорожника, предполагают, что растительные биорегуляторы так же, как и МГТБ животного происхождения, имеют внеклеточную локализацию. Результаты данного исследования позволяют предположить, что в подорожнике большом присутствуют биорегуляторы, проявляющие сходные свойства с МГТБ, выделенными из тканей животных.

Далее было проведено исследование специфической активности ИЭФ-фракций на модели роллерного органного культивирования кожи тритона *in vitro* и на модели экспериментальной раны у мыши *in vivo*. Фракции, выделенные из подорожника, изучали в концентрации 10^{-11} мг белка/мл.

Модель роллерного органотипического культивирования кожи тритона (*Pleurodeles waltli*) была

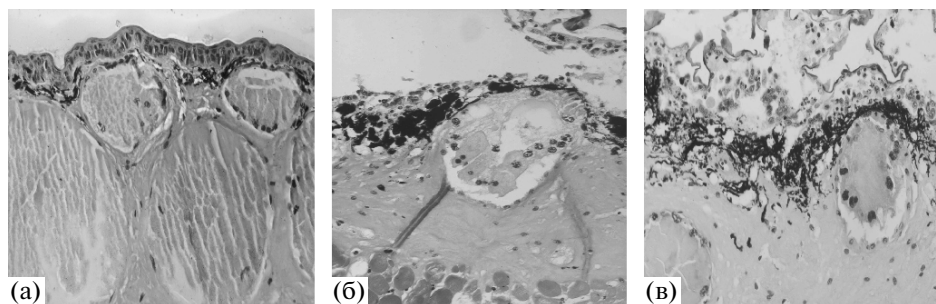


Рис. 4. Гистологические срезы кожи тритона: нативная кожа (а), роллерная органная культура на 7 сут, контроль (б), роллерная органная культура на 7 сут с добавлением биорегулятора подорожника (в).

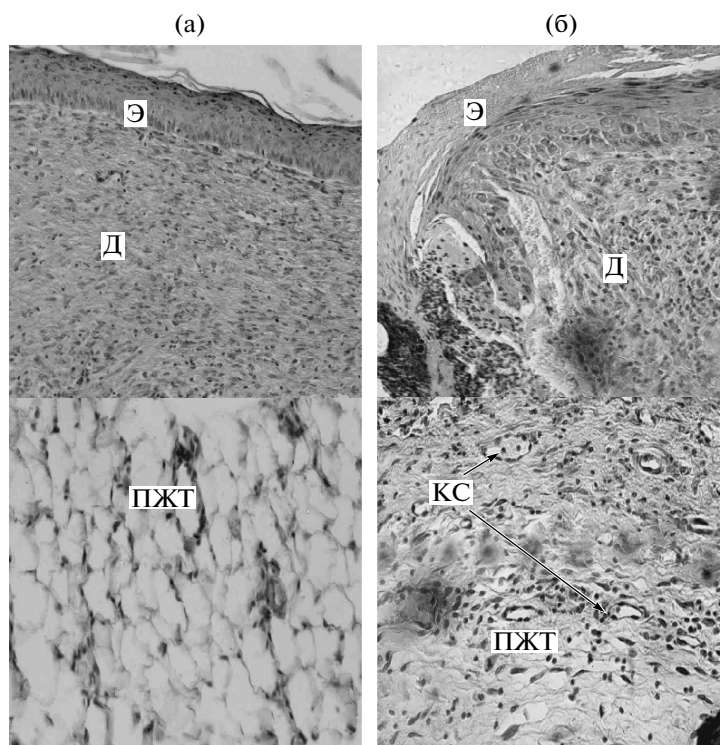


Рис. 5. Ранозаживление кожи мыши на 11 сут после нанесения раны: без обработки раны, контроль (а) и действие физиологического раствора (б). Э – эпидермис, Д – дерма, ПЖТ – подкожная жировая ткань, КС – кровеносные сосуды.

впервые использована нами в данной работе на основании ранее полученных результатов, которые показали, что протекторное действие МГТБ обусловлено их способностью дополнительно стимулировать клеточные источники регенерации в ткани, которые активировались в условиях отсутствия адгезионного сигнала на культуру со стороны подложки [5, 9, 18].

На модели роллерного органного культивирования кожи тритона показано, что фракция с рН 1.8–3.0 в СМД оказывает протекторное действие на ткань, которое после 7-суточного культивирования выражалось в поддержании структуры кожи, сохранении покровного эпителия, жизнеспособности и функций клеток желез. На данном сроке культиви-

рования в культурах контрольной серии (без добавления фракций подорожника) обнаруживались явные признаки протекания деструктивных процессов: наблюдали деградацию клеток эпидермиса (рис. 4б). В культурах опытной серий (при добавлении изучаемой фракции супернатанта подорожника) было обнаружено, что многослойный эпителий в составе активно секретируемой слизи покрывал поверхность фрагмента кожи (рис. 4в). На границе эпителия и кориума отмечалось большое количество пигментированных клеток, число которых увеличивалось при неблагоприятных условиях в качестве защитной реакции организма [19]. В кориуме идентифицировали фибробласты, развитую сеть пигментных клеток, недеструктурирующие железы;

состояние было приближено к нативному (рис. 4а, 4в). Фракция подорожника способствовала усиленному процессу образования слизи, и следовательно слушиванию эпителия (рис. 4в). В опытной группе распределение пигмента было равномерным в отличие от контроля, где пигмент был представлен в виде глыбок и плотных скоплений под эпидермисом, что свидетельствует о более неблагоприятных условиях в контрольной среде и нарушении распределения меланофоров в кориуме.

Таким образом, на модели роллерного органотипического культивирования кожи тритона было продемонстрировано выраженное протекторное действие фракции, выделенной из подорожника. Оно заключалось в поддержании структуры ткани кожи, функции желез, а также адгезионных взаимодействий и жизнеспособности клеток. Характер специфической активности, проявляемый фракцией подорожника, аналогичен активности МГТБ животного происхождения. Следует также отметить, что протекторное действие изучаемая фракция проявляла в СМД. Полученные данные свидетельствуют в пользу высказанного предположения о присутствии группы МГТБ в растениях.

Наиболее выраженное протекторное действие изучаемой фракции подорожника продемонстрировано на модели экспериментальной травмы кожи мыши *in vivo*. Через 11 сут после операции у всех экспериментальных животных наблюдали практически полную реэпителизацию раневой поверхности, незначительное воспаление в субэпидермальной зоне. У мышей контрольной группы (необработанная рана) происходило образование фиброзного рубца — отмечено параллельное эпидермису расположение коллагеновых волокон в виде плотных тяжей (рис. 5а). При обработке раны физиологическим раствором также наблюдали образование соединительно-тканного рубца, однако в центральной части раны отсутствовало полное заживление и реэпителизация, поскольку образовался очаг хронического воспаления. В подкожной ткани практически не наблюдали жировых клеток; волокна коллагена были более рыхлые, чем в дерме (рис. 5б). У мышей опытной группы наблюдали восстановление субэпидермальных слоев (рис. 6). Следует отметить комплексный характер репаративных процессов, протекающий при воздействии изучаемых фракций подорожника, по сравнению с контролем: наблюдали практически полное восстановление эпителия и дермы, в которой были отмечены кровеносные сосуды, а расположение волокон в дерме было более рыхлым, чем в контроле. Помимо этого, при воздействии фракций подорожника в подкожной жировой ткани отмечали интенсивное разрастание жировой ткани и восстановление протоков желез; в контроле на месте повреждения не происходило восстановления жировой ткани, а также не было восстановления протоков потовых желез говорит о возобновлении их активности в дан-

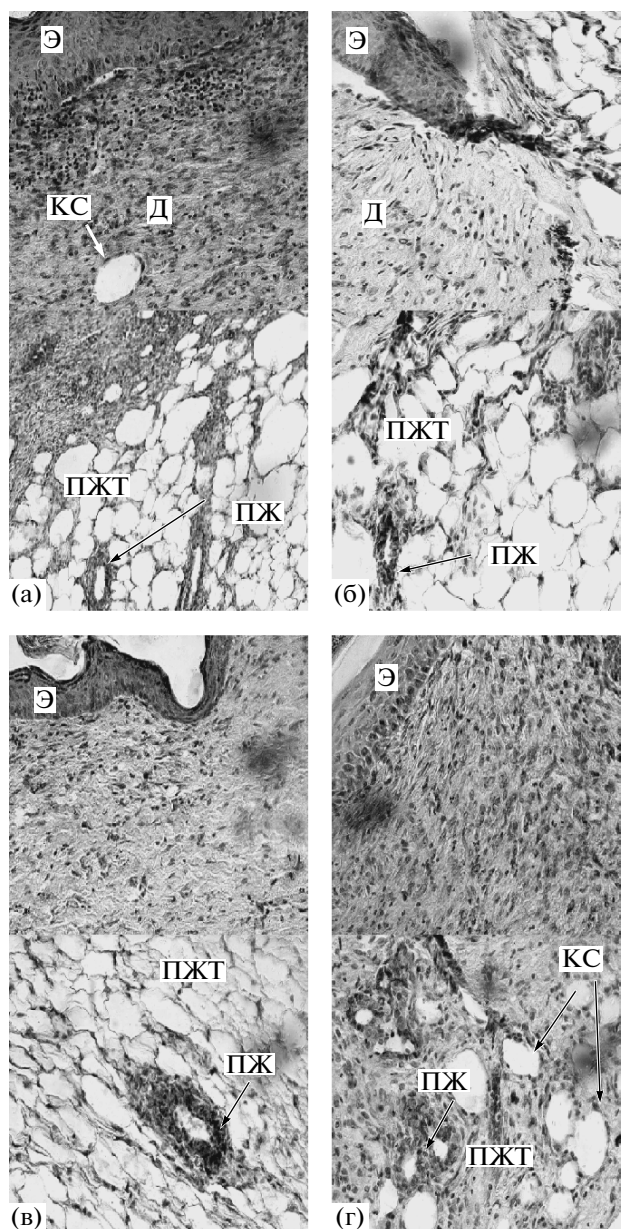


Рис. 6. Влияние различных фракций биорегулятора, выделенных из экстракта подорожника, на ранозаживление кожи мыши через 11 сут после нанесения раны: ИЭФ-фракция с рН 1.8–3.0 (а), ИЭФ-фракция с рН 3.9–4.8 (б), ИЭФ-фракция с рН 8.5–9.5 (в), фракция супернатанта (г). Э – эпидермис, Д – дерма, ПЖТ – подкожная жировая ткань, КС – кровеносные сосуды, ПЖ – протоки желез.

ном участке кожи, а восстановление рыхлой структуры коллагеновых волокон в дерме свидетельствует о появлении эластичности кожи.

Полученные данные показывают, что фракции, выделенные из подорожника, в СМД стимулируют ранозаживление у мышей *in vivo*, способствуя восстановлению нормальной морфологии кожи без образования рубцовой ткани (рис. 6).

В проведенном исследовании впервые было показано, что в тканях подорожника большого присутствуют вещества белковой природы, проявляющие физико-химические свойства, а также биологическую активность *in vitro* и *in vivo*, сходные с МГТБ, выделенными из тканей животных. Следует отметить, что белки, обнаруженные нами в подорожнике большом, проявляли свойственное данному лекарственному растению ранозаживляющее действие. Это обстоятельство позволяет сделать вывод о том, что вещества, входящие в состав изучаемой растительной фракции, ответственны за проявление данным растением лекарственного действия.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-00706-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия здоровья. М.: АСТ, 2008. 896 с.
2. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии. 1991. Т. 52. № 2. С. 181–191.
3. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н., Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусынина М.М., Рыбакова Е.Ю. // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 5. С. 34–39.
4. Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. № 1. С. 22–36.
5. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 49–56.
6. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 28–37.
7. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 38–48.
8. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Eds. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Nauppauge-N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 57–67.
9. Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямсков И.А., Ямскова В.П. // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 6. P. 736–745.
10. Назарова П.А., Краснов М.С., Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. P. 529–533.
11. Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А., Вечеркин В.В., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 4. С. 407–413.
12. Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А., Ильина А.П., Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Борисенко А.В., Березин Б.Б., Кузнецова Е.С., Буряк А.К., Ямсков И.А. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. P. 1195–1203.
13. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
14. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. // Anal. Biochem. 1985. Т. 150. № 5. С. 76–85.
15. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Т. 227. № 6. P. 680–685.
16. Hames B.D. Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach / Eds. B.D. Hames, D. Rickwood. Oxford: University Press, 1990. 106 p.
17. Энгельгардт Н.В. Иммунохимический анализ. М.: Медицина, 1968. 188 с.
18. Ямскова В.П., Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Ямсков И.А. // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. № 1. С. 11–17.
19. Frangioni G., Borgioli G., Bianchi S. // Experim. Zool. 2003. Т. 296A. № 4. P. 125–136.

Study of a New Group of Bioregulators Isolated from the Greater Plantain (*Plantago major* L.)

M. S. Krasnov^a, V. P. Yamskova^a, D. V. Margasyuk^b, O. G. Kulikova^b,
A. P. Il'ina^b, E. Yu. Rybakova^a, and I. A. Yamskov^b

^a Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia
e-mail: embrmsk@mail.ru

^b Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia
e-mail: yamskov@mail.ru

Received May 12, 2010

Abstract—Proteins with physicochemical properties and biological activity similar to those of membrano-tropic homeostatic tissue-specific bioregulators that had been found earlier in various animal tissues were discovered in leaves of the common plantain (*Plantago major* L.). To study the specific activity of these plant proteins, we developed an experimental model for organotypic roller cultivation of newt (*Pleurodeles waltl*) skin tissue *in vitro*. We showed that the plant proteins of interest exert the wound-healing effect, which is characteristic of this plant, on the skin of vertebrates both *in vitro* and *in vivo*.

UDC: 577.15

AN ACTIVATED BY COBALT ALKALINE AMINOPEPTIDASE FROM *Bacillus mycooides*

© 2011 U. Jankiewicz, A. Wnuk

Department of Biochemistry, Warsaw University of Life Science, 02-776 Warsaw, Poland

e-mail: urszula_jankiewicz@sggw.pl, elmar.jz@tlen.pl

Received May 12, 2010

An intracellular arginine – specific aminopeptidase synthesized by *Bacillus mycooides* was purified and characterized. The purification procedure for studied aminopeptidase consisted of ammonium sulphate precipitation and three chromatographic steps: anion exchange chromatography and gel permeation chromatography. A molecular weight of ~50 kDa was estimated for the aminopeptidase by gel permeation chromatography and SDS-PAGE. The optimal activity of the enzyme on arginyl- β -naphthylamide as a substrate was at 37°C and pH 9.0. The enzyme showed maximum specificity for basic amino acids: such as Arg and Lys but was also able to hydrolyze aromatic amino acids: Trp, Tyr, and Phe. Co²⁺ ions activated the enzyme, while Zn²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺ and Mn²⁺ inhibited it. The enzyme is a metalloaminopeptidase whose activity is inhibited by typical metalloaminopeptidase inhibitors: EDTA and 1,10-phenanthroline. Analysis of fragments of the amino acid sequence of the purified enzyme demonstrated high similarity to AmpS of *Bacillus cereus* and AP II of *B. thuringensis*.

Aminopeptidases (EC 3.4.11) belong to exopeptidases that are ubiquitous in the living world. They catalyze the hydrolysis of peptide bonds in peptide and protein substrates with the release of N-terminal amino acids. Bacterial aminopeptidases can be intracellular or extracellular enzymes. Intracellular aminopeptidases, which are the predominant type, about 90% of all aminopeptidases studied so far, carry out important functions in many physiological processes, including post-translational maturation of proteins and final stages of degradation of intracellular proteins. Their role in the regulation of gene transcription has also been proven [1]. Secreted exopeptidases, including aminopeptidases, are complemented by endopeptidases to provide the cell with nutrients that enable their growth and multiplication. In the case of pathogenic bacteria the enzymes enhance their virulence when colonizing the host organism [2, 3]. Bacterial aminopeptidases are ordered into two main groups that differ in narrow or broad substrate specificity. Enzymes with broad substrate specificity are able to cleave several different amino acid residues or groups of amino acids from the N-terminus or P1 position of a protein. On the other hand, enzymes with narrow substrate specificity are able to release one type of amino acid residues from position P1 of the peptide or protein substrate [4]. Both groups of aminopeptidases belong to stereospecific enzymes that in their majority release L-forms of amino acids. However, there are some exceptions such as aminopeptidase DmpB from *Ochrobactrum anthropi* which shows a decided preference for D-alanine as a substrate [5]. Bacterial aminopeptidases with high activity against protein substrates with N-terminal arginine are usually characterized by narrow specificity and are not a very numerous group of enzymes. So far the properties of only a few such enzymes have been described, including the aminopeptidases syn-

thesized by *Streptococcus gordonii* and *Lactobacillus sakei* [6, 7]. Some aminopeptidases with broad specificity may also show some activity against substrates with N-terminal arginine, e.g. the alanyl aminopeptidase synthesized by *Pseudomonas* sp., or leucyl aminopeptidase of *Bacillus* sp. [8, 9].

Interest in aminopeptidases with this specificity stems from their potential participation in the intracellular metabolism of arginine. This amino acid released as a result of the direct action of aminopeptidases can not only be a product for the synthesis of new proteins but also a precursor in the synthesis of polyamines and other intermediates for many important cellular transformations. The amino acid may also be shunted into one of the catabolic arginine pathways in bacteria. Transformations of arginine in the arginine deiminase pathway (ADI) can be both a source of energy in the form of ATP or of numerous valuable metabolites. Interest in arginine metabolism is also stimulated by the demands of the biotechnology industry, mainly its pharmaceutical and food branches [7, 10].

The studies described herein focused on the intracellular aminopeptidase synthesized by a rhizosphere strain of the bacterium *Bacillus mycooides*. These bacteria belong to ubiquitous microorganisms occurring in the soil, waters and phyllosphere. The species, together with several other genetically closely related *Bacillus* species, forms the *Bacillus cereus* group [11]. *B. mycooides* strains are currently being characterized mainly from the viewpoint of their use in bioremediation and biological plant protection [12, 13]. There is no available information in the literature regarding aminopeptidases produced by *B. mycooides*. By analogy to other species from the *B. cereus* group it can be said that the best characterized aminopeptidases in this group are the leucine aminopeptidases [14, 15]. As yet

among these bacteria no aminopeptidase with high substrate preference for N-terminal arginine has been characterized.

In the current study we focused on the purification and biochemical characterization of a new arginine-specific aminopeptidase synthesized by a soil strain of *B. mycoides*. We also carried out the identification of the purified protein using MS analysis and cloned part of the gene coding for the aminopeptidase.

METHODS

Biological material and culture conditions. The source of the aminopeptidase was a soil strain of bacteria isolated from wheat rhizosphere. Based on biochemical and morphological characteristics it was classified as *Bacillus mycoides*. The bacteria were grown in liquid tryptic soy broth (TSB) medium, pH 7.5 for 48 h with shaking (120 rpm) at 30°C. The growth of the bacteria was monitored by measuring optical density (OD_{600 nm}). Bacterial cells were spun down (1000 g, 20 min), the supernatant was decanted and the cell pellet was washed twice with Tris-HCl, pH 8.8 and sonicated. The obtained intracellular protein extract was taken for aminopeptidase purification.

Enzymatic activity. Aminopeptidase activity was assayed using synthetic amino acid derivatives of β -naphthylamine (Sigma, USA) [16]. The absorbance of the colour product was determined photometrically at 525 nm. The enzyme to the control samples was added after termination of the reaction. The results of absorbance measurements were converted to μ moles product formed, using a standard curve prepared for 5 different concentrations of β -naphthylamine.

A unit of activity was taken as one μ mole naphthylamine formed in one minute in the presence of 100 μ l of enzyme.

Purification of enzyme. Fractionation of the enzyme preparation with ammonium sulphate was carried out by using 35% in the first stage, followed by 85% saturation in the second stage. The pellet was dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8, and dialyzed overnight against the same buffer.

Gel filtration chromatography. Prior to loading on the column the dialyzed enzyme preparation was concentrated in Amicon ultrafiltration chamber (membrane PM 10, Millipore, USA). The sample containing 1% sucrose was applied to a Sephadex G-150 column equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8, containing 15 mM KCl. Fractions showing the studied activity in the presence of Arg- β -naphthylamid (Arg- β -NA) were pooled and taken for further purification.

Ion-exchange chromatography. Fractions with enzymatic activity were applied to a Protein-Pak Q 8HR HPLC (Waters, USA) anionite column, which was first equilibrated with 15 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8. The enzymatic protein bound to the anionite bed was eluted with a linear gradient of KCl from 0 to 0.5 M. Collected 2.5 ml fractions showing activity were pooled and then dialyzed

overnight against 15 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8. The next step involved HPLC re-chromatography using a narrower KCl gradient, from 0.2 to 0.4 M and the same column as above equilibrated with 15 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8.

The highly purified enzyme preparation was used as material for determining the biochemical and kinetic properties of the enzyme.

Determination of protein content. Protein concentration at all stages on the study was determined as described by Bradford [17].

Electrophoretic separations. Electrophoretic separations under native, semi-denaturing and denaturing conditions were according to the procedure described by Laemmli [18]. Protein in the gels was visualized by staining with coomassie brilliant blue R-250. After carrying out the full purification procedure, protein was staining using modified silver stain method, compatible with mass spectrometry analysis [19]. To stain polyacrylamide gels for the presence of active enzyme following native and semi-denaturing (without thermal denaturation of the enzyme solution) electrophoresis they were incubated in buffered solution of the substrate at 37°C and then stained in Fast Garnet GBC (Sigma-Aldrich, USA) solution. The location of active enzyme was indicated by red bands against a bright background.

Determination of molecular weight of the enzyme: The molecular weight of the analyzed enzyme was determined by SDS-PAGE and in the course of gel filtration on a Sephadex G-200 column. The column was calibrated using the following standard proteins: bovine albumin (67 kDa), ovalbumin (44 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) and cytochrome C (12.4 kDa). The void volume of the column (V_0) was determined using dextran blue.

Characterization of the enzyme. Determination of thermal stability: the buffered enzyme preparation was subjected to 30 min incubation at four different temperatures: 30, 37, 40 and 45°C. Following the pre-incubation, the activity of the enzyme in optimal reaction temperature was assayed. The activity in a sample that was not subjected to 30 min pre-incubation was taken as 100%.

Effect of inhibitors and metal ions. In these experiments the following inhibitors were used: for metalloaminopeptidases – EDTA, 1,10-phenanthroline, for cysteine aminopeptidases – iodoacetamide, E-64, and for serine aminopeptidases – diisopropyl fluorophosphate (DFP) and for aspartyl peptidases – pepstatin A.

The enzyme was pre-incubated for 30 min in the presence of the inhibitors or metal ions at 4°C, after which substrate was added and the reaction carried out at 37°C.

Reactivation of enzymatic activity after inhibition with EDTA. After incubation with 10 mM EDTA the reaction mixture was dialyzed and the enzymatic activity was reactivated by overnight incubation with 1 mM of the metal ions Co^{2+} , Mg^{2+} or Ca^{2+} .

Determination of Michaelis–Menten constants. K_m was determined for the amino acid derivatives of β -naph-

Table 1. *B. mycooides* aminopeptidase purification procedure

Purification step	Total activity, U*	Total protein, mg	Specific activity, U · mg ⁻¹ protein	Yield, %	Purification, fold
Cell extract	407	1547	0.26	100	1
Ammonium sulfate precipitation (40–85%)	305	630	0.48	74.9	1.84
Sephadex G-150	282	206	1.36	69.3	5.18
1st Q 8HR HPLC	53.2	1.1	48.18	13.02	189.9
2nd Q 8HR HPLC	32.1	0.3	106.6	7.86	405.5

* U – μm naphthylamine/min /100 μl of enzyme.

thylamide (β -Na) against which the enzyme was active; the final concentration of the substrates in the reaction mix was from 0.015 to 1.5 mM. The K_m value was determined using the graphical Lineweaver-Burk method.

Analysis of fragment of the amino acid sequence of the purified enzymatic protein. Both the highly purified enzyme preparation and the protein band cut out from polyacrylamide gel, corresponding with the electrophoretic mobility of a band with aminopeptidase activity, were sent to the Mass Spectrometry Laboratory at IBB PAN (Poland).

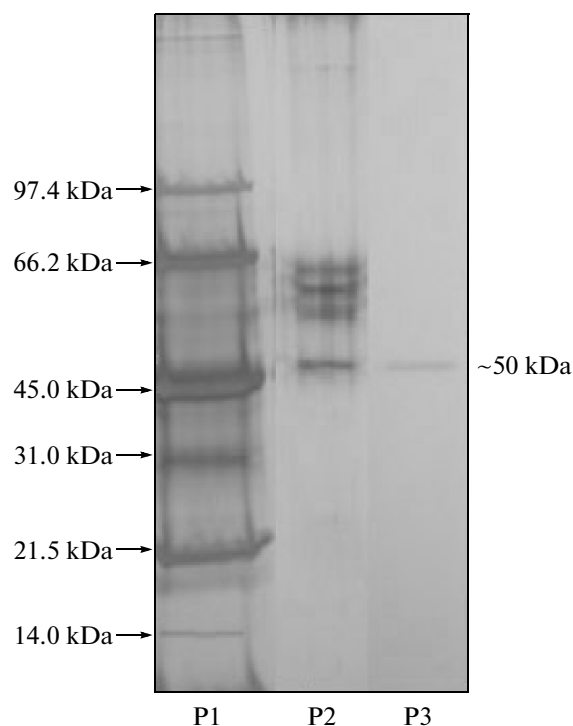


Fig. 1. SDS-PAGE of the purified aminopeptidase of *B. mycooides*.

P1—markers of molecular weight, P2 – enzyme preparation after second HPLC chromatography, silver-stained gel, P3 – enzyme activity after second HPLC chromatography; gel stained with Fast Garnet GBC (semidenaturing pattern).

Cloning of part of the aminopeptidase gene sequence.

Isolation of genomic *B. mycooides* DNA was carried out with the use of Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Lithuania). Based on the results of MS analysis, primers for the amplification reaction (PCR) compatible with the sequence of *B. cereus* AH187 gene [Gene Bank NC_011658.1] were designed with the sequence forward: TCCCTTG CAGTCAATGTTGTTGT and reverse: GACCATTGTTTTTCCGCCAACTAA. The PCR product was ligated into vector pGEM[®]-T (Promega, USA) and propagated in *E. coli* JM109 cells. Plasmids were isolated from white bacterial colonies in which the presence of the gene coding for aminopeptidase in the plasmid was additionally verified by PCR with the use of the above-mentioned primers. Plasmids containing a DNA insert in the form of *B. mycooides* aminopeptidase gene were sent for sequencing to the Laboratory of DNA Sequencing and Oligonucleotide Synthesis (IBB PAN, Poland).

RESULTS

Purification of the enzyme: Intracellular *B. mycooides* aminopeptidase was purified using ammonium sulphate fractionation and a combination of low and high pressure chromatographic techniques: gel filtration and ion-exchange chromatography.

The consecutive stages of enzyme purification and the characterization of the enzyme are presented in Table 1. The procedure used resulted in over 400-fold purification of the enzymatic protein, with yield 7.9%. The most effective step was ion-exchange chromatography (HPLC) in which the enzyme was purified over 35-fold (Fig. 1, 2). In this step the studied enzymatic protein was separated from an aminopeptidase showing a substrate preference for Leu- β -NA. Activity against Leu- β -NA was demonstrated in the crude preparation and in the fraction active against Arg- β -NA after the first two purification steps. The purified enzyme preparation was taken for further studies in which the properties of the enzyme were determined.

Determination of molecular weight. The molecular weight of arginyl aminopeptidase determined by SDS-PAGE was approximately 50 kDa (Fig. 1). This result was

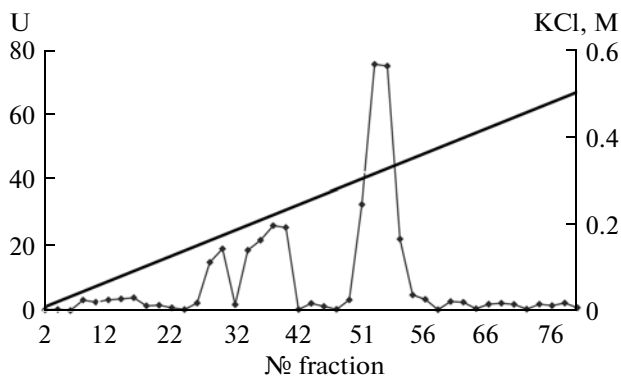


Fig. 2. Elution profile for aminopeptidase with activity against Arg- β -NA following ion exchange chromatography on Q 8HR (HPLC) column using 0 to 0.5 M KCl gradient. Fractions with highest activity were collected at 0.3 M KCl.

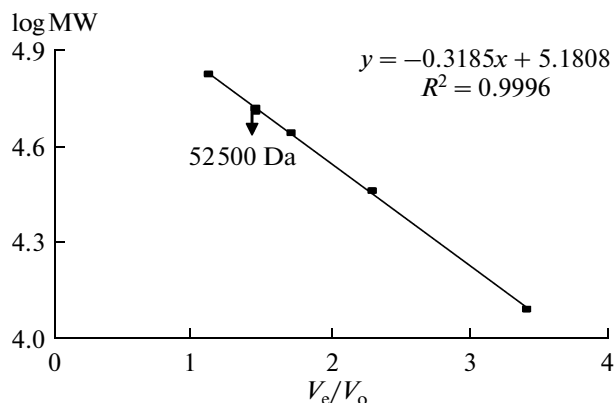


Fig. 3. Calibration curve for the V_e/V_0 dependence of the standards used depending on the logarithms of their molecular weights. The black square represents the log value from which the molecular weight of the studied aminopeptidase was calculated.

confirmed by gel filtration studies in which a molecular weight for the enzyme of about 52 kDa was obtained (Fig. 3). Together these results indicate that the studied enzymatic protein does not have a subunit structure and is a monomer.

Optimal conditions for enzyme activity. The enzyme retained high activity against Arg- β -NA as a substrate only within a narrow pH and temperature range (Fig. 4). The optimal temperature for the reaction catalyzed by the studied aminopeptidase was 37°C. Small deviations from the optimal temperature resulted in a strong decrease in enzyme activity. During incubation of the reaction mix at either 30 or 39°C only 40% of the activity at the optimal temperature was determined. The pH optimum for the hydrolysis reaction catalyzed by the *B. mycooides* aminopeptidase was 9.0. The enzyme was active in a narrow pH range, from 7.0 to 9.5. Small deviations from the optimal pH value resulted in strong loss of activity by the studied enzyme. At pH 8.0 only 60% of maximal enzyme activity was observed.

Thermal stability. The thermostability of the studied enzyme was determined in the 30–45°C range, as illustrated by Fig. 5. After 30-min pre-incubation at 37°C the activity of the enzyme decreased by only 5%. However, after pre-incubation for the same time at 40°C the activity of the enzyme dropped by about 40%. After 30-min pre-incubation at 45°C the aminopeptidase *B. mycooides* retained only 12% of its activity compared to the control, not pre-incubated, sample.

Effect of specific inhibitors and metal ions. The effect of inhibitors specific for the individual catalytic groups of bacterial proteases on the activity of the purified aminopeptidase was also determined. The results of these experiments are summarized in Table 2. The activity of the studied enzyme was strongly inhibited in the presence of inhibitors specific for metallopeptidases: EDTA and 1,10-phenanthroline. The stronger inhibition was demonstrated by EDTA, which in concentration 1mM inhibited the

activity of the studied aminopeptidase by 85%. Use of the other inhibitor, 1,10-phenanthroline, in the same concentration resulted in loss of about 60% activity. Inhibitors specific for serine, cysteine and aspartyl peptidases did not significantly affect the activity of purified *B. mycooides* aminopeptidase. Of all the metal ions used in the study the enzyme was activated the strongest by Co^{2+} ions which in concentration 1mM increased the activity of the ami-

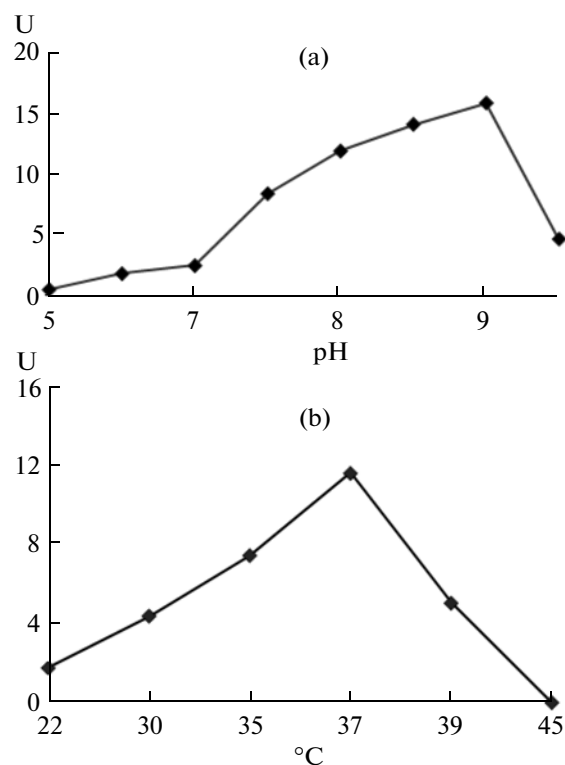


Fig. 4. Effect of pH and temperature on *B. mycooides* aminopeptidase activity.

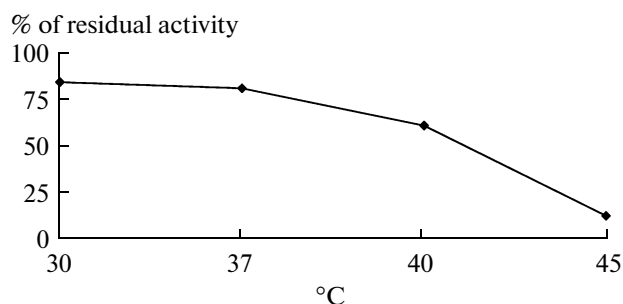


Fig. 5. Thermostability of *B. mycooides* aminopeptidase after 30 min preincubation at temperatures ranging from 30 to 45°C.

nopeptidase by 90% (Table 3). The enzyme was also activated by Ca^{2+} and Mg^{2+} ions. On the other hand, the activity of the enzyme was inhibited by Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} and Mn^{2+} ions. The strongest inhibitor was the Zn^{2+} ion which caused a loss of over 90% of aminopeptidase activity already at concentration 0.1 mM. Attempts were also made to reactivate the activity of the enzyme Co^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} ions after prior inhibition of its activity in the presence of 10 mM EDTA and dialysis of the incubation mixture. The activity of the enzyme was restored only after the addition of Co^{2+} to the incubation mix. Ions Ca^{2+} and Mg^{2+} did not affect the recovery of aminopeptidase activity.

Substrate specificity and substrate affinity. The studied enzyme showed highest activity against the substrate Arg- β -NA (Table 4). The activity of the enzyme against this particular substrate was taken as 100%. The analyzed aminopeptidase was also visibly active against naphthylamide derivatives of such amino acids Lys and of the aromatic amino acids Trp, Tyr and Phe. The purified enzyme was not active against any of the other tested substrates: Leu-,

Ala-, Pro-, Gly-, His-, and Val- β -NA. The substrate affinities were determined in the presence of those substrates with which enzymatic activity was observed (Table 4). The lowest value of the constant K_m , that is the highest affinity, was obtained with Arg- β -NA. The affinity of the aminopeptidase for naphthylamide derivatives of the aromatic amino acids: Trp- β -NA and Tyr- β -NA was lower and did not show any differences between them, whereas the value of the Michaelis-Menten constant for Phe- β -NA varied from that of the others.

Identification of purified enzymatic protein. The purified protein was subjected to identification using the mass spectrometry (MS) technique. The peptide sequences identified using mass spectrometry showed high similarity to the sequences of aminopeptidase S (Amp S) from *B. cereus* and aminopeptidase II from *Bacillus thuringiensis*. The fragments of the amino acid sequences of the studied enzyme identified by MS demonstrated high similarity to the sequence of *B. cereus* Amp S (Fig. 6). However, only 30% overlap with the two mentioned aminopeptidases was obtained. Consequently, the additional cloning of part of the gene coding for using genomic DNA of the studied strain as PCR template, was carried out. The obtained nucleotide sequence (1065 bp) after being translated to the amino acid sequence showed full identity with the sequence of *B. cereus* AmpS (Fig. 6 line A and B).

A 354 amino acids fragment was obtained, which consists 76% of the *B. cereus* aminopeptidase sequence. The studied enzymatic protein from *B. mycooides* is built from a large amount of alanine (11.6%), glutamic acid (9.9%) and leucine (8.5%). The amino acid composition also includes a small amount of arginine (2.2%), glutamine and methionine (1.4%) as well as cysteine (0.8%). The total number of amino acids carrying a positive charge (arginine and lysine) was 34, whereas such amino acids as aspartic acid and glutamic acid were found to occur in 53 positions. The theoretical pI, calculated on the basis of the obtained sequence, was 5.12.

Table 2. Effect of inhibitors on activity of *B. mycooides* aminopeptidase

Inhibitor	Concentration, mM	Relative activity, %
None	—	100
EDTA	1	15
	10	0
1,10-Phenanthroline	1	44
	3	13
Iodoacetamide	1	99
	3	98
E-64	0.01	100
	0.1	99
PMSF	1	98
	3	94
Pepstatin A	3	100

DISCUSSION

This study describes the complete purification procedure of an intracellular aminopeptidase synthesized by a soil strain of *B. mycooides* and the catalytic, kinetic and partly molecular characteristics of the enzyme. The purified enzymatic protein, in the form of both a solution and a band excised from polyacrylamide gel was subjected to MS analysis. Both samples yielded compatible identification of an enzymatic protein with no other protein with proteolytic activity being present.

The obtained results pointed to the similarity of the amino acid sequence of the protein to the sequence of Amp S of *B. cereus* and aminopeptidase II of *B. thuringiensis*. In spite of repeated MS analyses we were not able to achieve a larger degree of overlap with the *B. cereus* protein sequence. This can be explained in one of two ways. The first explanation could be that there were problems with the appropriate length of the analyzed peptides ob-

Table 3. Effect of metal ions on activity of *B. mycooides* aminopeptidase

Metal ion	Concentration, mM	Relative activity, %
None	—	100
Co ²⁺	1	190
	0.1	135
Ca ²⁺	1	121
	0.1	106
Mg ²⁺	1	113
	0.1	112
Zn ²⁺	1	6
	0.1	8
Hg ²⁺	1	12
	0.1	16
Cu ²⁺	1	13
	0.1	38
Mn ²⁺	1	43
	0.1	55

Table 4. Substrate preferences and affinity of purified *B. mycooides* aminopeptidase

Substrate	Activity, %	K_m , M
Arg- β -NA	100	4.3×10^{-5}
Lys- β -NA	70	1.5×10^{-5}
Trp- β -NA	55	4.4×10^{-4}
Tyr- β -NA	45	5.6×10^{-4}
Phe- β -NA	30	1.1×10^{-3}

tained after trypsin digestion, stemming from the unfortunate distribution of Arg and Lys residues in some parts of the amino acid sequence of the analyzed protein. The second possibility is that the sequence of the aminopeptidase studied by us could be similar to the *B. cereus* enzyme only to the extent observed. In order to verify the latter hypothesis cloning of part of the *B. mycooides* gene coding for the aminopeptidase was undertaken. Primers were designed for the *B. cereus* gene sequence, but in their design the results of MS analysis were also taken into account. This result allows stating that the characterized enzyme is Amp S synthesized by a soil strain of *B. mycooides*.

As yet there have been only very scant reports in the literature regarding the biochemical properties of Amp S. A problem in studies on Amp S of *Staphylococcus* was obtaining and analysis of the crystalline structure of the protein by Odintsov et al. [20]. The experience of the study group resulted in the creation in the MEROPS base of a new MQ clan of metallopeptidases within the metallopeptidase M29 family, which includes Amp S and ami-

nopeptidase T [20, 21]. Lin et al. [15] performed studies in which they demonstrated the similarity in the structure of the active centre of *S. aureus* Amp S and aminopeptidase II from *B. sterothermophilus*. However, a comparative analysis of the complete amino acid sequences of both these aminopeptidases carried out by the mentioned authors revealed only 40% convergence.

The activity of the *B. mycooides* aminopeptidase characterized in the current study is strongly inhibited in the presence of EDTA and 1,10 phenanthroline. The active centre of the enzyme most likely contains cobalt ions, this being indicated not only by the activation of the enzyme after addition of these ions but also by reactivation of the enzyme previously treated with EDTA. The activation of bacterial metalloaminopeptidases by cobalt ions has been described in the literature many times, examples being the methionine aminopeptidase of *B. subtilis* [22], the leucine aminopeptidase of *B. kaustophilus* CCRC [23], as well as *Thermus aquaticus* aminopeptidase T [21].

The substrate preferences of the *B. mycooides* aminopeptidase studied by us differ from those described for the Amp S homologue aminopeptidase T [24]. Purified *B. mycooides* aminopeptidase demonstrated high activity against the synthetic substrate Arg- β -NA and was not active against substrate with N-terminal leucine. This property distinguishes the studied enzyme from aminopeptidase II found in bacteria belonging to the genus *Bacillus*, which are classified as leucine aminopeptidases. There are no direct data in the literature regarding the substrate preferences of Amp S. It has only been shown that *Staphylococcus aureus* Amp S was also active against a substrate with N-terminal tyrosine [20]. The absence of activity with regard to Leu- β -NA allows to distinguish the studied aminopeptidase also from the arginyl aminopeptidase synthesized by the yeast *Debaromyces hansenii*, which was active against Arg- β -NA, Lys- β -NA, Tyr- β -NA, Phe- β -NA and Leu- β -NA [25].

The molecular weight of the *B. mycooides* aminopeptidase was determined to be about 50 kDa. Our results indicate that the enzyme is a monomer. This is shown by the results of gel filtration chromatography and by the fact that the enzyme did not lose activity after electrophoretic separation under semi-denaturing conditions. In-depth studies on the subunit structure of *S. aureus* Amp S were carried out by the above-mentioned authors [20]. The obtained crystalline form of the enzyme suggests that it is a subunit protein with homodimer structure. However, in view of the doubts stemming from the location of the active centre in a dimeric molecule the authors suggest that it may function in solution as an active monomer. Aminopeptidases T [27] and aminopeptidases II [14] are also dimers with similar molecular weight of the monomer. Aminopeptidases composed of a larger number of subunits are also known, an example of which is the trimeric arginyl aminopeptidase of *Lactobacillus sakei* [7]. A molecular weight similar to that determined in our study has been described for several monomers, including the leucyl aminopeptidase from *B. kaustophilus*, [23] and ami-

Line 1	MSFEQTLEKY AALAVNVGVN IQPGQTLISIS APLEAVQFVR LVTEKAYKSG AKHVYVDWND	60
Line A	MSFEQTLEK- - - - -SIS APLEAVQFVR - - - - -HVYVDWND	
Line B	SIS APLEAVQFVR LVTEKAYKSG AKHVYVDWND	
Line 1	ETLTRLKFDL APEEAFAEFP SWKAHAREEL AKEGAAFMSI YAENPDLLKG VESTRIATAH	120
Line A	ETLTR--FDL APEEAFAEFP SWK- - - - -EGAAFMSI YAENPDLLK- - - - -	
Line B	ETLTRLKFDLAPE EAFAEFP SWKAHAREEL AKEGAAFMSI YAENPDLLKGV ESTRIATAH	
Line 1	KVAGEAMKVY RDYVQADKVS WCVISVPTKE WAAKVFPDVA PEEQEAKLWD AIFKATRADL	180
Line A	- - - - -VS WCVISVPTK- - - - -VPDVA PEEQEAK- - - - -ADL	
Line B	KVAGEAMKVYRDYVQADKVS WCVISVPTKE WAAKVFPDVA PEEQEAKLWD AIFKATRADL	
Line 1	ENPVEAWKEH DKTLLHTKVDY LNEKHYKALH YTGPGTDLTI ELPEKHVWAG AGSLNEKNVP	240
Line A	ENPVEAWK- - - - - - - - - - - - - - -HVWAG AGSLNEK- - - - -	
Line B	ENPVEAWKEH DETLHTKVDY LNEKHYKALH YTAPGTDLTI ELPEKHVWAG AGSLNEKNVP	
Line 1	FMANIPTEEV FTMPLKTGVN GQVSTKPLA FAGNIIDNFT LTFENGRIVD YKAEVGEEAL	300
Line A	-MANIPTEEV FTMPLK- - - - - - - - - -AGNIIDNFT LTFENGR- - - - -	
Line B	FMANIPTEEV FTMPLKTGVN GQVSTKPLA FAGNIIDNFT TFENGRII-D YKAETGEEAL	
Line 1	KHLVETDEGS HFLGEVALVP HDSPISNTNI LFYNTLFDEN ASCHLAIGNA YAFNLVGGKT	360
Line A	- -AFNLVGGK-	
Line B	KHLVETDEGS HFLGEVALVP HDSPISNTNI LFYNTLFDEN ASCHLAIGNA YAFNLVGGKT	
Line 1	MSKEELAKNG ANASITHEDF MIGSAELDID GITADGRHEP IFRKGNWAF	409
Line A	- -	
Line B	- -	

Fig. 6. Multiple-sequence alignment of aminopeptidase from *B. mycoides*:

Line 1 Amino acid sequence of aminopeptidase *B. cereus* (GeneBank ZP_04298756); Line A – MS analysis of amino acids sequence of aminopeptidase from *B. mycoides*; Line B – amino acid sequence translated from nucleotide sequence from obtained aminopeptidase clone.

nopeptidase PepS [26]. A higher molecular weight of about 70 kDa was reported for the arginyl aminopeptidase from *Streptococcus gordonii* [6].

Since the pH optimum of the studied aminopeptidase is 9.0, the enzyme can be classified along with alkaline aminopeptidases that have been described in the literature. Examples of these are the leucyl aminopeptidase from *Streptomyces hygroscopicus*, with pH optimum 8.0 [28] the extracellular aminopeptidase from *B. subtilis* isolates, which has optimal activity in the pH 8–9 range [29] or the *B. thuringiensis* leucyl aminopeptidase with pH optimum of 10.0 [30].

It has been determined that the amino acid sequence of studied enzyme is similar to a large degree to the sequence of Amp S and aminopeptidase II of bacteria belonging to the genus *Bacillus*, grouped in clan M29 (<http://merops.sanger.ac.uk>) embracing thermophilic peptidases [15, 24]. However, our studies show that the *B. mycoides* aminopeptidase differs from the mentioned aminopeptidases in the lack of this characteristic thermal stability.

REFERENCE

1. Matsui, M., Fowler, J.H., and Walling, L.L., *Biol. Chem.*, 2006, vol. 387, no. 12, pp. 1535–1544.
2. Cahan, R., Axelrad, I., Safrin, M., Ohmann, D.E., and Kessler, E. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 2, pp. 43645–43652.
3. Jankiewicz, U. and Bielawski, W., *Acta Microbiol. Polon.*, 2003, no. 3, vol. 52, pp. 217–231.
4. Gonzales, T. and Robert-Baudouy, J., *FEMS Microbiol.*, 1996, vol. 18, no. 4, pp. 319–344.
5. Fanuel, L., Goffin, C., Cheggour, A., Devreese, B., Driessche, G., Joris, B., Beeumen, J., and Frere, J.M., *J. Biochem.*, 1999, vol. 341, pp. 147–155.
6. Goldstein, J.M., Nelson, D., Kordula, T., and Mayo, J.A., *Infect. Immun. J.*, 2002, vol. 70, no. 2, pp. 836–843.
7. Sanz, Y., and Toldra, F., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, vol. 68, pp. 1980–1987.
8. Lee, G.D., Chun, S.S., Kho, Y.H., and Chun, H.K., *J. Appl. Microbiol.*, 1998, vol. 84, no. 4, pp. 561–566.

9. Jankiewicz, U. and Bielawski, W., *Folia Microbiol.*, 2002, vol. 47, no. 3, pp. 230–234.
10. Lu, Ch.D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 70, no. 3, pp. 261–272.
11. Hansen, B.M., Leser, T.D., and Hendriksen, N.B., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, vol. 202, no. 2, pp. 209–213.
12. Bargabus, R.N., Zidack, J. Sherwood, and Jacobsen, B., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2003, vol. 16, no. 12, pp. 145–1153.
13. Yudono, B., Said M., Hakstege, P., and Suryadi, F.X., *South J. Sustainable Develop.*, 2009, vol. 2, no. 1–4, pp. 64–71.
14. Kuo, L.Y., Hwang, G.Y., Lai, Y.J., Yang, S.L., and Lin, L.L., *Curr. Microbiol.* 2003, vol. 47, no. 1, pp. 40–45.
15. Lin, L.L., Chen, Y.P., Yang, J.C., Hua, Y.W., Wang, W.C., and Kuo, L.Y., *Protein J.*, 2008, vol. 27, no. 4, pp. 215–222.
16. Kolehmainen, L. and Mikola, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, vol. 145, no. 2, pp. 633–642.
17. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, no. 7, pp. 248–254.
18. Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, no. 15, pp. 680–685.
19. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M., *Anal Chem.* vol. 68, no. 5, pp. 850–858.
20. Odintsov, S.G., Sabaa, I., Bourenkov, G., Rybin, V., and Bochtler, M., *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, no. 30, pp. 27792–27799.
21. Odintsov, S.G., Sabaa, I., Bourenkov, G., Rybin, V., and Bochtler, M., *J. Mol. Biol.*, 2005, vol. 354, pp. 403–412.
22. You, C.H., Lu, H.Y., Sekowska, A., Fang, G., Wang, Y.P., Gilles, A.M., and Danchin, A., *BMC Microbiol.*, 2005, vol. 5, pp. 57–67.
23. Linn, L.-L., Hsu, W.-H., Wu, C.-P., Chi, M.-C., Chou, W.-M., and Hu, H.-Y., *Extremophiles*, 2004, vol. 8, no. 1, pp. 79–87.
24. Minagawa, E., Kaminogawa, S., Matsuzawa, H., Ohta, T., and Yamauchi, K., *Agr. Biol. Chem.*, 1988, vol. 52, no. 7, pp. 1755–1763.
25. Bolumar, T., Sanz, Y., Aristoy, M. C., and Toldra, F., *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, vol. 86, no. 1–2, pp. 141–151.
26. Fernandez-Espla, M.D. and Rul, F., *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 263, no. 2, pp. 502–510.
27. Motoshima, H., Azuma, N., Kaminogawa, S., Ono, M., Minagawa, E., Matsuzawa, H., Ohta, T., and Yamauchi, K., *Agr. Biol. Chem.*, 1990, vol. 54, no. 9, pp. 2385–2392.
28. Karadzic, I., Izrael, L., Gojgic-Cvijovic, G., and Vujcic, Z., *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, vol. 94, no. 4, pp. 309–314.
29. Reiland, V., Fundoiano-Hershcovitz, Y., Golan, G., Gilboa, R., Shoham, Y., and Shoham, G., *Acta Cryst.*, 2004, vol. 60, pp. 2371–2376.
30. Cahan, R., Hetzroni, E., Nisnevitch, M., and Nitzan, Y., *Curr. Microbiol.*, 2007, vol. 55, no. 5, pp. 413–419.

UDC 577.15

RECOMBINANT GLYCEROL DEHYDRATASE FROM *Klebsiella pneumoniae* XJPD-LI: INDUCTION OPTIMIZATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

© 2011 X. L. Xu*, ***, G. L. Zhang***, B. Lv**, Y.-J. Yuan*, and C. Li**

*School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin, 300072, P.R. China
e-mail: xuxl@shzu.edu.cn

**School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, P.R. China
e-mail: lichun@bit.edu.cn

***Key Laboratory for Green Processing of Chemical Engineering of Xinjiang Bingtuan, Shihezi University, Xinjiang, 832003, P.R. China

Received July 22, 2010

Glycerol dehydratase (GDHt) is the rate limiting enzyme in the biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol. The optimization of inducing process for recombinant GDHt from *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li carried out to increase specific activity and ratio of soluble form. The optimum condition was inducing under the isopropyl- β -D-thiogalactoside concentration of 0.8 mM and the temperature of 20°C for 3 h. Homogeneity of GDHt then was obtained by affinity chromatography, resulted in 2.11-fold purification and an overall yield of 47.5%. The optimum pH and reaction temperature of GDHt were pH 8.0 and 45°C, respectively. The K_m for glycerol, 1,2-propanediol, 1,2-ethanediol and coenzyme B₁₂ were 0.48, 1.43, 3.07 mM, and 10.03 nM, respectively. The GDHt showed relatively stable even under temperature of 40°C and a bit blunt to oxygen. The thermo-inactivation kinetic models were fit linear under different temperatures.

Glycerol dehydratase (EC 4.2.1.30, GDHt) catalyzes the conversion of glycerol and 1,2-propanediol (1,2-PDO) to 3-hydroxy-propionaldehyde (3-HPA) and propionaldehyde, respectively [1]. This reaction is the rate limiting step for biotransformation from glycerol to 1,3-propanediol (1,3-PDO), which is widely used for many synthesis reactions, in particular as a monomer for polycondensations to produce polyesters, polyethers and polyurethanes [2]. Interest in the microbial production of 1,3-PDO has been lasting for over thirty years. *Klebsiella* (*K. pneumoniae*), *Citrobacter* (*C. freundii*), and *Clostridia* of the *C. butyricum* groups have been found produce 1,3-PDO under anaerobic condition from glycerol fermentation [3–5]. They are industrially focused because of their appreciable substrate tolerance, yield and productivity in the production of 1,3-propanediol.

GDHt, as a key enzyme in the biosynthesis of 1,3-PDO from glycerol, was firstly purified to a stable, inactive, homogeneous complex with hydroxocobalamin from *Aerobacter aerogenes* by Zekon et al. in 1970 [6]. Todd et al. [7] obtained purified GDHt from *Lactobacillus reuteri* with molecular weight of approximately 200000, while only one subunit was examined clearly [7]. The composition of GDHt subunits was not clear until large number of researches were carried out on these strains. The affinity chromatography was the most effective method to obtain homogeneity from recombinant [8, 9]. It was found that GDHt utilized adenosylcobalamin (AdoCbl, CoB₁₂) as a cofactor and exhibits a ($\alpha\beta\gamma$)₂ structure,

where α , β and γ represented the large, medium and small subunits of the protein, respectively [10]. Substrate binding site triggers the formation of catalytic free radical through Co–C bond homolysis in the AdoCbl-dependent GDHt. This enzyme undergoes mechanism-based inactivation by glycerol during catalysis [11].

One excellent potential industrial strain named *K. pneumoniae* XJPD-Li was screened by Zhang et al. [12] which could fast consume glycerol with high productivity of 3.35 g l⁻¹ h⁻¹ and molar yield of 0.75 (1,3-PDO to glycerol) under the temperature of 40°C and the pH of 8.0. It was found that *K. pneumoniae* XJPD-Li could also produce 1,3-PDO under aerobic condition with high final concentration of 1,3-PDO (65.26 g l⁻¹), satisfied yield (0.56 mol mol⁻¹) and excellent productivity (3.16 g l⁻¹ h⁻¹) [12, 13]. The gene (*dhaBCE*) of rate-limiting enzyme, GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li, was obtained to discover its good catalysis characterization [14]. The sequence alignment of gene and amino acid was performed between GDHt (U30903) from *K. pneumoniae* ATCC 25955 and GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li. As a result, several amino acid residue differences were found in the non-active site. For the great interest of the GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li, the optimization of inducing conditions were carried out to overexpress the recombinant GDHt with energetic activity and stability. After performing facile purification procedures, the catalysis properties of homogeneity were examined subsequently.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media and culture conditions. The gene (EF634063) of GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li has been cloned and sequenced [14]. The plasmid pET-28a (+) (Novagen, Germany) and *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, Germany) were used as expression vector and host, respectively. *E. coli* was aerobically grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C, containing 1,2-PDO (0.1%) and kanamycin (50 mg ml⁻¹), which were added when their transformants with plasmids were cultured.

Optimization of inducing conditions. Gene of GDHt amplified from *K. pneumoniae* XJPD-Li was ligated to expression vector pET-28a (+) directly, after digested by *Eco*RI and *Sac*I. The pET-28a-*dha*BCE was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). When the culture reached an OD₆₀₀ of approximately 1.0 to 1.5, isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) with the concentration of 0.4, 0.8, or 1.2 mM was added into cultural medium, respectively. The cell growth and enzyme activity were examined every one or 2 h under different cultural temperatures. Bacterial growth was monitored by determining the optical density at 600 nm of the cultures using a spectrometer. Cells were harvested by centrifugation (12000 g, 5 min), and washed twice with phosphate buffer (containing 2% 1,2-PDO).

Purification of recombinant GDHt. Harvested cells (2 g) were suspended in the loading buffer (pH 8.0, containing 50 mM phosphate, 2% 1,2-PDO, 200 mM KCl and 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)) and disrupted by ultrasonication in an ice-bath for 10 min at 50% of the output (750W) with an Ultrasonic Liquid Processors (SONICS US). The cell debris was removed by centrifugation at 12000 g for 20 min from the disrupted solution. The cell-free supernate was decanted and centrifuged again at 12000 g for 10 min.

The cell-free supernate was applied to a column of Ni-nitrilotriacetate (Ni-NTA) agarose gel (Qiagen GmbH, Germany), equilibrated with loading buffer previously. The loading buffer was not changed to washing buffer (loading buffer with 20 mM imidazole), until all the unbinding protein was washed out. The elution buffer (loading buffer with 150 mM imidazole) was then applied to the column. The elution peak was collected to ultra-filtration concentration system (filtration membrane 100 kDa). The fraction harboring homogeneity proteins were pooled and used for the following experiments. All operations were carried out at 4°C. The samples of each step were applied to SDS-PAGE.

Enzyme and protein assays. GDHt activity was determined by improved 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine (MBTH) method according to Zhang, et al. [12]. The resulting azine derivatives were determined spectrophotometrically at 305 nm (A₃₀₅). Since glycerol serves as substrate and suicide inactivator for GDHt, 1,2-PDO (0.2 M) was used as a substrate for routine assay of the enzyme. One unit of GDHt is defined as the amount of enzyme activity that catalyzes the formation of 1 μmol of

propionaldehyde per minute under the assay conditions. Specific activity is expressed as units per mg of protein. Protein concentration was determined using the method of Bradford with crystalline bovine serum albumin (BSA) as a standard.

SDS-PAGE was performed with a 12% polyacrylamide gel on a vertical mini gel apparatus at 120 V for 1.5 h. Molecular weight marker was purchased from Tiangen Biotechnology Co., (Beijing, China). Proteins were stained with coomassies brilliant blue R-250. The GEL-IMAGING system (Bio-Rad, USA) was utilized to analyze the band of SDS-PAGE, quantitatively.

Determination of properties. Assays to determine the optimum pH and temperature were performed in different buffer and water bath, respectively. The pH values of the buffer were adjusted by 3.0 M hydrochloric acid or 3.0 M potassium hydroxide. The optimum pH value was calculated by non-linear regression to the Bell-Shaped Double *pKa* equation by use of the curve fit feature of the Originpro 7.5 (USA).

Measurement of kinetic parameters. Purified enzyme was used for measuring *K_m* values for 1,2-PDO, 1,2-EDO, glycerol and coenzyme. One-minute assay was employed for measurement of *K_m* for glycerol, as glycerol induces suicide inactivation of the enzyme. The apparent *K_m* values were expressed in mM or nM and calculated by non-linear regression to the Michaelis–Menten equation by use of the nonlinear curve fitting programme (Originpro 7.5).

Thermostability of GDHt. The purified GDHt was incubated under the temperature of 37, 40 or 45°C. The measurement of residual enzyme activity was carried out in due course.

Oxygen inactivation of GDHt. In one case, the purified GDHt was incubated with CoB₁₂ (50 μM) at 37°C, according to Toraya, et al. [15]. The residual enzyme activity was examined after incubated 30 min. In the other case, the purified GDHt was incubated with CoB₁₂ (50 μM) at 37°C, and was aerated with air (0.05 v/v min) at the same time. The residual enzyme activity was examined every certain minute.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of inducing conditions on the expression of recombinant GDHt. First of all, *E. coli* BL21 (DE3) including the pET-28a (+)-*dha*BCE was induced under various concentrations of inducing agent. The SDS-PAGE of the whole cell sample showed that the concentration of IPTG 0.8 mM was much favored to the production of recombinant GDHt, where the quantity of recombinant GDHt did not increase with the concentration of inducer in a direct ratio (Fig. 1). The bands of target protein were indicated by arrows on the left of the figures. It was showed in SDS-PAGE that apparent molecular weights of GDHt were a bit larger than calculated ones, which was possibly lead by the changing of protein electrophoresis behavior with alkaline His-tag (6 Histidine) [16]. The concentra-

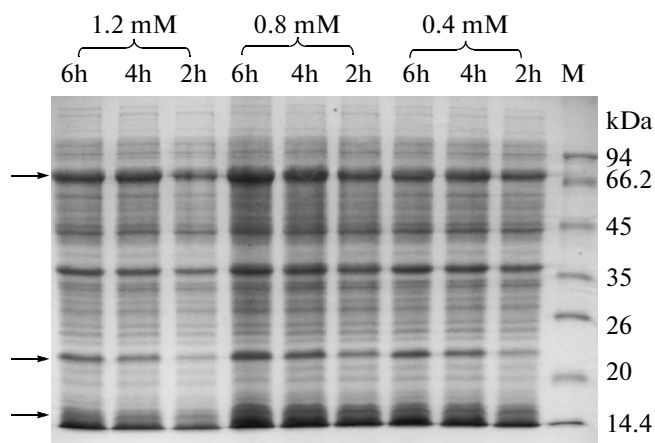


Fig. 1. The effect of induction time and the concentration of IPTG on the overexpression of GDHt from *E. coli* BL21 (DE3) (PET-28a (+)-dhaBCE).

M – standard protein weight. The arrows showed the large, medium and small subunits of GDHt from the top.

tion of 0.8 mM (IPTG) was then chosen according to the inducing performance.

According to Catherine et al. [17], it was founded that several proteins were all in aggregates when produced in genetically engineered strains of *E. coli* grown at 37°C. However, at a growth temperature of 23–30°C, 30–90% of the recombinant protein was soluble [17]. It is desirable

to express recombinant GDHt in its soluble, active form. The specific activity ($U\ mg^{-1}$), the total activity (U) of GDHt (crude enzyme) and the biomass of recombinant strains (OD_{600}) were then examined under various inducing temperatures. It could be described from Fig. 2 that the biomass of strain was enhanced along with the increasing of temperature, and the total activities of GDHt approached to the same level after inducing for 3 h under different temperature. However, the highest specific activity of GDHt ($71.4\ U\ mg^{-1}$) was obtained under induction temperature of 20°C for 3 h.

In most cases, solubility is not an all-or-none phenomenon. In order to obtain the efficient inducing strategy, supernatant and cell debris of recombinant were examined further under the inducing temperature of 20 and 30°C (Fig. 3). The SDS-PAGE described that the ratio of soluble to insoluble protein was improved from 0.73 (30°C) to 1.34 (20°C) (Fig. 3). Prior to high inducing temperature, the production of soluble GDHt under the temperature of 20°C was higher than that under the temperature of 30°C. It was identical as the results in Fig. 2. So the temperature of 20°C was selected for the inducing condition. Under such condition, the recombinant GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li was over expressed effectively with impressive specific activity which was higher than reported by other research groups [18].

Purification of recombinant glycerol dehydratase. The summary of the purification results for recombinant GDHt was shown in Table 1. Approximately 2.11-fold

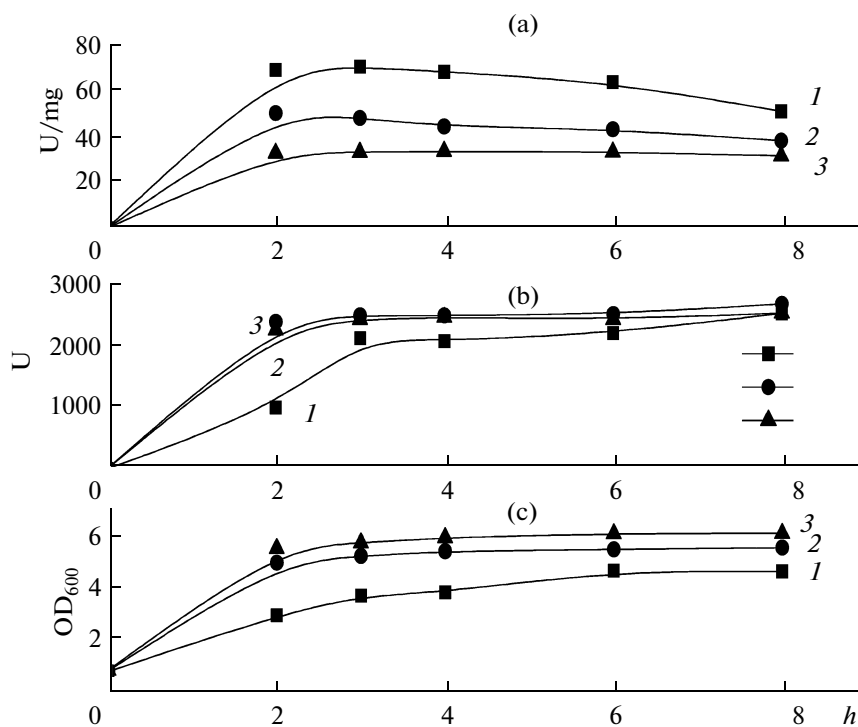


Fig. 2. Effect of inducing temperature on the overexpression of recombinant GDHt: a – specific activity; b – total activity; c – biomass; 1 – 20; 2 – 30; 3 – 37°C.

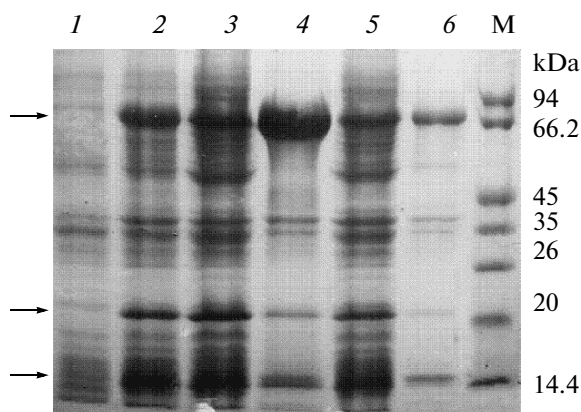


Fig. 3. Effect of inducing temperature on the ratio of soluble to insoluble quantity of recombinant GDHt:

1 – non-induced whole cell; 2 – induced whole cell; 3 – cell-free supernatant/crude enzyme (30°C, 3 h); 4 – cell-free debris (30°C, 3 h); 5 – cell-free supernatant/crude enzyme (20°C, 3 h); 6 – cell-free debris (20°C, 3 h); M – standard protein weight. The arrows showed the large, medium and small subunits of GDHt from the top.

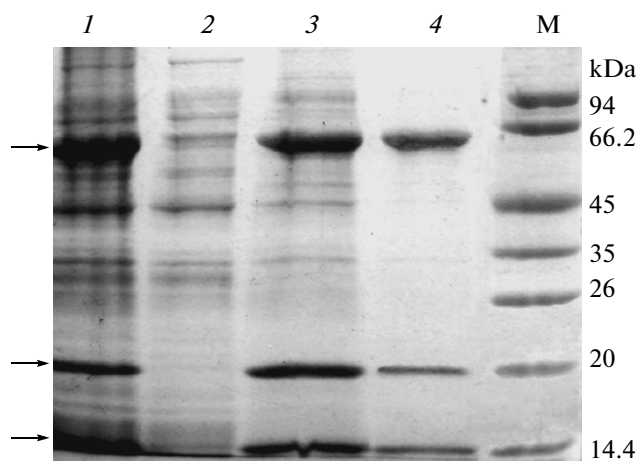


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of the purification of recombinant GDHt:

M – marker; 1 – whole cell (induced by IPTG); 2 – unbinding peak; 3 – cell-free supernatant/crude enzyme; 4 – elution peak (150 mM imidazole). The arrows showed the large, medium and small subunits of GDHt from the top.

purification was achieved in an overall yield of 47.5% and final specific activity was 114.2 U mg⁻¹. The Ni-NTA affinity chromatography was the key step for the purification of recombinant GDHt from *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET-28(a)-*dhaBCE*. Samples from each step of the purification process were examined by SDS-PAGE. It was showed clearly in the Fig. 4 that few target protein was eluted in unbinding peak and the GDHt was purified to homogeneity almost in one affinity step. The ultra-filter step subsequently was benefit to move part lower molecular weight impurities and the high concentrated imidazole, the latter of which could disturb the measurement of activity for its strong absorbance at 315 nm. In addition, concentrated enzyme solution from this step was of convenience to be examined in following researches. Both affinity chromatography and ultra filtration could carry out feasibly and quickly, which was essential to avoid the loss of enzyme activity.

Characterization of GDHt. According to the catalysis characterization of GDHt reported, it showed that the optimum catalysis temperature and pH was normally around 30°C and 7.0. And most GDHt experienced the inactivity process with the existence of glycerol or oxygen [6, 7, 9]. Fig. 5 described the optimum temperature and pH for the recombinant GDHt catalyzing the conversion of 1,2-PDO to propionaldehyde, respectively. The deter-

mination of the optimum temperature for recombinant GDHt was performed by using a temperature range from 30 to 55°C and the optimum result was observed at 45°C. According to Toraya et al. [8, 15], the temperature of 30 or 37°C was close to the optimum condition. Normally, pH was also important for its influence on the diol conversion to propionaldehyde. A range of pH from 5 to 10 was tested and the highest activity was obtained between 7.5 and 8.5 with a maximum at pH 8.0. The further kinetic experiments were then performed under the optimized reactive conditions, pH (8.0) and temperature (45°C).

GDHt activity was also monitored by the conversion of various substrates. The K_m of the GDHt for the three preferential substrates (1,2-PDO, 1,2-EDO, glycerol) and coenzyme B₁₂ were determined. The highest substrate affinity was obtained for glycerol with a K_m of 0.48 mM followed by 1,2-PDO (K_m : 1.43 mM) and 1,2-EDO (K_m : 3.07 mM). It was obviously that glycerol was the optimum substrate among them. The K_m for glycerol in this research was lower than what was reported [8]. Affinity for the coenzyme B₁₂ was considerably higher with a K_m of 10.03 nM. It showed that the recombinant GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li had higher affinity with coenzyme B₁₂ and glycerol than that of GDHt from various strains [18].

The thermostability of recombinant GDHt was determined by the original raw relative activity data

Table 1. Purification of recombinant glycerol dehydratase of *E. coli* (DE3)/pET 28a (+)-*dhaBCE*

Purification Step	Protein, mg	Activity, U	Specific activity, U mg ⁻¹	Yield, %	Purification fold
Crude enzyme	38.1	2068	54.4	100	1
Affinity (Ni-NTA)	10.1	998.2	98.9	48.3	1.82
Ultra-filtration	8.6	982.7	114.2	47.5	2.11

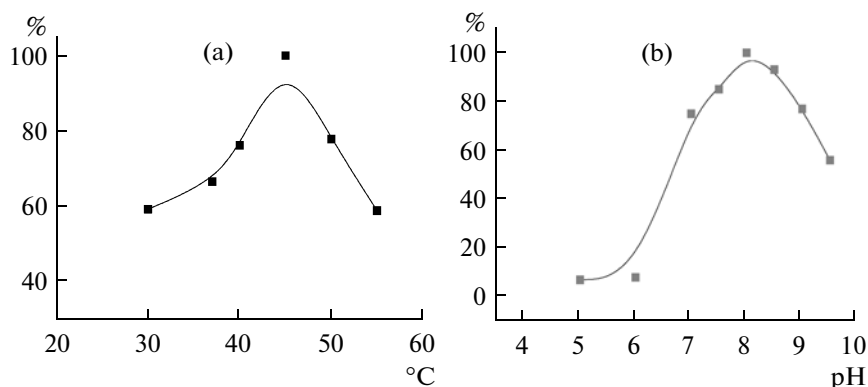


Fig. 5. Effect of temperature (a) and pH (b) on the activity of the purified GDHt.

transformed by log natural function. Results (lines) of regression analysis of experimental data (symbols) by the one-step two states showed that the thermo-inactivation reaction of GDHt was accorded with first order kinetic equation (Fig. 6). It could be observed from the equations that the GDHt here performed the excellent thermostability under the temperature of 37 and 40°C. The activity of GDHt did not reduce obviously until the reaction temperature increased to 45°C. The trend line equations shown in Table 2 indicated the good linear character of Log-Transformed data. That is, the inactivation kinetic models were fit linear under different temperatures.

As what reported before, oxygen was one of the key reasons to inactivate GDHt. Among the coenzyme B₁₂-dependent GDHts from various strains, they were found to be sensitive when exposure to oxygen [15, 19]. In addition, coenzyme B₁₂-independent GDHt from *C. butyricum* was founded extremely oxygen sensitive [20]. The sensitivity of oxygen by recombinant GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li was also determined in this research according to Toraya et al. [15]. On contrast, GDHt in this research was

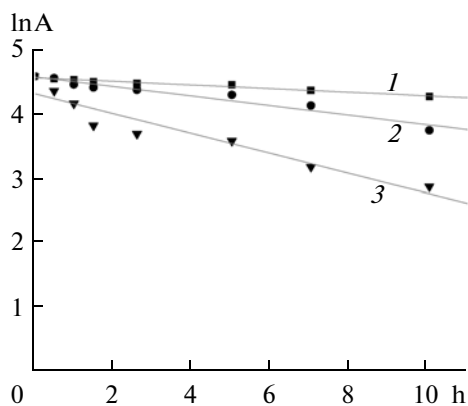


Fig. 6. Thermo-inactivation model of the recombinant GDHt.

lnA: A – relative activity. 1 – 37; 2 – 40; 3 – 45°C.

not as sensible as what was reported. When the similar oxygen inactivation system was provided for recombinant GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li, it was found that the enzyme showed less declination of activity after 30 min. Once aeration was applied in this system, the drop of activity of GDHt was clear. When substrate-free apoenzyme was incubated with CoB₁₂ in the water bath of 37°C, aerated with air (0.05 v/v min), about 40% percent original activity of GDHt remained for 30 min (Fig. 7). The mechanism for inactivation of GDHt by glycerol has been explained by the loss of the intermediate radical from the active site, leaving catalytically incompetent cofactor (cobalamin and 5'-deoxyadenosine) tightly bound in the active site. Though it was common that oxygen was harmful for the anaerobic bioprocesses, such as the catalysis of nitrogenase [21], the inactivation mechanism of key enzyme by oxygen was not yet obtained.

The results obtained in present research demonstrate that the recombinant GDHt from *K. pneumoniae* XJPD-Li is one good biocatalyst with high activity and catalyzing

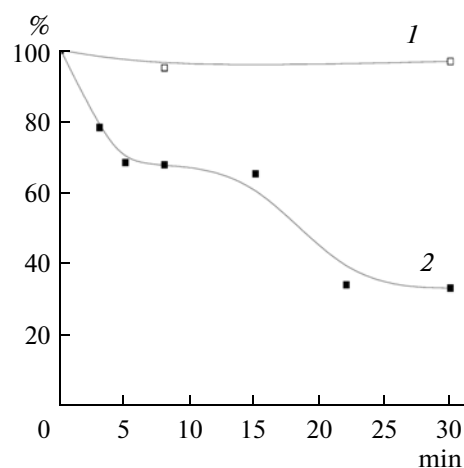


Fig. 7. Oxygen inactivation of the recombinant GDHt: 1 – purified GDHt incubated with coenzyme B₁₂ (50 μM) at 37°C was aerated with air (0.05 v/v min); 2 – purified GDHt incubated with coenzyme B₁₂ (50 μM) at 37°C.

Table 2. Linear regression analysis the thermal inactivation*

T, °C	Trend line equation Y = A + BX	R	SD	N	P
45	Y = 4.33456 – 0.15631X	–0.9518	0.19405	8	2.69936E-4
40	Y = 4.59774 – 0.07529X	–0.97408	0.06736	8	<0.0001
37	Y = 4.58469 – 0.02859X	–0.98662	0.0182	8	<0.0001

* R–relative coefficient; SD – standard deviation; N – number; P – probability.

condition under relatively high temperature and soft alkaline condition. It also shows thermostability and oxygen-blunt during catalyzing which was important for industrial enzyme.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financial supported by National Natural Science Foundation of China (20776017), and Fok Ying Tung Education Foundation (101071), Natural Science Foundation of Beijing (5072028), Fundamental Research of Beijing Institute Technology (20060642004), Natural Science Foundation of Shihezi University (ZRKX2008005).

REFERENCES

- Daniel, R., Bobik, T.A., and Gottschalk, G., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1998, vol. 22, no. 5, pp. 553–566.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.P., and Deckwer, W.D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, vol. 52, pp. 289–297.
- Cheng, K.K., Zhang, J.A., Liu, D.H., Sun, Y., Liu, H.J., Yang, M.D., and Xu, J.M., *Process Biochem.*, 2007, vol. 42, no. 4, pp. 740–744.
- Reimann, A., Biebl, H., and Deckwer, W.D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, vol. 49, no. 4, pp. 359–363.
- Boenigk, R., Bowien, S., and Gottschalk, G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, vol. 38, no. 4, pp. 453–457.
- Schneider, Z., Larsen, E.G., Jacobson, G., Johnson, B.C., and Pawelkiewicz, J., *J. Biol. Chem.*, 1970, vol. 245, no. 13, pp. 3388–3396.
- Todd, L.T. and Walter, J.D., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1990, vol. 56, no. 4, pp. 1195–1197.
- Takamasa, T., Muneaki, A., Hirokazu, M., Hiroe, T., Takashi, N., Kyouchi, N., Hideaki, S., Ryuji, H., and Tetsuo, T., *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, no. 37, pp. 22352–22357.
- Sauvageot, N., Pichereau, V., Louarme, L., Hartke, A., Auffray, Y., and Laplace, J.M., *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, no. 22, pp. 5731–5737.
- Liao, D.I., Dotson, G., Turner, I., Reiss, L., and Emptage, M., *J. Inorg. Biochem.*, 2003, vol. 93, no. 1–2, pp. 84–91.
- Toraya, T., *Chem. Rev.*, 2003, vol. 103, no. 6, pp. 2095–2127.
- Zhang, G.L., Ma, B.B., Xu, X.L., Li, C., and Wang, L.W., *Biochem. Eng. J.*, 2007, vol. 37, no. 4, pp. 256–260.
- Ma, B.B., Xu, X.L., Zhang, G.L., Wang, L.W., Wu, M., and Li, C., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2009, vol. 152, no. 1, pp. 127–134.
- Xu, X.L., Zhang, G.L., Wang, L.W., Ma, B.B., and Li, C., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2009, vol. 56, no. 2–3, pp. 108–114.
- Toraya, T. and Mori, K., *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 6, pp. 3372–3377.
- Tang, W.H., Zhang, J.L., Wang, Z.Y., and Huang, M.M., *Acta Phytophysiol. Sinica*, 2000, vol. 26, no. 1, pp. 64–68.
- Catherine, H.S. and Mathieu, H.M.N., *Nat. Biotechnol.* 1988, vol. 6, no. pp. 291–294.
- Wang, F.H., Qu, H.J., Tian, P.F., and Tan, T.W., *Biotechnol. J.*, 2007, vol. 2, no. 6, pp. 736–742.
- Kajiura, H., Mori, K., Tobimatsu, T., and Toraya, T., *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 39, pp. 36514–36519.
- O'Brien, J.R., Raynaud, C., Croux, C., Girbal, L., Soucaille, P., and Lanzilotta, W.N., *Biochemistry*, 2004, vol. 43, no. 16, pp. 4635–4645.
- Peters, J.W. and Szilagyi, R.K., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, vol. 10, no. 2, pp. 101–108.

УДК 577.154.2+542.952+579.22

ИММОБИЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА–ПРОДУЦЕНТА ГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗЫ В КСЕРОГЕЛЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И СВОЙСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

© 2011 г. Г. А. Коваленко*, **, Л. В. Перминова*, Т. В. Чуенко*, Л. И. Сапунова***, Е. А. Шляхотко***, А. Г. Лобанок***

*Институт катализа СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия
e-mail: galina@catalysis.ru

**Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

***Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, 220141 Беларусь

Поступила в редакцию 13.06.2010 г.

Разработан оригинальный способ иммобилизации нерастущих клеток микроорганизмов в ксерогеле диоксида кремния, содержащем нерастворимые гидроксосоединения кобальта(II). На основе *Escherichia coli* с использованием гена *Arthrobacter nicotianae* сконструирован рекомбинантный штамм–продукцент глюкозоизомеразы. Обнаружено, что активность глюкозоизомеразы и стабильность биокатализаторов, приготовленных на основе рекомбинантного штамма *E. coli*, в 3–5 раз выше по сравнению с биокатализаторами, приготовленными с использованием штамма–донора *A. nicotianae*. В условиях непрерывного гидролиза 3 М фруктозы при 62–65°C в реакторе с неподвижным слоем время полунинактивации биокатализаторов, приготовленных на основе рекомбинантного штамма и *A. nicotianae*, было ~60 и ~25 сут соответственно.

Глюкозоизомераза (ГИ) (ксилозоизомераза, D-ксилоза кетол-изомераза, КФ 5.3.1.5) – фермент, катализирующий реакцию изомеризации глюкозы во фруктозу. Научные публикации последних лет посвящены целенаправленному изменению свойств этого фермента путем селекции и адаптации соответствующих “диких” штаммов–продукентов [1–4]. В работе [3] описаны свойства ГИ, выделенной из гипертермофилов рода *Thermotoga* sp., которая проявляет активность при температуре выше 100°C; при 90°C продуктивность фермента, выделенного из *Thermotoga neapolitana*, составляет 1000 кг фруктозы на 1 кг фермента. Однако следует учитывать, что при температуре $\geq 65^\circ\text{C}$ в присутствии кислорода протекает побочная реакция разложения фруктозы. В работе [1] описана ГИ из *Streptomyces olivaceoviridis* E-86, которая проявляет высокую активность и стабильна при pH 5.0. Выделенный фермент сохраняет первоначальную активность при 60°C и pH 5.0 в течение 30 ч. Использование кислотоустойчивой ГИ позволит объединить стадию осахаривания крахмала со стадией изомеризации глюкозы. Глюкозо–фруктозные сиропы (ГФС), полученные по такой одностадийной технологии, содержат ~50% фруктозы и менее 1.5% неизвестных олигосахаридов [1]. Методом адаптационной селекции штамма–продукента ГИ *A. nicotianae* БИМ В-5 [2] получен и охарактеризован штамм *A. nicotianae* БИМ В-5-МГ-1 (В-391 Д) [4].

На современном этапе развития молекулярной биологии перспективным направлением является

конструирование рекомбинантных штаммов (табл. 1), в которых на долю продуцируемой глюкозоизомеразы приходится 15–60% суммарного внутриклеточного белка [5–11]. Ген *xyIA*, кодирующий ферментный белок ГИ, выделен, секвенирован и депонирован в базе данных GenBank (код доступа Ay937238), а также клонирован в различных гетерокариотических микроорганизмах, в том числе в *E. coli* BL21 (DE3). Плазмида pET24b*xyIA* обеспечивает синтез ГИ в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* БИМ В-427 Д [12].

Ранее был разработан оригинальный способ иммобилизации нерастущих микроорганизмов путем включения микробной биомассы в структуру ксерогеля диоксида кремния и проведены исследования свойств гетерогенных биокатализаторов, приготовленных на основе штаммов–продукентов глюкозоизомеразы *A. nicotianae* [13, 14].

Цель работы – сравнительные исследования свойств (ГИ-активность и стабильность) гетерогенных биокатализаторов, приготовленных на основе рекомбинантного штамма–продукента глюкозоизомеразы *E. coli* BL21(DE3)/pET24b*xyIA* путем включения микробной биомассы в ксерогель диоксида кремния; подбор оптимальных условий приготовления и состава биокатализаторов, включая относительное содержание всех компонентов и сшивающего реагента.

Таблица 1. Рекombинантные штаммы–продуценты глюкозоизомеразы

Штамм–продуцент (организм–реципиент)	Организм–донор гена <i>xyIA</i>	Глюкозоизомеразная активность		Ссылка
		Е/л культуральной среды	Е/мг белка	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>		0.148	[9]
<i>E. coli</i>	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	40		[6]
<i>E. coli</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	450		[7]
<i>Streptomyces lividans</i> ТК 24	<i>Streptomyces lividans</i>	1570–2440		[10]
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	2100		[8]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/ <i>pET24bxyIA</i>	<i>A. nicotianae</i> БИМ В-5-МГ-1	1600	2.22	[12]

МЕТОДИКА

В работе использовали рекombинантный штамм–продуцент глюкозоизомеразы *E. coli* BL21(DE3)/*pET24bxyIA* (рек-*E. coli*), в котором экспрессия гена глюкозоизомеразы из *A. nicotianae* контролируется *lac*-промотором фага Т7. Глубинное выращивание бактерий рекombинантного штамма проводили на качалке (200 об/мин) в 250 мл колбах Эрленмейера, содержащих 50–100 мл питательной среды в течение 6 ч при 37°C. Состав питательной среды (г/л): пептон ферментативный – 10.0, NaCl – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, канамицин – 0.02. Начальное значение рН 6.85. В качестве посевного материала использовали суспензию бактерий, выращенных на описанной выше среде в течение 18–20 ч при 37°C, в количестве 1 об. % к объему питательной среды (100 мл). В качестве индуктора гена глюкозоизомеразы использовали 0.001%-ную лактозу, которую добавляли через 2 ч от начала культивирования при достижении культурой ранней экспоненциальной фазы роста. По окончании культивирования микробную биомассу собирали в стационарной фазе роста, отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (~10000 г, 15 мин), ресуспендировали в 0.02 М фосфатном буфере, рН 7.0, и использовали в реакции изомеризации фруктозы. Мутность суспензии определяли по величине оптической плотности (ОП) при 590 нм в 1 см кювете. Для расчетов концентрации клеток (г/л) и удельной активности (Е/г) использовали коэффициент, равный 0.32 г/л·ОП ($l = 1$ см). Удельная активность клеток в суспензии составляла $\sim 3000 \pm 1000$ Е/г сухих клеток при 70°C.

Иммобилизацию микроорганизмов и приготовление трехкомпонентных гетерогенных биокатализаторов осуществляли путем включения нерастущих клеток рек-*E. coli* в структуру ксерогеля диоксида кремния. Для этого микробную биомассу (компонент 1) тщательно смешивали с гидрогелем диоксида кремния (компонент 2, SiO₂), полученным из жидкого стекла золь-гель методами, и влажным осадком нерастворимых гидроксосоединений кобальта (компонент 3, Co_xO_y), свежесаженных водным раствором аммиака из растворов нитрата кобальта (II).

При проведении поперечной сшивки раствор бифункционального реагента – глutarового диальдегида (ГА) или карбодиимида (1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодиимид мето-4-толуолсульфонат, КД) добавляли в расчете 20–100 мг реагента на 1 г сухих клеток, но не более 400 мг/г, так как было показано, что ГА уменьшает глюкозоизомеразную активность микробной биомассы. Полученную однородную смесь (1 + 2 + 3) высушивали до суховоздушного состояния (влажность 10–12%), механически размельчали, прессовали при избыточном давлении 150 атм и фракционировали для получения гранул твердого гетерогенного биокатализатора размером от 1 до 4 мм.

Измерения глюкозоизомеразной активности проводили при температурах от 60 до 85°C в среде 0.02 М фосфатного буфера, рН 7.0. В качестве субстрата использовали 0.1–3 М растворы фруктозы. Для определения ферментативной активности в клеточной суспензии в среду добавляли соли Mg²⁺ и Co²⁺ в виде сульфатов в концентрации 1 мМ. При измерении активности гетерогенных биокатализаторов, в состав которых входили нерастворимые гидроксосоединения Со(II), ионы Со²⁺ в реакционную среду не добавляли. Скорость реакции, равную 1 мкмоль/мин, принимали за единицу ферментативной активности (Е). Активность выражали в Е/г сухих клеток или в Е/г биокатализатора для клеток в суспензии и иммобилизованных клеток соответственно. Концентрацию глюкозы, образующейся в реакционной среде при изомеризации фруктозы, определяли с помощью фермента глюкозооксидазы. Экспериментальная ошибка составляла $\leq 15\%$.

Реакцию изомеризации проводили как в периодическом, так и непрерывном режиме.

Периодический процесс. Изомеризацию фруктозы проводили в замкнутой циркуляционной установке, состоящей из: 1) колонного реактора (высота 5 см и диаметр 1 см), заполненного биокатализатором (масса 0.05–0.2 г), 2) смесителя (объем 20 мл) на магнитной мешалке, 3) термостата, поддерживающего заданную температуру реакционной среды в смесителе и в слое биокатализатора, 4) перистальтического насоса, обеспечивающего циркуля-

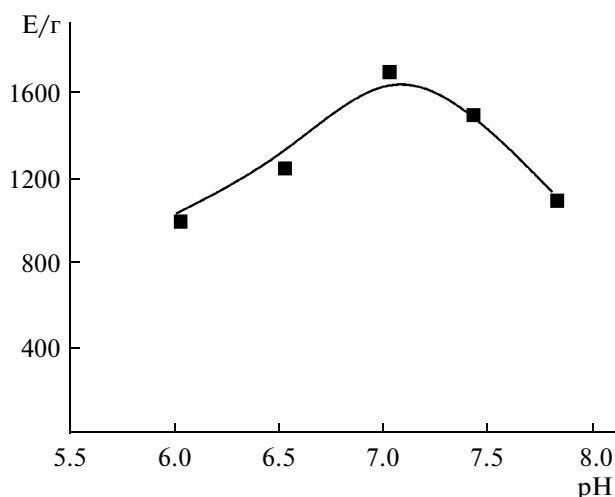


Рис. 1. Зависимость удельной активности (Е/г) рек-*E. coli* в суспензии от рН (70°C, 2 М фруктоза, 0.02 М фосфатный буфер, 1 мМ Mg²⁺, 1 мМ Co²⁺).

цию раствора субстрата (объем 6 мл) через слой биокатализатора (высота 0.1–0.5 см) со скоростью 1.5 мл/мин. Продолжительность одного реакционного цикла составляла от 2 до 8 ч, после чего реакционную смесь удаляли, а биокатализатор промывали дистиллированной водой и буфером, рН 7.0. Для биокатализаторов, в особенности свежеприготовленных, определяли фоновую активность в аликвоте, взятой из смесителя после 2 ч циркуляции реакционной среды через слой биокатализатора. Суммарная скорость реакции (W_{Σ}) складывалась из фоновой активности ($W_{\text{фон}}$) и активности гетерогенного биокатализатора ($W_{\text{ИММ}}$), т.е. $W_{\text{ИММ}} = W_{\Sigma} - W_{\text{фон}}$. Исходя из значения $W_{\text{ИММ}}$, рассчитывали: 1) удельную глюкозоизомеразную активность иммобилизованных клеток, Е/г сухих клеток, 2) активность биокатализатора, Е/г, 3) активность в среде ($W_{\text{среда}} = W_{\text{ИММ}}/V$), которую определяли, как начальную наблюдаемую активность ГИ в расчете на единицу суммарного объема (V) реакционной среды в установке, включая соединения между всеми ее частями (реактор, смеситель, перистальтический насос), Е/мл среды.

Непрерывный процесс. Изомеризацию проводили с использованием реактора идеального вытеснения в виде стеклянной колонки высотой 15 см и диаметром 1 см, заполненной гранулами приготовленного биокатализатора размером 1–4 мм и инертным наполнителем – стеклянными шариками Ø2 мм при соотношении их объемов 1 : 1. Использование наполнителя значительно уменьшало гидродинамическое сопротивление слоя в реакторе. Колоночный реактор помещали в термостат с поддерживаемой температурой $62 \pm 2^\circ\text{C}$, и через неподвижный слой объемом 10 см³ прокачивали сверху–вниз 3 М раствор фруктозы со скоростью 0.02 мл/мин. Периоди-

чески (1 раз в сутки) отбирали пробы на выходе из реактора и анализировали их на содержание глюкозы. Непрерывный процесс характеризовали следующими параметрами: 1) конверсия субстрата (x), 2) время работы биокатализатора в условиях постоянства величины конверсии, близкой к 50%, 3) время полуинактивации ($t_{1/2}$), равное времени, в течение которого конверсия субстрата падала в 2 раза.

Стабильность биокатализаторов определяли при хранении в 0.02 М фосфатном буфере, рН 7.0, а также в сухом виде при 20–22°C.

Для сравнения использовали результаты, полученные для биокатализаторов, приготовленных путем иммобилизации микробной биомассы *A. nicoitiana* в ксерогель диоксида кремния [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная характеристика продуктивности штаммов. Было найдено, что выход ферментного белка у рекомбинантного штамма *E. coli* BL21(DE3)/*pET24bxy1A* на порядок выше, чем у *A. nicoitiana* БИМ В-5-МГ-1, и достигает 1.6 Е/мл, при этом в несколько раз сокращается длительность культивирования. Максимальная доля фермента, синтезированного рекомбинантным штаммом в ответ на введение индуктора (лактоза), составила около 50% суммарного белка клеток.

Свойства клеточносвязанной ГИ в суспензиях. Снижение значения рН для проведения процесса изомеризации моносахаридов является важным параметром для практического применения ГИ. Были проведены исследования по определению рН-оптимума реакции изомеризации в суспензиях рекомбинантного штамма-продуцента и было обнаружено, что для рек-*E. coli* значение рН-оптимума составляет 7.0 (рис. 1), то есть сдвинуто в более кислую область по сравнению с *A. nicoitiana*, для которого рН_{опт} 7.5–7.8 [15]. Дальнейшие исследования с участием рек-*E. coli* были проведены в буферной среде со значением рН 7.0.

Сравнительные исследования свойств фермента в суспензиях штамма–донора *A. nicoitiana* и рекомбинантного штамма *E. coli* показали, что характеристики ферментов были близкими. Так, в изученных условиях значения константы Михаэлиса K_m по фруктозе для изученных штаммов были одинаковыми по величине и приблизительно равными 0.5 М (рис. 2). При повышении температуры начальная скорость реакции изомеризации фруктозы ($W_{t \rightarrow 0}$) увеличивалась линейно (рис. 3). Исследование термостабильности ГИ в суспензиях показало, что при 85°C для рек-*E. coli* полная дезактивация фермента происходила в течение 10–15 мин (рН 7.0), тогда как для *A. nicoitiana* – в течение 3–5 мин (рН 7.8).

При исследовании кинетики реакции изомеризации фруктозы в суспензиях изученных штаммов была обнаружена следующая закономерность: в тех

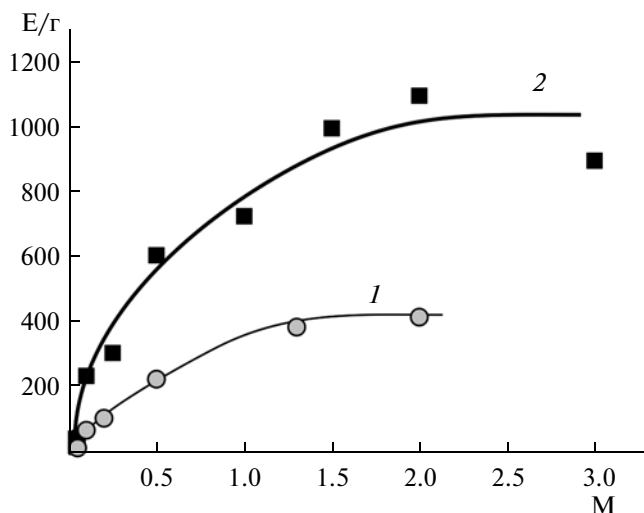


Рис. 2. Кинетика Михаэлиса–Ментен (М) для суспендированных *A. nictotianae* (1) и рек-*E. coli* (2) (70°C, 0.02 М фосфатный буфер, рН 7.8 и 7.0 для *A. nictotianae* и рек-*E. coli* соответственно, 1 мМ Mg^{2+} , 1 мМ Co^{2+}).

случаях, когда начальная ГИ-активность в расчете на единицу объема реакционной среды была высокой ($W_{\text{среда}} \geq 20$ Е/мл), истинное равновесие в реакции, соответствующее образованию эквимольной смеси моносахаридов, $x = 50 \pm 2\%$, устанавливалось достаточно быстро, в течение 1–4 ч (рис. 4, 2, 3). В тех случаях, когда начальная ГИ-активность в реакционной среде была относительно низкой ($W_{\text{среда}} \sim 10$ Е/мл), в системе устанавливалось стационарное состояние, при этом скорость реакции приближалась к нулю, и величина конверсии практически не изменялась в течение 4–6 ч, не превышая 30–40% (рис. 4, 1). Аналогичные результаты описаны в [14] для *A. nictotianae* в иммобилизованном состоянии, где было показано, что установление стационарного состояния в реакционной среде обусловлено протеканием обратной реакции изомеризации продукта. Следовательно, проведение процесса изомеризации моносахаридов в периодическом режиме требует тщательного контроля за величиной ГИ-активности в единице реакционного объема ($W_{\text{среда}}$), иначе требуемая степень конверсии моносахарида, близкая к 50%, не будет достигнута за реальное время реакции.

Оптимальные условия приготовления и состава гетерогенных биокатализаторов. Обнаружено, что оптимальное соотношение компонентов: 1) микробная биомасса, 2) диоксид кремния (SiO_2), 3) нерастворимые гидроксосоединения кобальта (Co_xO_y), в составе биокатализаторов зависит от таксономической принадлежности штамма–продукента ГИ. В данной работе содержание компонента (3) фиксировалось на уровне ~ 20 вес. %, аналогично найденному оптимальному содержанию Co_xO_y в биокатализаторе, приготовленном на основе *A. nictotianae* [14], а соотношение компонентов (1) и (2) варьиро-

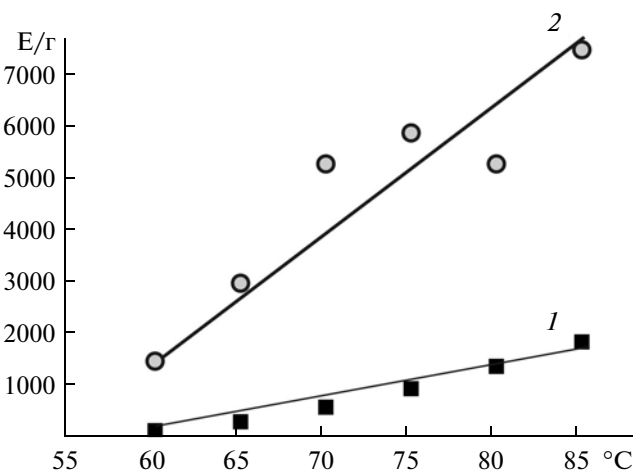


Рис. 3. Зависимость начальной удельной активности (Е/г) в суспензиях *A. nictotianae* (1) и рек-*E. coli* (2) от температуры.

вало в сторону увеличения содержания микробной биомассы рек-*E. coli* для того, чтобы приготовить биокатализатор с максимальной глюкозоизомеразной активностью в виде гранул, устойчивых в реакционной среде, рН 7.0. Обнаружено, что начальная ГИ-активность биокатализаторов не зависела прямо пропорционально от содержания микробной биомассы; так, при увеличении содержания биомассы в 2 и 3 раза ГИ-активность возрастала в 8 и 4 раза соответственно (табл. 2).

При проведении изомеризации фруктозы в периодическом режиме на кривых инактивации биокатализаторов наблюдались 2 участка: начальный участок (после первого цикла) – это резкое падение наблюдаемой скорости реакции, затем в течение 3–7 реакционных циклов скорость реакции падала на 10–20%. Было обнаружено, что в первые 2 ч фоновая активность, $W_{\text{фон}}$, по величине сравнима с суммарной скоростью реакции, W_{Σ} (в присутствии биокатализатора), т.е. $W_{\text{имм}} \approx 0$. В следующем реакционном цикле (продолжительность каждого цикла составляет 2–7 ч) фоновая активность была практически равна нулю ($W_{\text{фон}} \approx 0$), при этом $W_{\Sigma} \approx W_{\text{имм}}$, составляла 40–50% от W_{Σ} , измеренной для свежеприготовленного биокатализатора в первом реакционном цикле. Следовательно, основной причиной резкого падения активности свежеприготовленного биокатализатора являлась десорбция активного компонента из SiO_2 -ксерогеля в реакционную среду, причем этот процесс происходил сравнительно быстро (в первые 2 ч). Слабосвязанный с SiO_2 -матрицей активный компонент, вероятно, представляет собой внутриклеточный белок, вышедший из деформированных клеток при прессовании биокатализаторов. При увеличении количества микробной биомассы время полуинактивации биокатализаторов монотонно падало (табл. 2). При содержании

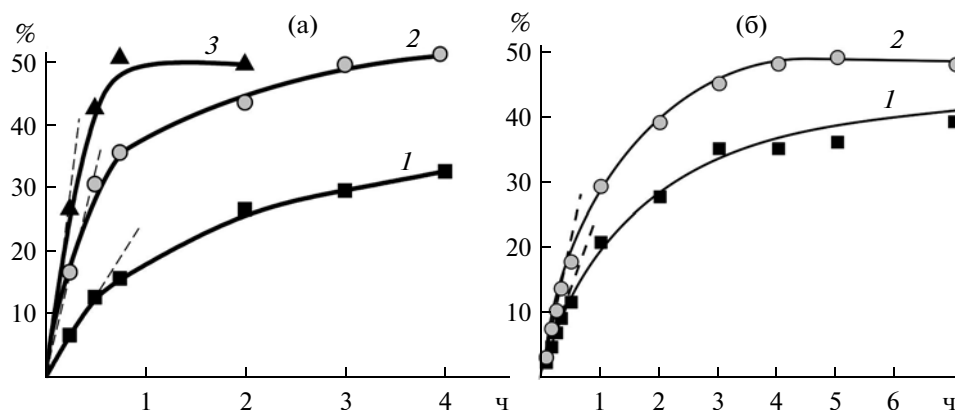


Рис. 4. Зависимость конверсии субстрата (%) от продолжительности реакции изомеризации с участием суспендированных клеток рек-*E. coli* (а) и *A. nictianaе* (б) при различной величине ГИ-активности в среде (Е/мл): а – 1, 2, 3 – 12.6, 26.4 и 60.6 Е/мл соответственно; б – 1, 2 – 13.1 и 19.5 Е/мл соответственно (75°С, 3 М фруктоза, 0.02 М фосфатный буфер, рН 7.0 и 7.8 для рек-*E. coli* и *A. nictianaе* соответственно, 1 мМ Mg²⁺, 1 мМ Co²⁺).

биомассы выше 60 вес. % биокатализаторы не устойчивы в реакционной среде, структура гранул разрушается и, как следствие, уменьшается их механическая прочность, при этом слой биокатализатора образует плотную аморфную массу с высоким гидродинамическим сопротивлением потоку сравнительно вязкого раствора субстрата (3 М фруктоза). Таким образом, оптимальное содержание биомассы рек-*E. coli* в биокатализаторе составляет 40–60 вес. % (для *A. nictianaе* не превышает 15 вес. % [14]).

Для того чтобы уменьшить долю слабосвязанного активного компонента и $W_{\text{фон}}$, была предложена поперечная сшивка микробной биомассы бифункциональными реагентами – глутаровым диальдегидом (ГА) или карбодиимидом, причем порядок до-

бавления реагента в процессе приготовления биокатализаторов варьировали. Биокатализаторы готовили следующим образом: смешивали компоненты 2 и 3, добавляли раствор сшивающего реагента, затем компонент 1 – микробную биомассу. Было найдено, что при иммобилизации без сшивающего реагента сохранялось до 100% от ГИ-активности клеток рек-*E. coli* в суспензии, тогда как при использовании сшивающего реагента в концентрации выше 20 мг/г – не более 20–30% (табл. 2). При замене ГА карбодиимидом стабильность биокатализаторов существенно уменьшалась; так, при сшивке КД значение $t_{1/2}$ минимально (табл. 2). Таким образом, в качестве сшивающего реагента целесообразно использовать глутаровый диальдегид, при этом активность

Таблица 2. Активность и стабильность биокатализаторов в зависимости от их состава и сшивки микробной биомассы бифункциональными реагентами

Биомасса, вес. %	SiO ₂ , вес. %	Co _x O _y , вес. %	Сшивающий реагент, мг/г сухих клеток	Начальная ГИ-активность биокатализатора при 70°С, Е/г	Активность ГИ после иммобилизации, %	$t_{1/2}$ при 70°С, ч
20	60	20	–	70	17	8
40	40			570	70	2
60	20			310	25	3
70	10			255	18	<2
40	40	20	20*	300	100	20
			40*	110	17	65
			100*	100	19	25
			160*	81	15	18
			240*	12	6	22
			400**	72	26	8

* Глутаровый диальдегид (ГА).

** 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодиимид мето-4-толуолсульфонат.

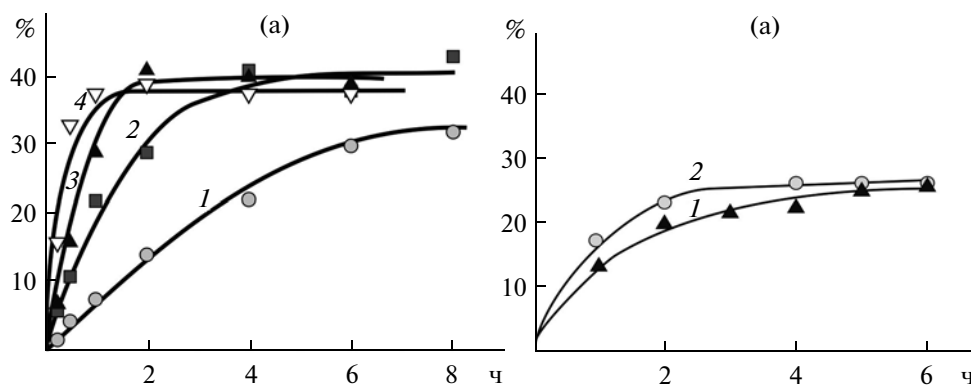


Рис. 5. Зависимость конверсии субстрата (%) от продолжительности реакции изомеризации с участием гетерогенных биокатализаторов на основе рек-*E. coli* (а) и *A. nictotianae* (б) при различной ГИ-активности в среде: а – 1, 2, 3, 4 – 2.7, 8.3, 21.0 и 51.1 Е/мл соответственно; б – 1, 2 – 4.0 и 22.8 Е/мл соответственно (70–75°C, 3 М фруктоза, 0.02 М фосфатный буфер, рН 7.8 и 7.0 для *A. nictotianae* и рек-*E. coli* соответственно, 1 мМ Mg²⁺).

биокатализатора уменьшалась при повышении концентрации ГА, в то же время зависимость стабильности имела оптимум в диапазоне концентраций 20–100 мг ГА/г сухих клеток (табл. 2).

Порядок смешивания компонентов и сшивки реагентом. Свойства биокатализаторов, приготовленных путем добавления микробной биомассы (1) в последнюю очередь к двухкомпонентной однородной смеси (2 + 3), содержащей ГА в оптимальной концентрации (40 мг/г), приведены в табл. 2. Другая методика приготовления биокатализатора была следующей. Сначала смешивали до однородного состояния все компоненты (1 + 2 + 3), затем в последнюю очередь добавляли раствор ГА в оптимальном количестве (40 мг/г). Активность приготовленного биокатализатора была равной ~120 Е/г при 70°C. Третья методика приготовления биокатализатора была следующей. Сначала смешивали компоненты (2 + 3). Микробную биомассу сшивали ГА (20–40 мг/г) и добавляли в полученную ранее двухкомпонентную смесь. Активность приготовленного биокатализатора была равной ~140 Е/г при 70°C. Обнаружено, что порядок смешивания компонентов и сшивки ГА практически не влияет на ГИ-активность биокатализаторов, но оказывает заметный эффект на стабильность приготовленных биокатализаторов; так, для описанных выше способов $t_{1/2}$ при 70°C принимает значения 65, 100 и 45 ч соответственно. Таким образом, оптимальной является методика приготовления, когда глутаровый диальдегид добавляли в смесь компонентов (1 + 2 + 3) в последнюю очередь. Дальнейшие исследования были проведены с участием биокатализаторов, имеющих оптимальный состав и приготовленных оптимальным способом. Следует напомнить, что поскольку Со присутствовал в составе биокатализатора в виде нерастворимых соединений, то ионы Со²⁺ в реакционную среду не добавляли.

Свойства гетерогенных биокатализаторов. При проведении изомеризации фруктозы в периодическом режиме с участием гетерогенных биокатализаторов было обнаружено, что аналогично кинетике, наблюдаемой в клеточных суспензиях рек-*E. coli* (рис. 4а) и *A. nictotianae* (рис. 4б) время достижения стационарного состояния в реакционной среде зависело от величины ГИ-активности в среде (рис. 5).

Основное различие в кинетике, наблюдаемой в суспензиях бактериальных клеток (рис. 4) и в замкнутой циркуляционной установке с реактором, заполненным приготовленными биокатализаторами, заключалось в том, что в гетерогенном режиме не удалось подобрать условий, при которых конверсия субстрата была близкой к 50% (рис. 5). Можно предположить, что из-за изменения локальной концентрации продукта прямой реакции изомеризации (в данной работе глюкоза) в микроокружении клеточносвязанной ГИ истинное равновесие устанавливается только вблизи иммобилизованного фермента. Локальное изменение концентрации глюкозы как продукта реакции изомеризации фруктозы может быть связано либо с диффузионными ограничениями, либо с адсорбцией моносахарида в матрице SiO₂. Физико-химическое исследование текстурных параметров показало, что сухие биокатализаторы, приготовленные на основе *A. nictotianae* и рек-*E. coli*, нанопористые; так, в их структуре поры размером 13 и 19 нм составляют 63 и 46% от общего объема пор соответственно. Было показано, что в изученных условиях для биокатализаторов на основе *A. nictotianae* диффузионные ограничения реакции изомеризации отсутствовали [14]. Следовательно, повышение концентрации продукта реакции в микроокружении клеточносвязанной ГИ обусловлено адсорбцией моносахарида на SiO₂. Действительно, биокатализаторы на основе рек-*E. coli* и *A. nictotianae* отличаются между собой составом – содержанием SiO₂, ~10–20 и ~40–60 вес. % соответственно. Как

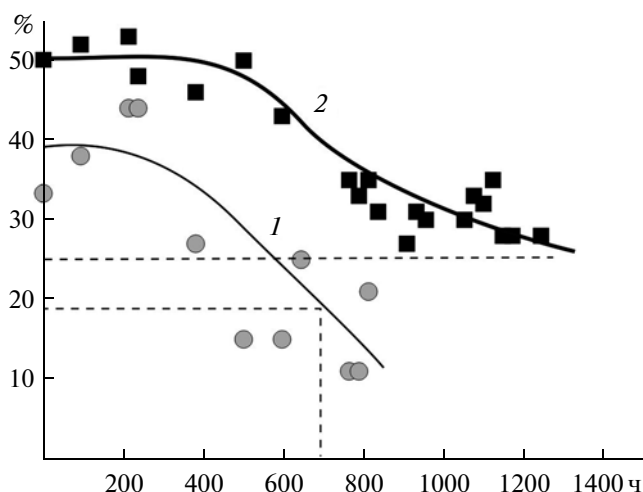


Рис. 6. Изменение конверсии субстрата (%) от продолжительности непрерывного процесса изомеризации с участием биокатализаторов на основе *A. nicotianaе* (1) и рек-*E. coli* (2) (62–65°C, 3 М фруктоза, 0.02 М фосфатный буфер, pH 7.8 и 7.0 для *A. nicotianaе* и рек-*E. coli* соответственно, 1 мМ Mg²⁺).

видно из рис. 5, для данных биокатализаторов независимо от величины $W_{\text{среда}}$ конверсия субстрата составляет 44 ± 3 и $30 \pm 2\%$ соответственно. При работе с биокатализатором типа Sweetzyme, который представляет сшитую ГА и экстрадированную биомассу (отсутствует SiO₂), были найдены условия для достижения конверсии субстрата, равной $50 \pm 3\%$ [14, 15]. Наблюдаемая корреляция между величиной конверсии субстрата и содержанием SiO₂ в различных биокатализаторах указывают на то, что продукт реакции накапливается вблизи клеточносвязанной ГИ за счет адсорбции на кремнегеле. Глюкоза в заметных количествах (~0.1%) была определена в буферном растворе при хранении биокатализатора, тщательно отмытого после проведения реакционного цикла, что также указывало на ее адсорбцию на SiO₂.

Были проведены исследования непрерывного процесса изомеризации фруктозы в колоночном реакторе идеального вытеснения с неподвижным слоем гетерогенного биокатализатора, приготовленного на основе рек-*E. coli* и имеющего оптимальный состав (без сшивки ГА). Из литературы известно, что проведение изомеризации в непрерывном режиме, сопровождающееся удалением продукта из зоны реакции, увеличивает стабильность биокатализаторов, приготовленных иммобилизацией глюкозоизомеразы [16]. В работах [17, 18] также установлено, что субстрат (глюкоза, ГФС) проявлял защитное действие при термоинактивации коммерческих биокатализаторов (Sweetase и Sweetzyme) при 65–80°C.

При непрерывной изомеризации фруктозы в изученных условиях наблюдалась максимальная величина конверсии субстрата, равная $50 \pm 2\%$. Анализ

состава ГФС на выходе из реактора показал, что в течение 30 сут биокатализатор работает без потери первоначальной активности; степень конверсии субстрата остается постоянной (рис. 6). Время полуинактивации для биокатализаторов, приготовленных на основе рек-*E. coli* и *A. nicotianaе*, составляет ~60 и ~25 сут при 62–65°C соответственно (рис. 6).

При хранении биокатализаторов в сухом виде при 20–22°C в течение 8–10 мес обнаружено, что биокатализаторы сохранили 42–56% от их первоначальной активности.

Таким образом, было найдено, что каталитические свойства клеточносвязанной глюкозоизомеразы в суспензиях штаммов-продуцентов – *A. nicotianaе* и рекомбинантного штамма *E. coli*, различаются незначительно. Константы Михаэлиса по фруктозе имеют близкие значения (0.5 М), а pH-оптимум активности ГИ из рекомбинантного штамма сдвигнут в область более кислых pH и составляет 7.0.

Для приготовления стабильных гетерогенных биокатализаторов с глюкозоизомеразной активностью были использованы: 1) оригинальный метод включения нерастущих бактериальных клеток в ксерогель диоксида кремния, 2) рекомбинантный штамм-продуцент ГИ *E. coli* BL21(DE3)/pET24bxy1A. Были подобраны оптимальные условия приготовления и состав биокатализаторов, включая относительно содержание всех компонентов; состав биокатализаторов при соотношении: микробная биомасса : SiO₂ : Co_xO_y, близким к 40 : 40 : 20, является оптимальным; сшивка глутаровым диальдегидом (20–100 мг/г) повышает стабильность биокатализаторов. Глюкозоизомеразная активность биокатализаторов, приготовленных на основе рек-*E. coli*, составила $\sim 100 \pm 30$ Е/г, что в 4–5 раз выше, чем для биокатализаторов, приготовленных на основе *A. nicotianaе*; стабильность биокатализаторов в 2–3 раза соответственно выше в условиях непрерывной изомеризации фруктозы при 62–65°C.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Интеграционного проекта № 96 СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lobanok A.G., Sapunova L.I., Dikhtievski Ya.O., Kazakevich I.O. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. № 2. P. 259–262.
2. Kaneko T., Takahashi S., Saito K. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000. V. 64. № 5. P. 940–947.
3. Bandler R.K., Hess J.M., Epting K.L., Vieille C., Kelly R.M. // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 80. № 2. P. 185–194.
4. Sapunova L.I., Lobanok A.G., Kazakevich I.O., Parakhnya E.V. // Bul. Polish Acad. Sci. 2002. V. 50. № 4. P. 213–222.
5. Шляхотко Е.А., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Коржук А.М., Евтушенко А.Н. // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51. № 4. С. 52.

6. Dekker K.H., Yamagata H., Sakaguchi K., Udaka S. // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. № 2. P. 221–227.
7. Dekker K.H., Yamagata H., Sakaguchi K., Udaka S. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 12. P. 3078–3083.
8. Dekker K.H., Yamagata H., Sakaguchi K., Udaka S. // Agric. Biol. Chem. 1991. V. 55. № 12. P. 2993–2998.
9. Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V. // Microbiol. Rev. 1996. V. 60. № 2. P. 280–300.
10. Wang F., Whitaker R.D., Batt C.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 50. № 1. P. 65–70.
11. Kern F., Tilley E., Hunter I.S., Legisa M., Glieder A. // J. Biotechnol. 2007. V. 129. № 1. P. 6–29.
12. Патент РБ. 2009. № 12214.
13. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Терентьева Т.Г., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Чуенко Т.В., Рудина Н.А., Черняк Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 193–201.
14. Перминова Л.В., Коваленко Г.А., Рудина Н.А., Сапунова Л.И., Тамкович И.О., Лобанок А.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 432–438.
15. Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Казакевич И.О., Шляхотко Е.А., Евтушенко А.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 279–284.
16. Strandberg G.W., Smiley K.L. // Biotechnol. Bioeng. 1972. V. 14. № 3. P. 509–513.
17. Chen K.-Ch., Wu J.-Y. // Biotechnol. Bioeng. 1987. V. 30. № 7. P. 817–824.
18. Converti A., Borghi M.D. // Enzyme Microbiol. Technol. 1997. V. 21. № 4. P. 511–517.

Immobilization of a Recombinant Strain Producing Glucose Isomerase on SiO₂-Xerogel and Properties of Prepared Biocatalysts

G. A. Kovalenko^{a, b}, L. V. Perminova^a, T. V. Chuenko^a, L. I. Sapunova^c,
Ye. A. Shlyakhotko^c, and A. G. Lobanok^c

^a Institute of Catalysis, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia
e-mail: galina@catalysis.ru

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

^c Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, 220141 Belarus

Received June 6, 2010

Abstract—An original method of immobilization of nongrowing microorganism cells on xerogel of silicon dioxide containing insoluble hydroxyl compounds of cobalt(II) has been developed. A recombinant strain producing glucose isomerase has been constructed on the basis of *Escherichia coli* with the use of a gene of *Arthrobacter nicotianae*. It was revealed that glucose isomerase activity and stability of biocatalysts prepared on the basis of the recombinant *E. coli* strain was 3–5 times greater compared with the biocatalysts prepared with the use of the donor strain *A. nicotianae*. Under conditions of continuous hydrolysis of 3 M fructose at 62–65°C in a fixed bed reactor, time of half-inactivation of the biocatalysts prepared from the recombinant strain and *A. nicotianae* was ~60 and ~25 days, respectively.

УДК 579.2:579.26:579.6

АДСОРБЦИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК РОДОКОККОВ В ГИДРОФОБИЗОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ШИРОКОПОРИСТОГО ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО КРИОГЕЛЯ

© 2011 г. М. С. Куюкина*, И. Б. Ившина*, Е. В. Рубцова*, Р. В. Иванов**, В. И. Лозинский**

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

e-mail: kuyukina@iegm.ru

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва

Поступила в редакцию 13.06.2010 г.

Исследован процесс адсорбции клеток *Rhodococcus ruber* на колонках с полиакриламидным криогелем (криоПААГ), частично гидрофобизованным с помощью различного количества (0,2, 1 и 5 мол. %) химически привитых остатков n-додекана. Определены адсорбционная емкость (1.1×10^9 кл./г) гелевого носителя в отношении клеток родококков и оптимальное содержание (1 мол. %) гидрофобизирующих группировок. Посредством респирометрического метода установлены высокая каталитическая активность и функциональная стабильность иммобилизованных бактериальных клеток. Дыхательная активность иммобилизованных родококков в присутствии модельной смеси углеводов нефти на 12–17% превышала соответствующий показатель для свободных клеток. Жизнеспособность адсорбционно закрепленных в гидрофобизованном криоПААГ клеток родококков сохранялась на уровне 93–95% после полугодичного периода хранения. Полученные результаты могут быть использованы при разработке иммобилизованного биокатализатора для направленной трансформации углеводородных соединений и биологической очистки нефтезагрязненной воды.

В настоящее время актинобактерии рода *Rhodococcus* являются одной из наиболее перспективных для биотехнологического использования групп микроорганизмов благодаря высокой активности оксигеназного ферментного комплекса и, следовательно, способности к окислительной трансформации разнообразных природных и антропогенных органических соединений (углеводороды, фенолы, стероиды и др.) [1–3]. Реализация биотехнологического потенциала родококков требует разработки устойчивых биокатализаторов. Эффективным и экспериментально простым способом повышения стабильности биокатализаторов является использование приема адсорбционной иммобилизации бактериальных клеток. Известно, что иммобилизованные микроорганизмы обладают повышенной клеточной стабильностью, ферментативной активностью и устойчивостью к действию неблагоприятных факторов среды (низкие и повышенные температуры, pH, соленость среды, присутствие токсичных ксенобиотиков) по сравнению со свободными клетками [4]. Помимо биологических свойств иммобилизуемых клеток, большое значение для эксплуатационных показателей соответствующей биокаталитической системы имеют характеристики используемого носителя, который должен отвечать определенным требованиям в отношении стабильности, механической прочности, пористости, устойчивости к механическому износу (в случае работы в реакторе с перемешиванием), доступности и т.д. [5]. Перспективными материалами являются

полимерные криогели, которые широко применяются в биотехнологии в качестве носителей иммобилизованных клеток и ферментов, пористых матриц для приготовления иммуносорбентов и хроматографических насадок, подложек для объемного выращивания животных клеток, а также использования в качестве заменителя агарового геля при культивировании микробных и растительных клеток [6]. Важной особенностью строения криогелей является система связанных между собой макропор, что способствует беспрепятственному транспорту питательных веществ и отводу метаболитов [7]. Широкопористый полиакриламидный криогель (криоПААГ) [8] содержит крупные поры сечением примерно от 25 до 250 мкм (в зависимости от температуры криотропного гелеобразования), обладает хорошей механической прочностью, химической стабильностью, а также допускает возможность химических модификаций для придания матрице носителя желаемого комплекса свойств, например введения реакционноспособных группировок для ковалентного присоединения клеток [9] или гидрофобизации адсорбента с целью повышения сродства к клеткам углеводородокисляющих бактерий [6]. Ранее нами [10] была показана принципиальная возможность использования частично гидрофобизованного криоПААГ для избирательной адсорбции клеток родококков из смешанных бактериальных популяций. При этом иммобилизованные клетки проявляли высокую углеводородокисляющую активность. Поэтому необходимо было выявить наи-

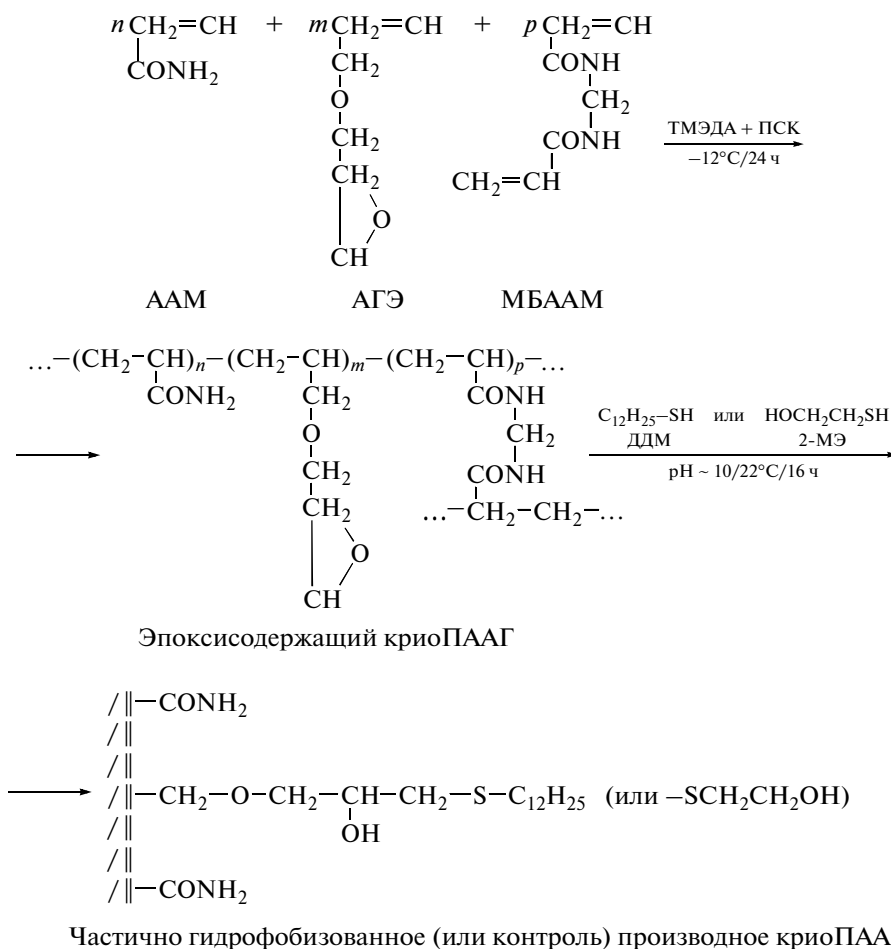


Рис. 1. Схема синтеза частично гидрофобизованных производных криоПААГ и контрольного (гидрофильного) носителя.

более оптимальный вариант системы для иммобилизации таких микроорганизмов.

Цель работы – изучение адсорбции клеток *R. ruber* в колонках с производными криоПААГ, частично гидрофобизованными различным количеством химически привитых остатков n-додекана.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования.

Использовали культуры актинобактерий рода *Rhodococcus*, принадлежащие к видам *R. erythropolis* (16 штаммов), *R. fascians* (8 штаммов), “*R. longus*” (10 штаммов), *R. opacus* (7 штаммов), *R. rhodochrous* (10 штаммов), *R. ruber* (25 штаммов) и поддерживаемые в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (акроним ИЭГМ; #768 во Всемирной Федерации коллекций культур (WFCC); www.iegm.ru/iegmcol). Клетки родококков выращивали в мясопептонном бульоне (“Oxoid”, Великобритания) при 28°C в течение 48 ч на орбитальной качалке (160 об/мин).

Определение степени адгезии клеток родококков к n-гексадекану. Адгезивную активность родококков в отношении n-гексадекана (99.9%, “Sigma”, США) определяли с помощью МАГН-теста (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) [11]. Бактериальную культуру центрифугировали (3000 g, 15 мин) и дважды отмывали буферным раствором следующего состава (г/л): K₂HPO₄ · 3H₂O – 22.2, KH₂PO₄ – 7.26, NH₄NO₃ – 1.8, MgSO₄ · 7H₂O – 0.2, pH 7.1. Клетки ресуспендировали в данном буфере до достижения значения оптической плотности ОП_{600 нм} 0.5 (спектрофотометр Lambda EZ 201, “Perkin Elmer”, США). В обезжиренные пробирки вносили 4.8 мл клеточной суспензии и 1.2 мл n-гексадекана. Содержимое пробирок интенсивно встряхивали в течение 2 мин (Vortex FS 16, “BioSan”, Латвия). После отстаивания смеси в течение 1 сут измеряли оптическую плотность водной фазы при 600 нм. Процент адгезированных клеток определяли по разнице показателя оптической плотности исходной суспензии и таковой после смешивания с углеводородом. Все эксперименты проводили в 6-кратной повторности. В качестве контролей использовали суспензию клеток

без добавления *n*-алкана, а также стерильный буфер с добавлением углеводов.

Синтез частично гидрофобизованных производных криоПААГ. Использовали акриламид (ААМ), аллилглицидиловый эфир (АГЭ), персульфат калия (ПСК), додецилмеркаптан (ДДМ), 2-меркаптоэтанол (2-МЭ) (все “Aldrich”, США); *N,N'*-метиленис-акриламид (МБААМ) и *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (ТМЭДА) (оба “Sigma”, США). Растворы готовили на бидистиллированной воде.

Широкопористый криоПААГ получали в неглубоко замороженной реакционной системе сополимеризацией ААМ, АГЭ и МБААМ при иницировании окислительно-восстановительной парой ТМЭДА+ПСК, после чего осуществляли модификацию носителя по его эпоксидным группировкам обработкой раствором ДДМ (рис. 1). В 118 мл воды растворяли 4.944 г ААМ и 0.36 г МБААМ, охлаждали полученный раствор в ледяной бане до 2–4°C и продували через него аргон в течение 25 мин. Далее прибавляли АГЭ в количестве, отвечающем либо 0.2, либо 1, либо 5 мол. % по отношению к количеству ААМ (0.016, 0.08 и 0.4 мл соответственно), а затем вносили 0.14 мл ТМЭДА и 2 мл водного раствора, содержащего 0.05 г ПСК. Реакционную массу быстро набирали в 5 мл пластиковые шприцы, которые погружали в жидкий азот на 5 с для иницирования кристаллизации льда и потом переносили в камеру прецизионного программируемого криостата FP 45 МН (“Julabo”, Германия), где их выдерживали при –12°C в течение 24 ч. Замороженные препараты оттаивали при комнатной температуре и затем промывали в проточном режиме, пропуская через шприцы по 100 мл дистиллированной воды. Последующую модификацию эпоксисодержащего криоПААГ также осуществляли в проточном режиме, для чего через каждый шприц со столбиком криогеля пассивно пропускали 30 мл водного раствора ТМЭДА (~рН 10), далее 50 мл 1%-ного раствора ДДМ в таком же растворе ТМЭДА и затем инкубировали в стационарном режиме 16 ч при комнатной температуре. Модифицированный широкопористый носитель промывали дистиллированной водой (по 150 мл на колонку).

Для получения контрольных (негидрофобизованных) носителей модификацию эпоксисодержащего криогеля проводили в 1%-ном растворе 2-МЭ (в этом случае в структуру криогеля вводятся гидрофильные гидроксиэтильные группировки) в условиях, аналогичных модификации полимерной матрицы с помощью ДДМ.

Скорость протока (мл/ч) жидкости через криогель определяли по объему дистиллированной воды, прошедшей через колонку за 1 ч при перепаде давления 100 см водяного столба. Для изучения морфологии криогелей соответствующие образцы были синтезированы в виде плоских дисков толщиной 2 мм, которые затем просматривались с помощью оптического микроскопа Eclipse 55i (“Nikon”, Япония),

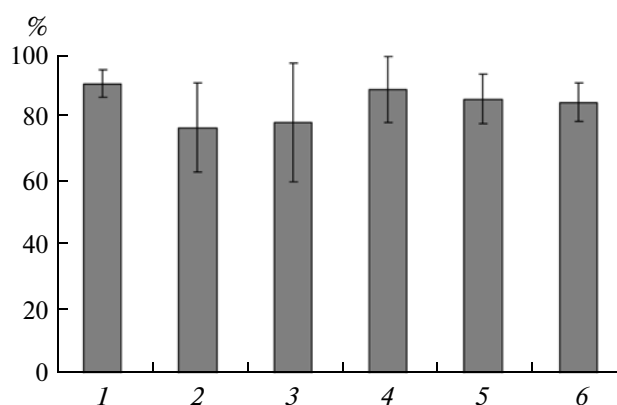


Рис. 2. Степень адгезии (%) клеток актинобактерий рода *Rhodococcus* к *n*-гексадекану (в скобках – число исследованных штаммов): 1 – *R. ruber* (24), 2 – *R. rhodochrous* (7), 3 – *R. erythropolis* (14), 4 – “*R. longus*” (7), 5 – *R. fascians* (6), 6 – *R. opacus* (5). Приведены средние для вида значения степени адгезии.

оборудованного системой цифровой записи изображения.

Адсорбция клеток родококков на колонках с гидрофобизованными производными криоПААГ. Бактериальную культуру центрифугировали при 3000 *g* в течение 15 мин. Клетки дважды отмывали фосфатным буфером следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 3.39; Na_2HPO_4 – 8.90, рН 7.1 и ресуспендировали в данном буфере до достижения оптической плотности D_{600} 0.5 (спектрофотометр Lambda EZ 201, “Perkin Elmer”, США).

Определение сорбционной емкости синтезированных широкопористых носителей в отношении клеток родококков проводили путем пассивного пропускания 150 мл клеточной суспензии через колонку с последующим отмыванием несорбированных клеток фосфатным буфером до достижения $\text{OP}_{600 \text{ нм}}$ элюата, равной нулю. Степень адсорбции клеток родококков вычисляли по разнице D_{600} суспензии клеток до и после прохождения через колонку, учитывая разбавление элюата. В каждом варианте опыта использовали 3 идентичные криоПААГ-колонки с одинаковой степенью гидрофобности (СГ), а также 3 контрольные (обработанные 2-МЭ) криоПААГ-колонки.

Оценка жизнеспособности и каталитической активности иммобилизованных и свободных клеток. Определение числа жизнеспособных иммобилизованных клеток родококков проводили модифицированным методом [12]. В колонки с адсорбированными клетками вносили 4.5 мл 0.2%-ного водного раствора йоднитротетразолия фиолетового (ИНТ) (“Sigma”, США). Через несколько минут наблюдали появление красно-фиолетового окрашивания в результате восстановления ИНТ до нерастворимого в воде формазана. Для полного восстановления красителя колонки инкубировали при комнатной тем-

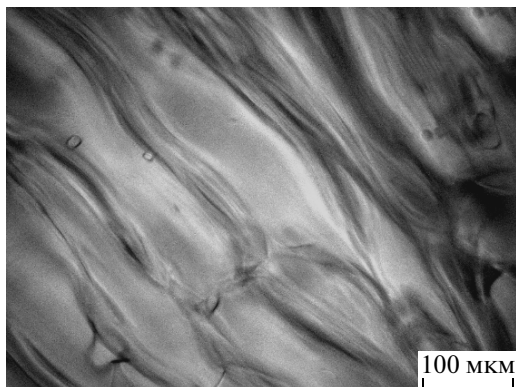


Рис. 3. Микрофотография (оптический микроскоп Eclipse 55i, “Nikon”, Япония) контрольного (негидрофобизованного) образца криоПААГ, сформированного в виде диска толщиной 2 мм. Хорошо видна широкопористая структура гелевого матрикса.

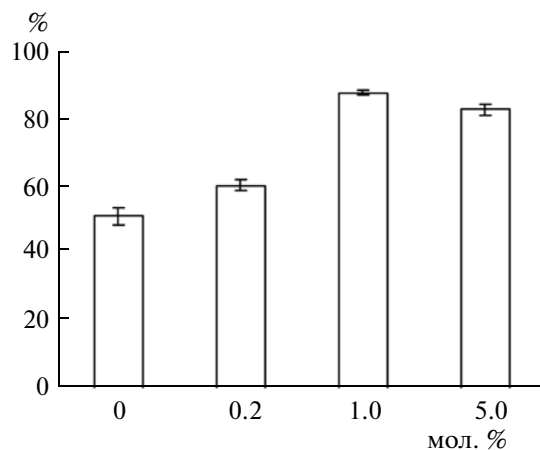


Рис. 4. Адсорбция клеток (%) *R. ruber* ИЭГМ 231 на криоПААГ-колонок с различной СГ (содержание додецильных заместителей: 0, 0,2, 1,0 и 5,0 мол. %). Приведены средние данные 3 параллельных экспериментов с использованием аналогичных колонок.

пературе в течение 1 сут. Окрашенные криогели осторожно переносили из колонок в 100 мл колбы Эрленмейера, измельчали металлическим шпателем и заливали 75 мл этилацетата (ч.д.а., “Компонент-Реактив”, Москва). Для полной экстракции формазана содержимое колб подвергали УЗ-обработке (Soniprep 150, “SANYO”, Япония) в течение 20 мин и инкубировали при 28°C на орбитальной качалке (160 об/мин) в течение 1 сут. Экстракцию формазана повторяли 2–3 раза до обесцвечивания этилацетата. Полученные из одной колбы экстракты объединяли и определяли ОП_{480 нм}. Число жизнеспособных клеток родококков рассчитывали по калибровочному графику зависимости ОП_{480 нм} раствора формазана от концентрации клеток, определенной высевом на МПА.

Хранение клеток родококков, заключенных в гидрофобизованные производные криоПААГ, осуществляли при +5°C. Число жизнеспособных клеток определяли сразу после иммобилизации и после 6 мес хранения.

Каталитическую активность и функциональную стабильность иммобилизованных клеток родококков определяли с помощью 6-канального респирометра Columbus Micro-Oxymax® (“Columbus Instruments”, США). Оценивали скорость дыхания (мкл/мин), а также количество потребленного кислорода и углекислого газа (мкл) иммобилизованными и свободными клетками родококков в присутствии модельной нефти, в качестве которой [13] использовали 2%-ную водную эмульсию смеси углеводородов (н-декан, н-ундекан, н-додекан, н-тетрадекан, н-гексадекан, н-гептадекан, н-нонадекан – по 12%, пристан – 6%, нафталин, аценафтен, фенантрен, антрацен – по 2%), стабилизированную 0,1%-ным раствором Твин-60. Углеводородную эмульсию подвергали УЗ-обработке (Soniprep

150, “SANYO”, Япония) в течение 2 мин и вносили в криоПААГ-колонки с иммобилизованными клетками родококков. Параллельно в пробирках, одинаковых по размеру с колонками, готовили клеточные суспензии родококков в углеводородной эмульсии таким образом, чтобы концентрация свободных клеток была равной концентрации иммобилизованных клеток в соответствующей криоПААГ-колонке. Колонки и пробирки с клеточными суспензиями помещали в камеры респирометра и проводили измерение клеточного дыхания при 28 ± 1°C каждые 42 мин в течение 1–5 сут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно [11], что адгезия микроорганизмов к жидким углеводородам, т.е. способность аккумулироваться на разделе фаз “вода–масло”, определяется гидрофобными свойствами их клеточной поверхности. Поэтому определение показателя микробной адгезии к углеводородам в МАТН-тесте часто используется в качестве простого и экспрессного метода оценки СГ микробных клеток [14]. Результаты определения адгезивной активности клеток родококков различных видов в отношении н-гексадекана (рис. 2) свидетельствуют о высокой (>60%) степени их адгезии к углеводороду, характерной практически для всех исследуемых представителей рода *Rhodococcus*. При этом максимальные значения (80–98%) показателя адгезии к н-гексадекану наблюдались у представителей видов *R. ruber*, “*R. longus*”, *R. fascians* и *R. opacus*. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее [10] и литературными [15–17] данными о повышенном по сравнению с другими бактериями средстве клеток родококков к гидрофобным субстратам. Так, при росте родококков на средах с жидкими и газообразными углеводородами

родами индуцируется избыточный синтез липидных компонентов клеточной стенки [18], что способствует гидрофобизации клеточной поверхности и, как следствие, возрастанию степени адгезии клеток к углеводородным субстратам.

На основании полученных результатов по адгезии нами [10] был предложен метод селективного выделения клеток родококков из смешанных микробных популяций с использованием сорбционной колонки на основе криоПААГ. В качестве гидрофобизирующих группировок для увеличения сродства клеток родококков к криоПААГ в структуру гидрофильного носителя реакцией с додециловым альдегидом вводились остатки *n*-додекана, способствующего значительной (96%) степени адгезии [10] и относительно нетоксичного для бактериальных клеток [19]. В настоящем исследовании с целью повышения числа адсорбированных на гелевом носителе клеток родококков испытаны криоПААГ-колонки с различной СГ, для чего были синтезированы широкопористые носители, содержащие 0.2, 1 и 5 мол. % эпоксидных звеньев, по которым далее осуществлялась прививка додецильных остатков с помощью ДДМ (рис. 1).

Поскольку криоПААГ и его частично гидрофобизованные производные обладают системой взаимосвязанных крупных пор (рис. 3), то такие носители, сформированные в виде непрерывной пористой насадки непосредственно внутри колонки, свободно пропускают не только жидкие среды [20], но и суспензии клеток [6, 7], что позволяет проводить адсорбционную иммобилизацию в проточном режиме без необходимости “изготовления” гранулированного носителя или измельчения цельного блока. У полученных в настоящей работе колонок с криоПААГ скорость протока воды составляла 410 ± 10 мл/ч при перепаде давления 100 см водяного столба.

Анализ влияния степени гидрофобизации носителя на адсорбцию бактерий показал (рис. 4), что число прочно закрепленных (не отмываемых фосфатным буфером) клеток родококков возрастало на 30% при повышении содержания остатков *n*-додекана в криоПААГ от 0.2 до 1 мол. % и достигало 89% адсорбированных клеток (1.12×10^9 кл./г носителя). Данный показатель в 1.7 раз превышал контрольное значение (степень адсорбции родококков на негидрофобизованной криоПААГ-колонке составляла 52%). В то же время дальнейшее повышение СГ криогеля (до 5 мол. % привитых додецильных группировок) не приводило к увеличению числа адсорбированных клеток (1.06×10^9 кл./г носителя), что свидетельствует о достижении максимальной сорбционной емкости такого гидрофобизованного носителя в отношении клеток *R. ruber*.

Аналогичный эффект наблюдался нами ранее [21] при избыточной гидрофобизации носителя на основе древесных опилок, приводящей к снижению числа иммобилизованных клеток родококков, что наглядно свидетельствует о необходимо-

Эффективность десорбции (%) клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 из гидрофобизованных криоПААГ-колонок

Десорбирующий агент, раствор	КриоПААГ с содержанием додецильных группировок, мол. %			
	0	0.2	1.0	5.0
1 М NaCl	0	0	0	0
Этанол, 20%-ный	0.9	1.7	1.1	2.3
Твин-80, 0.1%-ный	29.1	24.4	3.4	0.9
Твин-80, 1%-ный	38.1	26.6	5.0	2.0

сти оптимизации СГ носителей, которые используются для адсорбционной иммобилизации микроорганизмов, основанной на гидрофобных взаимодействиях клеток с поверхностью носителя. Наблюдаемая в контрольном (негидрофобизованном) криогеле адсорбция клеток, по-видимому, объясняется морфологическими особенностями родококков (палочковидные клетки длиной до 15 мкм, наличие выростов клеточной стенки [22]). Таким образом, умеренная гидрофобизация криоПААГ способствовала существенному (на 37%) увеличению числа адсорбированных клеток родококков, что свидетельствует о важной роли гидрофобных взаимодействий в процессе адсорбции данных бактерий.

Промывание колонок с иммобилизованными клетками родококков 1 М NaCl и 20%-ным этанолом не приводило к десорбции прикрепленных клеток (таблица), однако родококки частично вымывались 0.1- и 1%-ными растворами Твин-80. При этом эффективность десорбции клеток зависела в большей степени от гидрофобности носителя, чем от концентрации раствора Твин-80. Так, из колонки с наименее гидрофобным криоПААГ вымывалось 24–27% адсорбированных клеток, а из более гидрофобизованных носителей – всего 1–5%, что

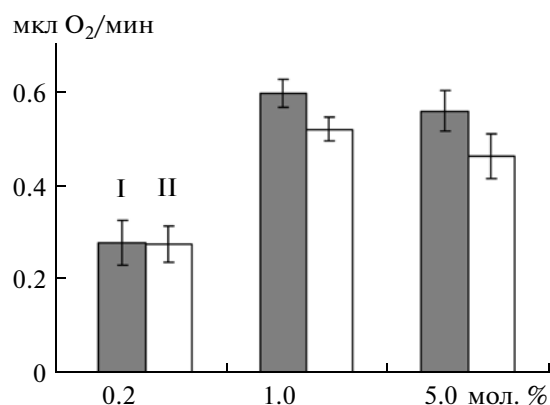


Рис. 5. Скорость потребления кислорода адсорбированными на гидрофобизованных криоПААГ-колонках (I) и свободными (II) клетками родококков в присутствии модельной нефти: криоПААГ с содержанием додецильных группировок (0.2, 1.0 и 5.0 мол. %). Представлены средние значения измерения скорости дыхания за 5 ч.

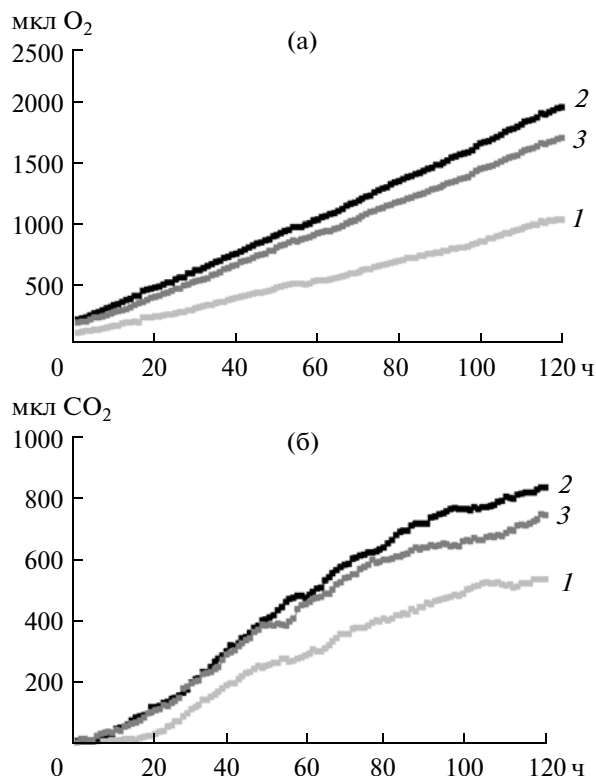


Рис. 6. Динамика потребления O₂ (а) и выделения CO₂ (б) адсорбированными на гидрофобизованных криоПААГ-колонках клетками родококков в присутствии модельной нефти: криоПААГ с содержанием додецильных группировок: 0.2 (1), 1.0 (2), 5.0 мол. % (3).

указывало на более сильное удерживание гидрофобных клеток *R. ruber*. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований по оптимизации процедуры десорбции клеток родококков из криоПААГ-колонок с учетом гидрофобной природы их взаимодействия с гелевым носителем.

Дыхательную активность можно рассматривать как показатель жизнеспособности бактериальных клеток и интенсивности протекающих в них метаболических процессов [23]. Нами при изучении процесса дыхания клеток *R. ruber* ИЭГМ 231, адсорбированных на гидрофобизованных производных криоПААГ, показано (рис. 5), что наиболее высокая скорость потребления O₂ в присутствии модельной нефти наблюдалась у родококков на колонке с криоПААГ, модифицированным 1 мол. % додецильных группировок, что совпадало с наибольшей концентрацией иммобилизованных на данном носителе клеток (рис. 4). Замечено также, что скорость потребления O₂ адсорбированными бактериальными клетками на 12–17% превышала таковую свободных клеток. Это было выявлено для криоПААГ с содержанием 1 и 5 мол. % гидрофобных заместителей. Поскольку в экспериментах по измерению интенсивности дыхания использовали равное количество

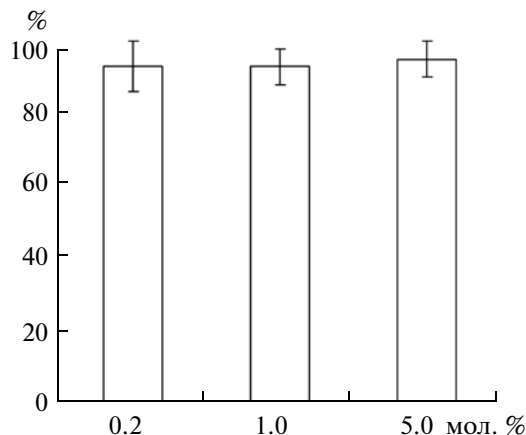


Рис. 7. Жизнеспособность (%) адсорбированных на гидрофобизованных криоПААГ-колонках клеток родококков после полугодового хранения: криоПААГ с содержанием додецильных группировок (0.2, 1.0 и 5.0 мол. %). Приведены средние данные 3 параллельных экспериментов с использованием аналогичных колонок.

клеток в криоПААГ-колонках и соответствующих клеточных суспензиях, выявленный факт, вероятно, объясняется повышенной метаболической активностью закрепленных в криогеле клеток родококков. В обзоре [4] обсуждаются возможные механизмы повышения метаболической активности иммобилизованных микроорганизмов, обусловленные модификацией микроокружения клеток, изменением их морфологии, повышенной стабильностью плазмид, а также устойчивостью к негативным внешним воздействиям. Очевидно, адсорбированные в криоПААГ клетки родококков более устойчивы к токсическому действию углеводов, входящих в состав модельной нефти, чем свободные клетки. Ранее нами было показано [24], что клетки родококков, иммобилизованные в криогеле поливинилового спирта, в 2.4 раза эффективнее окисляли *n*-гексадекан по сравнению с клеточными суспензиями.

Динамика дыхательной активности иммобилизованных клеток *R. ruber* в присутствии углеводов нефти (рис. 6) характеризовалась стабильным потреблением O₂ и выделением CO₂ в течение всего срока наблюдений (120 ч), что указывало на функциональную стабильность закрепленных в криоПААГ клеток родококков. Более того, жизнеспособность иммобилизованных клеток родококков после длительного (0.5 г) периода хранения составляла 93–95% (рис. 7).

Таким образом, на основании полученных данных показана перспективность использования гидрофобизованного носителя на основе криоПААГ для иммобилизации и концентрирования клеток родококков. Определено оптимальное содержание (1 мол. %) додецильных заместителей в данном широкопористом носителе, обеспечивающее наибольшую адсорбционную емкость системы в отношении

углеводородоокисляющих родококков. Выявлена высокая каталитическая активность и функциональная стабильность закрепленных в частично гидрофобизованном криоПААГ клеток родококков. Показана возможность длительного хранения иммобилизованных клеток без потери их жизнеспособности. Полученные данные могут быть использованы при разработке эффективного биокатализатора для направленной трансформации углеводородных соединений и биоочистки нефтезагрязненной воды.

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ “Ведущие научные школы” НШ-64403.2010.4 и Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ivshina I.B.* // WFCC Newslett. 2001. № 33. P. 8–14.
2. *Van der Geize R., Dijkhuizen L.* // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. № 3. P. 255–261.
3. *Ившина И.Б., Гришко В.В., Ноговицина Е.М., Кукина Т.П., Толстиков Г.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 626–633.
4. *Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T.* // J. Ind. Microbiol. 1996. V. 16. № 2. P. 79–101.
5. *Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д.* Иммобилизованные клетки микроорганизмов. 2-е изд. М.: МГУ, 1994. 288 с.
6. *Лозинский В.И.* // Изв. РАН. Сер. хим. 2008. № 5. С. 996–1013.
7. *Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B.* // Trends Biotechnol. 2003. V. 21. № 10. P. 445–451.
8. *Лозинский В.И., Корнеева М.Н., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270. № 1. С. 101–104.
9. *Луста К.А., Старостина Н.Г., Горкина Н.Б., Фихте Б.А., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1988. Т. 24. № 4. С. 504–513.
10. *Kuyukina M.S., Rubtsova E.V., Ivshina I.B., Ivanov R.V., Lozinsky V.I.* // J. Microbiol. Methods. 2009. V. 79. № 1. P. 76–81.
11. *Rosenberg M.* // FEMS Microbiol. Lett. 1984. V. 22. № 3. P. 289–295.
12. *Wrenn B.A., Venosa A.D.* // Can. J. Microbiol. 1996. V. 42. № 3. P. 252–258.
13. *Walker J.D., Colwell R.R.* // Appl. Environ. Microbiol. 1974. V. 27. № 6. P. 1053–1060.
14. *Rosenberg M.* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 262. № 2. P. 129–134.
15. *Bouchez-Nantali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.-P.* // J. Appl. Microbiol. 1999. V. 86. № 3. P. 421–428.
16. *Dorobantu L.S., Yeung A.K.C., Foght J.M., Gray M.R.* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 10. P. 6333–6336.
17. *Hamada T., Sameshima Y., Honda K., Omasa T., Kato J., Ohtake H.* // J. Biosci. Bioeng. 2008. V. 106. № 4. P. 357–362.
18. *Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рычкова М.И., Чумаков О.Б.* // Микробиология. 2000. Т. 69. № 1. С. 62–69.
19. *Sikkema J., de Bont J., Poolman B.* // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. № 2. P. 201–222.
20. *Lozinsky V.I., Vainerman E.S., Ivanova S.A., Titova E.F., Shtil'man M.I., Belavtseva E.M., Rogozhin S.V.* // Acta Polymerica. 1986. Т. 37. № 3. С. 142–146.
21. *Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivorutchko A.V., Philp J.C., Cunningham C.J.* // Biores. Technol. 2008. V. 99. № 6. P. 2001–2008.
22. *Ившина И.Б., Бердичевская М.В., Зверева Л.В., Рыбалка Л.В., Еловицкая Е.А.* // Микробиология. 1995. Т. 64. № 4. С. 507–513.
23. *Steininger C., Allerberger F., Gnaiger E.* // J. Antimicrob. Chemother. 2002. V. 50. № 4. P. 517–523.
24. *Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Gavrin A.Yu., Podorozhko E.A., Lozinsky V.I., Jeffree C.E., Philp J.C.* // J. Microbiol. Methods. 2006. V. 65. № 3. P. 596–603.

Adsorptive Immobilization of Rhodococcal Cells in Hydrophobized Derivatives of Wide-Pore Polyacrylamide Cryogel

M. S. Kuyukina^a, I. B. Ivshina^a, E. V. Rubtsova^a, R. V. Ivanov^b, and V. I. Lozinsky^b

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division, Russian Academy of Sciences, ul. Goleva 13, Perm, 614081 Russia

e-mail: kuyukina@iegm.ru

^b Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 28, Moscow, 119991 Russia

Received June 13, 2010

Abstract—Adsorption of *Rhodococcus ruber* cells on columns with polyacrylamide cryogel (CryoPAAG) partially hydrophobized by different quantities (0.2, 1, and 5 mol %) of chemically grafted n-dodecane residues has been studied. The adsorption capacity (1.1×10^9 cells/g) of gel carrier for rhodococcal cells and the optimal content (1 mol %) of hydrophobizing groups were determined. The respirometric method showed the high catalytic activity and functional stability of immobilized bacterial cells. Respiratory activity of immobilized rhodococci in the presence of a model mixture of oil hydrocarbons exceeded the respective parameter for free cells by 12–17%. Viability of rhodococcal cells adsorptionally fixed in hydrophobized cryoPAAG was maintained at a level of 93–95% after a half-year period of storage. The results may be used for development of immobilized biocatalyst for directed transformation of hydrocarbon compounds and biological purification of oil-polluted water.

УДК 582.282

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ–ПРОДУЦЕНТОВ L-АСПАРАГИНАЗ

© 2011 г. М. В. Покровская, В. С. Покровский, Н. Н. Соколов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН Москва, 119121

e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.05.2010 г.

Разработан специфический, быстрый и простой метод выявления активных продуцентов L-аспарагиназы на твердой среде с использованием дифференциальной среды на основе LB или M9 с 1.5% агара. Каждые 100 мл среды LB или M9 дополнительно содержали 6–7 мл глицерина, 4 г L-аспарагина и 0.2 г CaCO₃, а также диагностические компоненты – 3 мл 0.2 М CuSO₄ · 5H₂O и 2.5 мл 0.1 М K₃Fe(CN)₆, pH 7.6–7.8. Результаты учитывали через 12–20 или 24–48 ч роста штамма при 37°C на соответствующих средах. Красный цвет колоний и окрашенная зона вокруг них указывали на способность исследуемого штамма разрушать аспарагиновые комплексы. Рекомендуемый метод позволяет выявлять штаммы бактерий, продуцирующих L-аспарагиназу с удельной активностью не менее 0.1–3.0 МЕ/мг белка.

L-аспарагиназы (L-аспарагин амидогидролазы, КФ 3.5.1.1) катализируют расщепление L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Некоторые из них, например, аспарагиназы природных штаммов *Escherichia coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) используются в клинической онкологии для лечения острых лимфобластных лейкозов. В последние годы появились сообщения об эффективности L-аспарагиназы при лечении НК/Т-клеточной и кожной Т-клеточной лимфом [1–3].

Повышение эффективности производства препаратов бактериальных L-аспарагиназ возможно путем создания рекомбинантных штаммов–супер-продуцентов. В частности, в последние годы получены рекомбинантные аспарагиназы *Erwinia carotovora*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pyrococcus furiosus* и др. [4–7]. В то же время при получении рекомбинантных продуцентов или мутациях в процессе пассирования возможно появление смешанных культур, что определяет необходимость отбора чистой наиболее активной культуры [8, 9].

В настоящее время стандартным методом определения активности L-аспарагиназ является фотометрический метод, основанный на качественной и количественной оценке выделяющегося аммиака при гидролизе аспарагина реактивом Несслера [10]. Менее широкое распространение получило спектрофотометрическое определение, требующее использования очищенного фермента [11]. Оба метода позволяют определять активность только в жидкой среде, что затрудняет отбор отдельных клонов. При этом для выделения чистых культур пользуются почти исключительно методом поверхностных расщепов на пластинчатом агаре в чашках Петри, т.е. на твердой среде.

Применение нами твердой дифференциальной среды Эндо, а также среды LB, содержащей различные индикаторы (бромтимоловый синий, метило-

вый красный, бромкрезоловый пурпурный, бромфеноловый синий), не дало воспроизводимых результатов. Метод определения L-аспарагиназной активности штаммов на твердой среде [12], основанный на применении синтетической среды с феноловым красным, недостаточно специфичен, поскольку учитываются не непосредственно результаты разрушения L-аспарагина, а изменение pH среды. Кроме того, синтетическая среда может оказаться неполноценной для роста ауксотрофных микроорганизмов, что может привести к потере активного продуцента.

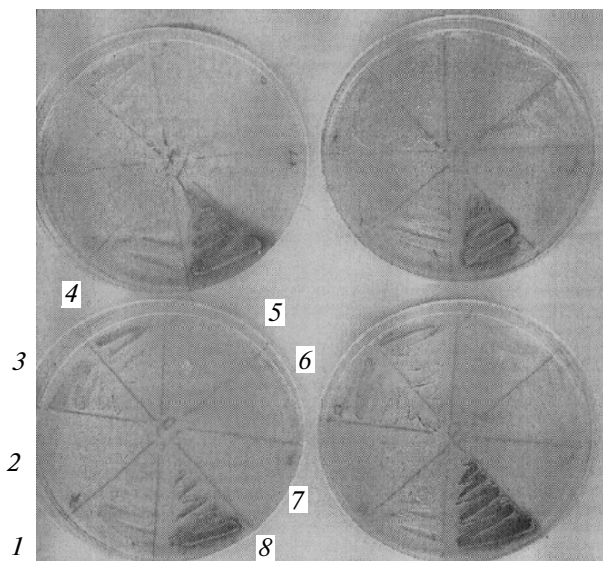
Таким образом, необходимость создания метода выявления наиболее активных штаммов при выращивании на твердой среде обусловлена сложностью либо недостаточной специфичностью существующих технологий отбора штаммов–продуцентов L-аспарагиназы. Метод может быть востребован для экспресс-оценки L-аспарагиназной активности новых рекомбинантных продуцентов или для выделения отдельных клонов из смешанных культур.

Цель работы – создание нового специфического и простого способа выявления бактерий с L-аспарагиназной активностью.

МЕТОДИКА

Реактивы: бакто-триптон и бакто-дрожжевой экстракт (“Fluka”, Швейцария), бакто-агар (“Ferak”, Германия), глицерин, NaCl, NH₄Cl, CuSO₄ · 5H₂O, K₃Fe(CN)₆, MgSO₄ · 7H₂O и CaCl₂ (“Sigma-Aldrich”, США), Na₂HPO₄ и KH₂PO₄ (“Serva”, Германия), L-аспарагин (“Reanal”, Венгрия), глюкоза (“Panreac”, Испания), CaCO₃ (“Реахим”, Россия).

Среды. В качестве модифицируемых сред использовали стандартные среды LB и M9 с добавлением 1.5% агара [13, 14]. К 100 мл автоклавирован-



Рост штаммов на дифференциальных средах: 1 – *E. coli* XL-blue, 2 – *Lactobacillus plantarium*, 3 – *Erwinia carotovora*, 4 – *Bacillus subtilis*, 5 – *B. megaterium*, 6 – *E. coli* BL-21 (DE3), 7 – *E. coli* DH-52, 8 – *E. coli* BL-21(DE3)/pACYC177-LANS.

ной среды LB или M9, содержащей 0.2 г CaCO_3 , pH 7.6–7.8; добавляли 6–7 мл глицерина, 4.0 г аспарагина и доводили до кипения. Затем среду остужали до 40–50°C и в качестве диагностических компонентов вносили последовательно 3.0 мл 0.2 М $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 2.5 мл 0.1 М $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. После добавления каждого компонента смесь тщательно перемешивали. Автоклавирование питательных сред и растворов проводили в стандартных условиях. При необходимости в среду вносили антибиотики и индукторы, например, L-арабинозу до 0.0015 М или изопропил- β -D-тиогалактопиранозид до 0.001 М. Среду разливали в чашки Петри и подсушивали в течение 20 мин.

Приготовленная горячая среда имела зеленый цвет, холодная приобретала голубоватый оттенок. Покрасневшая среда вследствие неспецифического выпадения осадка $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ для диагностических целей непригодна. Герметично закрытые чашки с готовой средой могут храниться при комнатной температуре в течение 2 нед.

Контрольные чашки содержали среду LB (M9), агар и аспарагин; среду LB (M9), агар, аспарагин и сульфат меди; среду LB (M9), агар, аспарагин и гексацианоферрат калия.

Исследуемые микроорганизмы. Для тестирования сред из коллекции ИБМХ РАН были отобраны рекомбинантные штаммы *E. coli* с высокой L-аспарагиназной активностью (от 12 до 34 МЕ/мг белка): BL-21(DE3)/pBAD/ECARLANS (*E. coli*/pBAD) и BL-21(DE3)/pACYC177-LANS (*E. coli*/pACYC); стандартные генетически модифицированные штаммы *E. coli*, используемые в биотехнологии с низкой L-аспарагиназной активностью (до 10 МЕ/мл белка): DH-52, MC 1061, BL-21(DE3); а также природные штаммы: *Lactobacillus plantarium*,

Lactobacillus casei var. *rhamnosus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* и *Erwinia carotovora* N1 (коллекция микроорганизмов БГУ, Минск) с активностью 0.003–0.007 и 0.1–0.3 МЕ/мг белка, соответственно.

Условия выращивания микроорганизмов. Исследуемые штаммы выращивали на среде LB со скоростью перемешивания 180 об/мин при 37°C до D_{600} 1.5–2.0 ОЕ. После стандартных 10-кратных разведений бактериальную культуру шпателем или петлей высевали на поверхность приготовленной диагностической среды. Посевы выдерживали в термостате при 37°C в течение 12–20 ч (среда на основе LB) или 24–48 ч (среда на основе M9), после чего результаты учитывали по окраске выросших колоний.

Определение активности L-аспарагиназы. Результаты, полученные при изучении использованных сред, были сопоставлены с данными стандартного метода с использованием реактива Несслера [10]. За единицу активности L-аспарагиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует высвобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице сопоставлены результаты оценки L-аспарагиназной активности штаммов с применением предлагаемого метода с данными, полученными при использовании стандартного метода с реактивом Несслера (метод прямой несслеризации) [10]. Видно, что окрашивание колоний коррелирует с активностью штамма, определенной при помощи стандартного метода. Штаммы, демонстрирующие невысокую активность, окрашивались в розовый цвет. Рекомбинантные штаммы *E. coli* BL-21(DE3)/pBAD/ECARLANS и *E. coli* BL-21(DE3)/pACYC177-LANS, активность которых составила 28 и 34 МЕ/мг белка, соответственно, были ярко красными. Розовое окрашивание колоний *E. coli* JM-109, обладающих невысокой активностью, возможно, связано с особенностями метаболизма штамма. Колонии *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*, *Bacillus subtilis* и *B. megaterium* с активностью 0.007 МЕ/мг белка оставались неокрашенными при любых сроках инкубации (рисунок). Контрольные чашки на протяжении всех опытов оставались зеленовато-серыми или желтыми без очагов покраснения.

Метод основан на известной способности аспарагина и аспарагиновой кислоты образовывать прочные цветные комплексы с металлами (Cu, Ni, Co) и получения ярко окрашенных продуктов разложения этих комплексов при взаимодействии с гексацианоферратом калия [15]. Выявление активных продуцентов L-аспарагиназы основано на образовании красных комплексов меди с анионом гексацианоферрата при ферментативном разрушении синих комплексов с L-аспарагином и L-аспарагиновой кислотой. Использование солей Ni или Co менее информативно из-за слабого внешнего эффекта (неяркие продукты реакции).

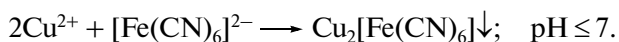
Сравнительная характеристика штаммов микроорганизмов на дифференциально-диагностической среде

Тестируемый штамм	Цвет отдельных колоний	Время инкубации**		Активность, с реактивом Несслера, МЕ/мг белка
		среда на основе М9	среда на основе LB	
<i>E. coli</i> BL-21(DE3)/pBAD/ECARLANS	Красный с индукцией, розовый без индукции	24	12–15	28.0
<i>E. coli</i> BL-21(DE3)/pACYC177-LANS	Красный с индукцией и без индукции*	24	13–16	34.0
<i>E. coli</i> XL-blue	Розовый	48	16–18	4.3
<i>E. coli</i> BL-21 (DE3)	Розовый	48	16–18	5.2
<i>E. coli</i> DH-52	Розовый	48	16–18	3.4
<i>E. coli</i> MC 1061	Розовый	48	16–18	3.2
<i>E. coli</i> JM-109	Розовый	48	16–18	0.12
<i>Bacillus megaterium</i>	Белый	48	48	0.007
<i>B. subtilis</i>	Белый	48	48	0.006
<i>Erwinia carotovora</i>	Белый	48	48	0.3
<i>Lactobacillus plantarium</i>	Белый	48	48	0.003
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i>	Белый	48	48	0.005

* Красный ореол вокруг колоний, наблюдаемый в отсутствие индуктора, связан с подтеканием промотора; в присутствии индуктора ореол значительно больше, чем без него.

** Время инкубации до появления цвета при высеве истощающим мазком.

В результате реакции с восстанавливающими ингредиентами агара, входящего в состав твердой среды LB или М9, из гексацианоферрата(III) образуется гексацианоферрат(II). При ферментативном гидролизе аспарагина и разрушении прочного хелатного комплекса этой аминокислоты с Cu(II), катионы меди связываются с анионами гексацианоферрата(II), что сопровождается выпадением красно-коричневого осадка.



Красный цвет колоний и красный ореол вокруг них указывают на способность исследуемого микроорганизма разрушать аспарагиновые комплексы, в то время как неактивные свой естественный цвет не изменяют. Покраснение колоний и диаметр окрашенной зоны вокруг них находятся в прямой зависимости от аспарагиназной активности изучаемых штаммов, концентрации реагирующих компонентов, а также времени инкубации.

При использовании рекомендуемых концентраций реагентов повторные эксперименты позволяют получить сопоставимые данные. Увеличение концентрации $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ приводит к появлению свободных ионов меди и неспецифическому красному окрашиванию, уменьшение — снижает чувствительность среды. Уменьшение концентрации глицерина до 3 г на 100 мл снижает яркость окрашивания колоний, при увеличении более 9 г на 100 мл вызывает неспецифическое окрашивание среды.

Конечный результат реакции зависит не только от ферментативного разрушения комплекса меди с аспарагином, но также и от значения pH среды. Так, продукты неполного окисления, метаболиты, выделяемые в среду в процессе жизнедеятельности кле-

ток, влияют на pH и окислительно-восстановительный потенциал системы, а, следовательно, и на процесс тестирования. Поэтому длительная инкубация может привести к неспецифическому окрашиванию среды. Добавление в среду CaCO_3 предупреждает закисление среды и диффузию кислот из области роста активных колоний и ограничивает зону покраснения.

Автоклавирование в жестких условиях может вызывать разрывы полисахаридных цепей агара и появление альдегидных форм. Ионы кальция, по-видимому, связывают полуацетальную форму восстанавливающих сахаров и тем самым блокируют образование альдегидных форм, что препятствует нежелательному восстановлению меди, разрушению комплексов с аспарагином и выпадению неспецифического красного осадка.

Незначительное изменение концентрации хлоридов или нитратов заметно не влияет на результат. Существенное изменение ионного состава осложняет анализ, поэтому для приготовления среды желательно использовать бакто-триптон и дрожжевой экстракт с контролируемым содержанием примесей. В то же время, несмотря на колебания химического состава некоторых компонентов питательных сред (бакто-триптон и дрожжевой экстракт), небольшие изменения концентраций реагентов позволяют получать хорошо воспроизводимые результаты не только на синтетических средах, такой, как М9, но даже в среде LB.

Гексацианоферрат калия является не только необходимым компонентом основной реакции, но и индикатором, свидетельствующим о наличии или отсутствии токсичных количеств ионов меди. Ионы гексацианоферрата по мере дезамидирования аспа-

рагина удаляются в виде осадка с медью, а ионы меди постоянно находятся в связанном состоянии и на скорость и характер роста культуры не влияют, поэтому испытуемые колонии сохраняются живыми и могут использоваться в дальнейшей работе.

К преимуществам предложенного метода определения L-аспарагиназной активности перед аналогами можно отнести следующие:

1) метод позволяет проводить первичный отбор единичных активных колоний прямо с чашки, что невозможно при использовании других известных способов;

2) метод позволяет оценивать чистоту культуры по активности в отношении L-аспарагина;

3) дифференциальная среда содержит основной субстрат фермента — L-аспарагин, что определяет более высокую специфичность предлагаемого метода по сравнению с аналогами;

4) метод позволяет выявлять активные штаммы не только на синтетических средах, но и на традиционной среде LB, на которой растет большинство микроорганизмов, и, наиболее вероятно, сможет расти модифицированный штамм;

5) метод достаточно прост в применении, используются доступные и недорогие реактивы.

К недостаткам рекомендуемого метода можно отнести многокомпонентный состав среды и использование соединений, потенциально способных провоцировать мутагенез, а также необходимость учитывать особенности метаболизма исследуемых штаммов при оценке результатов.

Таким образом, теоретической основой предлагаемого метода выявления штаммов—продуцентов L-аспарагиназы является химическая цветовая индикация ферментативного гидролиза аспарагина. Метод позволяет выявлять штаммы бактерий, продуцирующих L-аспарагиназу с удельной активностью не менее 0.1–3.0 МЕ/мг белка, и отбирать наиболее активные клоны на твердой среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Obama K., Tara M., Niina K.* // Int. J. Hematol. 1999. V. 69. № 4. P. 260–262.
2. *Yong W., Zheng W., Zhang Y., Zhu J., Wei Y., Zhu D., Li J.* // Int. J. Hematol. 2003. V. 78. № 2. P. 163–167.
3. *Jaccard A., Petit B., Girault S., Suarez F., Gressin R., Zini J.M., Coiteux V., Larroche C., Devidas A., Thiüblemont C., Gaulard P., Marin B., Gachard N., Bordessoule D., Hermine O.* // Ann. Oncol. 2009. V. 20. № 1. P. 110–116.
4. *Krasoikina J., Borisova A.A., Gervaziev Y.V., Sokolov N.N.* // Biotechnol. Appl. Biochem. 2004. V. 39. № 2. P. 215–221.
5. *Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А. Сидорук К.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Покровская М.В., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н.* // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54. № 6. С. 712–719.
6. *Cappelletty D., Chiarelli L.R., Paschetto M.V., Stivala S., Valentini G., Scotti C.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. V. 377. № 4. P. 1222–1226.
7. *Бансал С., Гнасевари Д., Мишра П., Кунду Б.* // Биохимия. 2010. Т. 75. № 3. С. 457–464.
8. *Gilbert H.J., Blazek R., Bullman H.M., Minton N.P.* // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. № 1. P. 151–160.
9. *Harms E., Wehner A., Jennings M. Pugh K.J., Beacham I.R., Ruhm K.H.* // Protein Expr. Purif. 1991. V. 2. № 2. P. 144–150.
10. *Meister A.* Methods in enzymology II. New York: Academic Press, 1955. 496 p.
11. *Howard J.B., Carpenter F.H.* // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 4. P. 1020–1030.
12. *Gulati R., Saxena R.K., Gupta R.* // Lett. Appl. Microbiol. 1997. V. 24. № 1. P. 23–26.
13. *Мазин А.В., Кузнецов К.Д., Краев А.С., Холодилов Н.Г., Блинов А.Г., Кузьминов А.В., Головин С.Я., Наякишин А.М., Соловьев В.В., Ямщиков В.Ф., Козкоза В.А., Иванов С.В., Потанов В.А., Санарбаев М.К., Дианов Г.Л., Протопопов М.О., Калачиков С.М., Богачев С.С., Чикаев Н.А.* Методы молекулярной генетики и геномной инженерии. Новосибирск: Наука, 1990. 248 с.
14. *Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R.* // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 23. P. 8746–8749.
15. *Sillen L.G., Martell A.E.* Stability Constants of Metal-ion Complexes. London: Chemical Soc, 1971. 865 p.

Differential Medium for Revelation of Bacterial Producer Strains of L-asparaginases

M. V. Pokrovskaya, V. S. Pokrovskii, and N. N. Sokolov

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119121 Russia

e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

Received May 24, 2010

Abstract—A specific, fast, and easy method for revelation of active plate producers of L-asparaginase using differential medium on the basis of LB or M9 with 1.5% agar was developed. Each 100 ml of LB or M9 medium additionally contained 6–7 ml of glycerol, 4 g of L-asparagine, 0.2 g of CaCO₃, and diagnostic components: 3 ml of 0.2 M CuSO₄ · 5H₂O and 2.5 ml of 0.1 M K₃Fe(CN)₆, pH 7.6–7.8. The results were counted 12–20 or 24–48 h after strain growth at 37°C in corresponding mediums. Red color of colonies and colored zone around them showed the ability of the strain under study to destroy asparaginic complexes. The recommended method allows revealing bacterial strains producing L-asparaginase with specific activity of not less than 0.1–3.0 MU/mg of protein.

УДК 663.5

СПОСОБНОСТЬ К АНАЭРОБНОМУ РОСТУ И АКТИВНОСТЬ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ У МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

© 2011 г. А. В. Кураков*, К. С. Хидиров**, В. С. Садыкова***, Д. Г. Звягинцев**

*Международный биотехнологический центр МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва 119991

e-mail: kurakov57@mail.ru

**Факультет почвоведения МГУ

***Биологический факультет МГУ

Поступила в редакцию 12.04.2010 г.

На основе предложенного метода проведено выделение грибов в анаэробных условиях и установлены различия в их численности и видовом составе в разных местообитаниях. На представительной выборке (344 штаммов более 60 видов) определена способность микромицетов разных таксонов к анаэробному росту и спиртовому брожению. Среди грибов, растущих в анаэробных условиях, выявлены виды с высокой, умеренной и низкой активностью брожения. Способность к анаэробному росту и брожению зависела от таксономической принадлежности. В ряде случаев проявление этих свойств зависело от местообитания, из которого штамм был выделен. Максимальный уровень накопления этанола в культуральной жидкости (1.2–4.7%) обнаружен у *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp. группы *flavus*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp., *Mucor circinelloides*, *Mucor* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp.

При производстве этилового спирта используют отобранные расы дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida scottii*, *C. tropicalis*) и бактерий [1–3]. Значительно меньше внимания уделяли изучению способности мицелиальных микроскопических грибов к брожению, так как их традиционно рассматривали как аэробные организмы. Вместе с тем в природе эти грибы часто встречаются в местообитаниях с ограниченной обеспеченностью кислородом. Значительное количество грибного мицелия сохраняет жизнеспособность в длительно инкубируемых в восстановительных условиях почвах, в затопляемых болотных почвах и верховых болотах [4–6]. В последние годы появились сведения о способности микромицетов к росту в анаэробных условиях и спиртовому брожению [6, 7], причем не только представителей родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, что было известно ранее [8–11].

Микроскопические грибы представляют особый интерес для получения этанола из растительных полимерных субстратов, так как многие из них являются продуцентами активных гидролаз. Штаммы таких грибов могли бы использоваться для переработки растительного материала, для гидролиза полимерных субстратов в аэробных условиях и сбраживания сахаров при лимитированной обеспеченности среды кислородом.

Цель работы – оценка активности спиртового брожения у мицелиальных микроскопических грибов разных таксонов, выделенных из различных местообитаний.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. При поиске изолятов грибов, обладающих способностью к спиртовому брожению, исходили из предположения, что они должны характеризоваться хорошим ростом в анаэробных условиях на средах с простыми сахарами. Для исследования было отобрано 344 штамма микроскопических грибов, разных таксономических групп. Чистые культуры микромицетов были изолированы из образцов почв, отобранных в различных регионах и экотопах – дерново-подзолистой почвы, выщелоченного чернозема и с рисовых полей, растительных остатков, донных илов и затопляемых грунтов вдоль водоемов, плодовых тел макромицетов, семян хвойных и злаковых растений, торфа верхового болота, корней болотных растений и растений гидроморфных лугов, погребенных почв, культурных слоев из раскопа античного города Фанагории (Краснодарский край, Россия), вермикомпоста, пищеварительного тракта дождевых червей и личинок усачей.

Большинство отобранных штаммов (320 из 344) были выделены стандартным посевом на чашки Петри на среды Чапека и сусло-агар и выращиванием в атмосфере воздуха при 25°C. 24 штамма были отобраны из культур, изолированных из природных образцов непосредственно при анаэробной инкубации посевов.

Анаэробное выделение грибов. Выделение грибов в анаэробных условиях проводили методом посева мелкозема свежих образцов современных почв, культурных слоев и погребенных почв, фрагментов

корней, растительных материалов, содержащего пищеварительного тракта безпозвоночных на глюкозо-пептонную среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, KCl – 0.5, MgSO_4 – 0.5, FeSO_4 – 0.01, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.0, агар – 15.0 г/л, пептон – 5.0, глюкоза – 5.0, дрожжевой экстракт – 0.5, а также 1 мл/л раствора микроэлементов (мг/л): ЭДТА – 500, $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 200, $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10, $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 3, H_3BO_4 – 30, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1, Na_2MoO_4 – 3, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 2. Для подавления роста бактерий в стерильную, расплавленную среду добавляли антибиотики стрептомицин и хлорамфеникол в концентрации 200 мг/л среды. Чашки Петри с посевным материалом помещали в специальные пластиковые боксы (“BioMerieux Co”, Франция) и инкубировали в течение 7–10 сут в анаэробных условиях при 25°C. Анаэробноз создавали с помощью газовых анаэробных пакетов “GENbox anaer”, (“BioMerieux Co”, Франция). Поглощение кислорода и повышение уровня диоксида углерода в боксах происходило в течение 2.5 ч. Анаэробноз в них контролировали индикаторами на основе резазурина (“Oxoid Limited”, Англия). Такой подход к созданию бескислородной атмосферы был ранее использован для анаэробного культивирования бактерий [12, 13]. В данной работе он применен для проверки способности к анаэробному росту чистых культур грибов и для их выделения в анаэробных условиях из природных объектов. В этом случае необходимо использовать оптимальные для роста грибов среды с дрожжевым экстрактом или витаминами) и микроэлементами, более низкую температуру (25°C), добавлять в повышенной дозе антибактериальные антибиотики и инкубирование проводить 1–2 нед.

Из каждого местообитания было проанализировано не менее 10 образцов.

Идентификация изолятов грибов. Идентификацию микроскопических грибов осуществляли по культурально-морфологическим признакам по соответствующим для конкретной систематической группы определителям [14–18].

30 изолятов, которые принадлежали к разным систематическим группам согласно определению по культурально-морфологическим признакам, были идентифицированы с помощью ПЦР-амплификации с последующим секвенированием амплификатов и их анализом (GenBank Data system: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, <http://rdp.cme.msu.edu/html/>, <http://www.arb-home.de>). Чистоту штаммов на наличие бактерий-спутников или бактериальной контаминации контролировали микроскопией и высевом на среды с циклогексимидом.

Оценка роста грибов в анаэробных условиях. Способность к росту в анаэробных условиях у штаммов, изолированных при инкубации посевов в атмосфере воздуха, проверяли на глюкозо-минеральной среде

или агаризованной среде Чапека с дрожжевым экстрактом и микроэлементами (рН 6.5). В среды добавляли 1 мл/л раствора микроэлементов (г/л): $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ – 0.8; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.8; $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.8; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.8. Чашки Петри помещали в герметичные пластиковые боксы с генераторами анаэробной атмосферы и индикаторами анаэробнозиса. Посев инкубировали в течение 7–14 сут при 25°C, при наличии роста грибов оценивали размеры их колоний и рассчитывали радиальную скорость роста [19].

Оценка активности спиртового брожения штаммов в анаэробных условиях. Активность брожения штаммов грибов оценивали по накоплению этанола в культуральной жидкости в анаэробных условиях. Мицелий предварительно выращивали на жидкой среде Чапека в течение 4–6 сут, отмывали в стерильной дистиллированной воде и переносили во флаконы объемом 100 мл с 50 мл глюкозо-минеральной среды при содержании глюкозы – 1, 4 и 5%. У ряда наиболее активных культур продукция этанола была определена при более высоких концентрациях глюкозы (10 и 20%). Флаконы закрывали резиновыми пробками, воздух замещали на N_2 при продувании азотом в течение 1 мин и инкубировали в течение 1 нед. при 25°C. Содержание спирта определяли в отфильтрованной культуральной жидкости на 4 и 7 сут на газо-жидкостном хроматографе (Московский опытный завод, Россия, модель Chrom 3700 с пламенно-ионизационным детектором, колонка SOVPOL (1.5 м), газ-носитель – аргон, температура колонки 160°C, испарителя 240°C, детектора 250°C).

Для расчета удельной активности образования этанола определяли биомассу грибов во флаконах после завершения опыта. Мицелий промывали дистиллированной водой и высушивали при 60–70°C до постоянного веса [19]. Рассчитывали также эффективность сбраживания глюкозы до этанола.

Для определения эндоглюканазной активности грибов использовали среду с микрокристаллической целлюлозой (“Sigma”, type 100, США) следующего состава (г/л водопроводной воды): KH_2PO_4 – 1.0, MgSO_4 – 0.5, KCl – 1.0, NaNO_3 – 2.0, FeSO_4 – 0.01, CaCl_2 (CaCO_3) – 0.04, дрожжевой экстракт – 0.02, микрокристаллическая целлюлоза – 8.0. Колбы на 250 мл со стерильной жидкой средой (100 мл) инокулировали мицелием и спорами и культивировали на качалке (120 об/мин) при 28°C в течение 7 сут. Культуральную жидкость отбирали в пластиковые пробирки на 2 мл и удаляли из нее мицелий и остатки целлюлозы центрифугированием (2 мин, 14000 г). Эндоглюканазную и ксиланазную активности в пробах определяли по накоплению восстанавливаемых сахаров, сахара – методом Шомоди–Нельсона с глюкозой в качестве стандарта. В качестве субстрата использовали 1%-ные растворы карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и березового ксилана

Таблица 1. Микроскопические грибы, изолированные из различных местообитаний в анаэробных условиях

Род/вид	Почва	Погребенная почва и культурные слои	Верховой торф и зеленые мхи	Корни и растительные субстраты	Место обитания ассоциированные с беспозвоночными
<i>Acremonium</i> sp.	+				
<i>Aspergillus niger</i>	+	+			+
<i>Aspergillus</i> sp. гр. <i>flavus</i>	+	+			
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	+	+		+	
<i>Cunningamella elegans</i>				+	
<i>Fusarium oxysporum</i>	+			+	+
<i>F. solani</i>	+			+	
<i>Fusarium</i> spp.	+	+		+	+
<i>Mucor circinelloides</i>	+				
<i>Mucor hiemalis</i>	+				+
<i>Mucor</i> spp.	+			+	+
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>					+
<i>Paecylomyces</i> sp.	+			+	
<i>Torrubiella confrasa</i>			+		
<i>Trichoderma aureoviride</i>			+		
<i>T. harzianum</i>	+		+		
<i>Trichoderma</i> spp.			+	+	+
<i>Zygorrhynchus heterogamus</i>			+		
<i>Zygorrhynchus</i> sp.			+	+	+
<i>Mycelia sterilia</i> (светлоокрашенный)	+		+		+
<i>Mycelia sterilia</i> (темноокрашенный)	+				

(“Sigma”, США), соответственно. Активность ферментов определяли при pH 5.0 и 50°C в течение 5 мин для КМЦ и 10 мин для ксилана [20]. Активность 1,4-β-эндоглюканазы и ксиланазы выражали в международных единицах (Е/мл).

Статистическая обработка. Опыты проводили в трехкратной повторности. Рассчитывали средние значения, стандартные отклонения и коэффициент вариации данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В анаэробных условиях инкубации посевов из различных местообитаний были выделены представители 23 видов и несколько изолятов в форме стерильного мицелия (табл. 1). Установлены различия в составе и доминировании видов в образцах из почв, верхового торфа, растительных остатков, корней, погребенных почв и культурных слоев, и экониш, связанных с беспозвоночными.

Наиболее разнообразный спектр видов обнаружен в анаэробных посевах из почв. Он включал представителей *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Aspergillus niger*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cun-*

ningamela elegans, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Fusarium* spp., *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *Mucor* spp., *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, несколько видов рода *Trichoderma*, *Zygorrhynchus heterogamus*, *Zygorrhynchus* sp. и организмы, представленные стерильным светлоокрашенным и темноокрашенным мицелием. В целом, данный состав видов сходен с тем, который был выявлен при использовании модификации метода Хангейта для анаэробной изоляции микромицетов из почв разных типов [6]. Таким образом, предложенный нами подход может использоваться для выделения микроскопических грибов в анаэробных условиях из почв и других объектов, а также для оценки способности к анаэробному росту их чистых культур.

Из погребенных почв и культурных слоев в анаэробных условиях инкубации посевов выделено значительно меньше видов. Среди них доминировали виды родов *Fusarium*, *Mucor*, *Trichoderma*, а также *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp. гр. *flavus*. Эти таксоны грибов часто выделяются в анаэробных посевах из почв южнотаежной и степной зоны [6]. В посевах с корней и различных растительных остатков часто обнаруживали виды родов

Таблица 2. Рост в анаэробных условиях штаммов микроскопических грибов, выделенных при инкубации посевов в атмосфере воздуха (в аэробных посевах)

Род/вид	Число штаммов		
	прове- рено	радиальная ско- рость роста, мм/ч	
		0.03–0.10	>0.10
<i>Absidia</i> sp.	3	—	3
<i>Absidia spinosa</i>	3	1	2
<i>Acremonium</i> sp.	2	2	—
<i>Actinomucor elegans</i>	1	—	1
<i>Aspergillus</i> sp. гр. <i>flavus</i>	2	2	—
<i>Aspergillus niger</i>	4	4	—
<i>Aspergillus terreus</i>	2	1	1
<i>Aspergillus</i> sp.	3	2	1
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	5	3	2
<i>C. solani</i> f. <i>solani</i>	1	—	1
<i>Clonostachus</i> sp.	3	2	1
<i>Cunningamella echinulata</i>	1	1	—
<i>Fusarium avenacium</i>	4	2	2
<i>F. dimerum</i>	1	—	1
<i>F. fusarioides</i>	1	1	—
<i>F. moniliforme</i>	4	2	2
<i>F. oxysporum</i>	7	—	7
<i>F. poae</i>	1	1	—
<i>F. sambucinum</i>	1	1	—
<i>F. solani</i>	7	—	7
<i>F. sporotrichioides</i>	9	5	4
<i>Fusarium</i> spp.	28	8	20
<i>Mucor circinelloides</i>	2	—	2
<i>Mucor hiemalis</i>	2	—	2
<i>Mucor plumbeus</i>	1	—	1
<i>Mucor</i> spp.	21	2	19
<i>Paecilomyces</i> sp.	2	2	—
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	4	1	3
<i>Sphaerostilbella aureonitens</i>	1	—	1
<i>Trichoderma asperellum</i>	7	4	3
<i>T. atroviride</i>	7	3	4
<i>T. citrinoviride</i>	2	2	—
<i>T. harzianum</i>	7	6	1
<i>T. koningii</i>	3	1	2
<i>T. viride</i>	6	3	3
<i>Trichoderma</i> spp.	36	9	27
<i>Zygorrhynchus heterogamus</i>	1	—	1
<i>Z. moelleri</i>	2	—	2
<i>Zygorrhynchus</i> sp.	5	1	4

Fusarium (*Fusarium oxysporum*), *Trichoderma*, *Clonostachys*, из мукоровых, наряду с *Mucor* spp., *Cunningamella elegans* и *Zygorrhynchus* sp., а в образцах верхового торфяника доминировали виды родов *Trichoderma* и *Zygorrhynchus*. Из пищеварительного тракта дождевых червей и личинок усачей, а также ассоциированных с ними местообитаний (копролитах, вермикомпосте, переработанной древесине), в анаэробных условиях инкубации посевов изолировали представителей *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Zygorrhynchus* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus niger*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Trichoderma harzianum*.

Результаты тестирования способности к анаэробному росту штаммов разных видов, изолированных в традиционных посевах на воздухе, даны в табл. 2. Грибные колонии в анаэробных условиях на твердых средах образовывали небольшое количество воздушного мицелия, или он отсутствовал. Радиальная скорость роста грибных колоний в анаэробных условиях по сравнению с аэробными ниже, как правило, в 1.5–4.0 раза, а накопление биомассы еще меньше (в 20 раз) [6]. Микромицеты разной таксономической принадлежности существенно различались по радиальной скорости роста и размерам колоний, которые они формировали в анаэробных условиях на питательной среде.

Обнаружено, что подавляющее большинство штаммов таких видов как *F. oxysporum*, *F. solani*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Mucor circinelloides*, *M. hiemalis*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* характеризовались умеренным и хорошим ростом в анаэробных условиях. Однако у штаммов других видов эта способность заметно варьировала. В ряде случаев отмечали связь этого свойства с местом их выделения. В частности, изоляты триходерм из верховых болот, илов и затопляемых почв и грунтов вдоль водоемов демонстрировали хороший рост. В отличие от них штаммы, выделенные с поверхности семян и плодовых тел макромицетов, не росли в анаэробных условиях.

Умеренный и хороший рост в анаэробных условиях наблюдали, как правило, у представителей зигомицетов (*Absidia*, *Mucor*, *Actinomucor*, *Cunningamella*, *Rhizopus*, *Zygorrhynchus*), митотических грибов аскомицетного аффинитета (*Clonostachys*, *Fusarium*, *Trichoderma*), реже у отдельных видов родов *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Acremonium* и некоторых других. В дополнении к видам, для которых эта способность была известна ранее [6, 9–12], анаэробный рост установлен у представителей *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Clonostachys solani* f. *solani*, *Cunningamella echinulata*, *Fusarium avenacium*, *F. dimerum*, *F. fusarioides*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *Trichoderma asperellum*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*. Очень слабый рост при анаэробии отмечен у штаммов *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus* sp., *Chaetomium globosum*, *Fusarium clamydosporum*, *F. sambuci-*

num, *Fusarium* spp., *Humicola fuscoatra*, *Humicola grisea*, *Mucor* sp., *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces marquindii*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium funiculosum*, *P. islandicum*, *Trichoderma citrinoviride*, рост прекращался после формирования микроколоний диаметром не более 1–3 мм, видимых только под микроскопом. Способность к анаэробному росту не обнаружена при проверке штаммов: *Alternaria alternata*, *Aphalocladium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Blakslea trispora*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Geomyces pannorum*, *Geotrichum candidum*, *Lecanicillium* sp., *Paecilomyces variotii*, *Penicillium aurantionigriseum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. canescens*, *P. citreoviride*, *P. citrinum*, *P. diversum*, *Penicillium frequentans*, *P. glabrum*, *P. implicatum*, *P. nalgiovense*, *P. restrictum*, *P. rolfsii*, *P. spinulosum*, *P. thomii*, *Penicillium* spp. (6 штаммов), *Sordaria fimicola*, *Stachybotrys* sp., *Talaromyces* sp., *Tolyocladium geodes*, *T. inflatum*, *Umbelopsis ramanniana*, *Verticillium nigrescens*. Также не росли в анаэробных условиях отдельные штаммы видов *Absidia* sp., *Aspergillus terreus*, *Aspergillus* spp., *Fusarium avenacium*, *F. dimerum*, *F. moniliforme*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *Humicola fuscoatra*, *Paecilomyces marquindii*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma asperellum* (33 штамма), *T. atroviride*, *T. citrinoviride* (16 штаммов) *T. hamatum*, *T. harzianum* (17 штаммов), *T. viride* (21 штаммов), *T. koningii* (5 штаммов), *Trichoderma* spp. (14 штаммов) Тестирование представителей разных видов рода *Penicillium*, изолированных в аэробных условиях, на способность к росту при анаэробно-озисе показало, что только два штамма (*Penicillium funiculosum*, *P. islandicum*) продемонстрировали очень слабый рост (образовывали микроколонии), а все остальные представители пенициллов не росли в этих условиях.

Следует отметить, что представители рода *Penicillium*, темноокрашенных грибов (*Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Stachybotrys* sp.) и ряда других видов (*Geomyces pannorum*, *Sordaria fimicola*, *Talaromyces* sp., *Botrytis cinerea*), которые являются типичными микромицетами для наземных биогеоценозов, не выделялись и в анаэробных посевах из почв, и других природных объектов (табл. 1).

Способность к росту в анаэробных условиях определялась преимущественно таксономической принадлежностью штамма, в ряде случаев отмечена связь этого свойства со спецификой местообитания, из которого они выделены (наличием в нем длительных периодов лимитированной обеспеченности кислородом).

У 170 штаммов микроскопических мицелиальных грибов, которые продемонстрировали умеренный и хороший рост в анаэробных условиях, была исследована активность спиртового брожения. Все штаммы этих факультативно-анаэробных грибов обладали способностью к спиртовому брожению на среде с глюкозой (табл. 3).

Таблица 3. Активность брожения штаммов мицелиальных микроскопических грибов, обладающих умеренным и хорошим ростом в анаэробных условиях

Род/вид	Число штаммов	Число активных штаммов		
		C ₂ H ₅ OH на 4–6 сут, %		
		0.02–0.1	0.1–0.5	0.5–1.5
<i>Absidia spinosa</i>	1	–	–	1
<i>Absidia</i> sp.	2	–	2	–
<i>Acremonium</i> sp.	1	–	–	1
<i>Actinomucor elegans</i>	1	–	1	–
<i>Aspergillus</i> sp. гр. <i>flavus</i>	4	1	1	2
<i>Aspergillus niger</i>	4	2	2	–
<i>Aspergillus terreus</i>	2	1	–	1
<i>Aspergillus</i> sp.	1	–	1	–
<i>Clonostachys rosea</i> var. <i>rosea</i>	1	–	1	–
<i>Cunningamella elegans</i>	1	1	–	–
<i>Fusarium avenacium</i>	2	2	–	–
<i>F. clamydosporum</i>	1	1	–	–
<i>Fusarium fusarioides</i>	1	–	–	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	10	1	2	7
<i>Fusarium sambucinum</i>	2	–	1	1
<i>Fusarium solani</i>	10	1	5	4
<i>F. sporotrichioides</i>	3	1	2	–
<i>Fusarium</i> sp.	19	6	7	6
<i>Mucor circinelloides</i>	2	–	1	1
<i>Mucor hiemalis</i>	1	1	–	–
<i>Mucor</i> spp.	4	2	1	1
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	1	–	–	1
<i>Sphaerostilbella aureonitens</i>	2	1	1	–
<i>Trichoderma asperellum</i>	8	6	1	1
<i>T. aureoviride</i>	2	–	1	1
<i>T. atroviride</i>	2	–	–	2
<i>T. citrinoviride</i>	2	2	–	–
<i>T. harzianum</i>	6	2	2	2
<i>T. hamatum</i>	1	1	–	–
<i>T. koningii</i>	1	1	–	–
<i>T. viride</i>	2	2	–	–
<i>Trichoderma</i> spp.	6	2	3	1
<i>Zygorrhynchus heterogamus</i>	1	–	1	–
<i>Z. moelleri</i>	1	1	–	–
<i>Zygorrhynchus</i> sp.	3	–	1	–

Наиболее высокой активностью спиртового брожения на среде с глюкозой обладали штаммы грибов следующих таксономических групп: *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp., *Mucor circinelloides*, *Mucor* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma* sp. В большинстве случаев эффективность сбраживания глюкозы у культур этих грибов превышала 50%. Несколькими ниже она была у представителей *Trichoderma aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningi*, *T. viride*, *Fusarium sporotrichoides*, *Aspergillus niger*, *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Zygorhynchus heterogamus*. Максимальная эффективность сбраживания глюкозы штаммами этих видов составляла 25–50%, что соответствовало накоплению 0.2–0.5% этанола к 4–7 сут на средах, содержащих 1–2% глюкозы. Заметно более слабой активностью спиртового брожения обладали штаммы других видов рода *Fusarium*, *Trichoderma*, а также *Mucor hiemalis*, *Zygorhynchus moelleri* и *Cunningamella elegans*. Накопление этанола не было обнаружено или накопление не превышало 0.02% у *Clonostachys* spp. (6 штаммов), *Fusarium clamydosporum*, *F. moniliforme* (2 штамма), *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *Fusarium* sp. (3 штамма), *Humicola fuscoatra*, *H. grisea*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma asperellum*, *T. atroviride* (2 штамма), *T. citrinoviride* (3 штамма), *T. hamatum*, *T. harzianum* (2 штамма), *T. koningii* (2 штамма), *T. viride*, *Trichoderma* sp. (12 штаммов), *Zygorhynchus moelleri*, *Zygorhynchus* sp. (2 штамма).

Установлено, что образование этанола природными изолятами дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* КБП-3781 и *Hanseniaspora* sp. 1R и 2КБП на среде с 1% глюкозы составляло 3.6–5.8 мг/мл и 2.6–4.0 мг/мл соответственно. При такой активности штаммы *Hanseniaspora* sp. сбраживали до этанола 39–49% глюкозы на 4 сут и 62% глюкозы на 7 сут, у *Saccharomyces cerevisiae* эти показатели были заметно выше (59–90% — на 4 сут). Удельная активность образования этанола у диких штаммов *Hanseniaspora* sp. и *Saccharomyces cerevisiae* была равна 33–48 мг C₂H₅OH/(г сухой биомассы·ч), что в 1.5–3 раза выше, чем у бродильщиков-микромикетов. Накопление этанола на среде с глюкозой (1%) у представителей *F. oxysporum*, *F. solani*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus terreus* достигало 50–100%, а у *Trichoderma aureoviride* — 20–50% от уровня продукции спирта у штаммов *Saccharomyces cerevisiae* и *Hanseniaspora* sp. Следовательно, многие факультативно-анаэробные мицелиальные грибы обладали скоростью брожения, близкой к таковой у диких штаммов дрожжей.

У штаммов грибов, образующих 0.5–1.5% спирта (табл. 3) на средах с 4–5% глюкозы были проверена активность при более высоких концентрациях сахара (10%). Максимальный уровень накопления этанола на средах для мицелиальных микромикетов составил 2.5–4.7%, что также сравнимо с активностью природных изолятов дрожжей.

Определение гидролитической активности у микромикетов-бродильщиков показало, что ряд штаммов *Trichoderma atroviride*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *C. rosea* f. *rosea* обладали относительно высокой эндоглюканазной и ксиланазной активностью — 1.0–4.0 ед./мл культуральной жидкости. То есть штаммы с активностью спиртового брожения, сопоставимой с таковой у мукоровых грибов — сахаролитиков, были обнаружены и среди видов с широким спектром гидролитических ферментов — *A. terreus*, *Aspergillus* sp. гр. *flavus*, *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *F. oxysporum*, *F. solani*.

Наблюдается определенная связь между местом выделения грибов и их способностью сбраживать глюкозу до этанола. Так, например, изоляты *Aspergillus*, выделенные из погребенных почв и культурных слоев характеризовались высокой активностью брожения, в то время как для других штаммов этого рода характерна более низкая активность.

Для сравнения с хорошо растущими в анаэробных условиях грибами способность к спиртовому брожению оценили у 20 штаммов микромикетов, не продемонстрировавших роста при анаэробнозисе или имевших очень слабый рост (*Humicola grisea*, *Tolypocladium inflatum*, *T. geodes*, *Umbelopsis issabelina*, *Lecanicillium* sp., *Penicillium brevicompactum*, *P. citreoviride*, *P. frequentans*, *Penicillium spinulosum*, *P. thomii*, *Penicillium* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *P. varioti*, *Paecilomyces* sp., *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Geomyces pannorum*) (табл. 2, 3). Активность спиртового брожения у этих грибов была низкой или отсутствовала.

Таким образом, среди микромикетов, как и дрожжей [21, 22], можно выделить таксоны, характеризующиеся разной интенсивностью роста в анаэробных условиях и активностью спиртового брожения: виды сильных, умеренных, слабых бродильщиков и не обладающих этой способностью. Относительно высокой активностью спиртового брожения среди микроскопических грибов обладали не только представители мукоровых, но и видов, способных осуществлять гидролиз полимерных углеводных соединений. Выявлено несколько перспективных штаммов, проявляющих высокие активности спиртового брожения и гидролиза целлюлозы, что важно для создания новых биотехнологий переработки растительных субстратов. Вместе с тем, необходимо продолжение поисков среди изолятов микромикетов более активных штаммов и дальнейшего изучения способности представителей разных систематических групп мицелиальных грибов к спиртовому брожению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М., МГУ, 1989.

2. Майоров А.Ю., Курамшин Р.А., Еникеев Ш.Г. // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2002. № 2. С. 22–25.
3. Жульков А.Ю., Витол И.С., Карпиленко Г.П. // Вестник МИТХТ. 2009. Т. 4. № 5. С. 12–15.
4. Добровольская Т.Г., Полянская Л.М., Головченко А.В., Смагина М.В., Звягинцев Д.Г. // Почвоведение. 1991. № 7. С. 69–77.
5. Полянская Л.М., Милановский Е.Ю., Звягинцев Д.Г. // Почвоведение. 2004. № 9. С. 1109–1113.
6. Кураков А.В., Лаврентьев Р.Б., Нечитайло Т.Ю., Голышин П.Н., Звягинцев Д.Г. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 1. С. 103–112.
7. Pushalkar S., Rao K.K. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. P. 289–291.
8. Tabak H.H., Cooke W.B. // Mycologia. 1968. V. 69. № 1. P. 115–140.
9. Curtis P.J. // Trans. Br. Mycol. Soc. 1969. V. 53. P. 299–302.
10. Marchant R., Nigam P., Banat I.M. // Mycol. Res. 1994. V. 98. № 7. P. 757–760.
11. Wainwright M., Ali T.A., Killham K. // Mycol. Res. 1994. V. 98. № 7. P. 761–762.
12. Van Horn K., Warren K., Baccaglini E. // Evaluation of a New Anaerobic Atmosphere Generation System. Abstracts. Washington: Amer. Soc. Microbiology, 1996. P. 41.
13. Van Horn K.C., Warren K., Baccaglini E.J. // J. Clin. Microbiol. 1997. V. 35. № 8. P. 2170–2173.
14. Schipper M.A.A. // Studies in Mycol. 1973. № 4. P. 1–40.
15. Booth C. *Fusarium*. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Kew-Surrey: Commonwealth Mycolog. Inst., 1977. 58 p.
16. Nelson P.E., Tousson T.A., Marasas W.F.O. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania: State University Press, 1983. 193 p.
17. Samuels G.J. // Mycol. Res. 1996. V. 100. P. 923–935.
18. Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P. // Mycoscience. 2006. V. 47. P. 55–64.
19. Методы экспериментальной микологии / Ред. Билай В.И. Киев: Наукова Думка, 1982. 550 с.
20. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. // Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: Изд-во МГУ, 1995. 222 с.
21. The Yeasts a Taxonomic Study / Ed. Lodder J. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1970. 1385 p.
22. The Yeasts, a Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell S.W. Amsterdam: Elsevier Sci., 1998. 1055 p.

Anaerobic Growth Ability and Alcohol Fermentation Activity of Microscopic Fungi

A. V. Kurakov^a, K. S. Khidirov^b, V. S. Sadykova^c, and D. G. Zvyagintsev^b

^a International Biotechnological Center, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: kurakov57@mail.ru

^b Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^c Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

Received April 12, 2010

Abstract—The method proposed in this study was used to isolate fungi grown under anaerobic conditions and to reveal distinctions in their abundance and species composition in different habitats. The ability of micromycetes of different taxa to grow under anaerobic conditions and ensure alcohol fermentation was determined for a representative sample (344 strains belonging to more than 60 species). The group of fungi growing under anaerobic conditions included species with high, moderate, and low fermentation activity. The ability for anaerobic growth and fermentation depended on the taxonomic affiliation of fungi. In some cases, the expression of these characteristics depended on the habitat from which the strain was isolated. The maximum level of ethanol accumulation in culture liquid (1.2–4.7%) was detected for *Absidia spinosa*, *Aspergillus* sp. of group *flavus*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp., *Mucor circinelloides*, *Mucor* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus arrhizus* var. *Arrhizus*, *Trichoderma atroviride*, and *Trichoderma* sp.

УДК 577.34

ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Phyllophora crispa*

© 2011 г. Н. Р. Мейчик, Н. И. Попова, Ю. И. Николаева, И. П. Ермаков, А. Н. Камнев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: meychik@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2010 г.

Исследованы ионообменные свойства клеточных стенок, выделенных из таллома красной водоросли *Phyllophora crispa*. Определены ионообменная способность и коэффициент набухания клеточной стенки при различных рН (2–12) и постоянной ионной силе раствора (10 мМ). Установлено, что поведение клеточных стенок *P. crispa* как ионообменников обусловлено присутствием в их матриксе двух типов катионообменных групп и аминокрупп. Определено количество групп каждого типа и константы их ионизации, а также интервалы рН, в которых катионообменные группы становятся ионизированными и могут принимать участие в обменных реакциях с катионами внешней среды. Высказано предположение, что ионогенные группы с $pK_a \sim 5$ являются карбоксильными группами уроновых кислот, а с $pK_a \sim 7.5$ – карбоксильными группами аминокислотных фрагментов. Определено, что белок является основным компонентом полимерного матрикса клеточных стенок, так как его доля составляла 36%.

Макрофиты являются важнейшими доминантами биоценоза Черного моря. Они выполняют функцию одного из основных продуцентов прибрежной зоны, укрепляют прибрежные грунты, препятствуют проникновению антропогенных веществ и одновременно являются кормовой базой, а также местом нереста и укрытия рыб и беспозвоночных. С практической точки зрения, важными представителями морских макрофитов являются красные водоросли. Из них выделяют компоненты клеточной стенки агары и каррагинаны, которые находят широкое применение в качестве гелеобразователей и загустителей в атомной энергетике, в пищевой, текстильной, лакокрасочной, кожевенной промышленности, а также в микробиологических и фармацевтических процессах [1, 2]. Эти морские организмы являются надежными индикаторами состояния окружающей среды. Кроме того, они могут быть использованы в качестве природных биосорбентов, свойства которых, в первую очередь, определяются их экстраклеточным матриксом [3–9]. Так, например, показано, что до 80% от общего количества ионов кадмия накапливается в клеточных стенках *Gracilaria cornea* и только 20% локализовано в клетке [8].

По современным представлениям клеточная стенка – сложноорганизованная, многофункциональная система. Она представляет собой внешний компартмент растительной клетки, который первым контактирует с наружным раствором и модифицирует его состав за счет реакций обмена между ионообменными группами полимерного матрикса стенок и ионами среды, а эффективность модификации внешнего раствора клеточными стенками определяется их ионообменными свойствами, которые играют важную роль в поглощении веществ рас-

тительными организмами как в нормальных, так и экстремальных условиях ионного окружения (в частности, в присутствии повышенных концентраций тяжелых металлов).

Исследованию особенностей функционирования клеточных стенок красных водорослей как природных ионообменников посвящены немногочисленные публикации [8, 9]. Более того, до настоящего времени отсутствовали подходы к оценке состава ионообменных групп клеточных стенок водорослей, которые могут вступать в реакции обмена с ионами внешней среды. Методология исследования клеточной стенки корней наземных высших растений без использования методов физической и химической деструкции была разработана для количественного описания поведения этого природного ионообменника и выявления особенностей участия ее матрикса в таком сложном физиологическом процессе, как является поглощение минеральных элементов из внешней среды [10, 11].

Цель работы – исследование состава ионогенных групп, которые определяют ионообменные свойства клеточных стенок у красной водоросли *Phyllophora crispa*, являющейся одним из субдоминантов в верхних отделах фитали в прибрежных биоценозах Черного моря [12].

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Использовали черноморскую красную водоросль *Phyllophora crispa* (Hudson) P.S. Dixon. (= *P. nervosa* (DC.) Grev). Сбор талломов осуществляли водолазным способом на глубине 8 м в районе мыса Малый Утриш. Собранный материал был высушен при комнатной температуре и макси-

мально возможно очищен от обрастателей разного происхождения.

Выделение клеточной стенки. В описанную ранее для корней высших растений методику [10, 11] внесли некоторые изменения. Высушенный материал помещали в стеклянную ионообменную колонку ($V = 200$ мл), промывали в динамических условиях последовательно 1%-ным NaOH (~0.5 л), дистиллированной H_2O (~2 л), 1%-ной HCl (~0.5 л), далее дистиллированной водой до отсутствия Cl^- в промывных водах. Определение хлорид-иона проводили титрометрическим методом с азотнокислой ртутью. На конечной стадии препараты обрабатывали спиртом и ацетоном, а затем высушивали при комнатной температуре. Полученные таким образом препараты в тексте обозначаются как “стандартизированные” клеточные стенки. Оценка качества изолированных клеточных стенок контролировали описанным ранее способом [10], используя флуоресцентную микроскопию (микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT, “Carl Zeiss”, Германия). В выделенных клеточных стенках отсутствовали внутриклеточные структуры, а в препаратах полностью сохранялась архитектура тканей.

Определение ионообменных групп. Использовали метод потенциометрического титрования. Навески сухих препаратов клеточной стенки по 40 ± 0.1 мг помещали в шлифованные бюксы с притертой пробкой (объем ~50 мл) и заливали растворами NaOH или HCl (12.5 мл) различной концентрации, но с постоянной ионной силой, которую создавали соответствующими растворами 10 mM NaCl. По истечении 48 ч образцы отделяли от раствора, обсушивали фильтровальной бумагой, определяли массу сырого материала (G_F^{CW}), высушивали при $50^\circ C$ до постоянного веса, определяли сухую массу (G_D^{CW}) и рассчитывали весовой коэффициент набухания клеточной стенки. В растворах до и после контакта с образцами определяли pH и концентрацию кислоты или щелочи титрованием с индикатором метиловым красным. По изменению концентрации H^+ или OH^- в растворе рассчитывали сорбционную способность клеточной стенки при pH_i по формуле:

$$S_i^{кат(ан)} = \frac{(C^{исх} - C^{равн})V}{g}, \quad (1)$$

где S_i – сорбционная емкость образцов по катионам ($S_i^{кат}$) или анионам ($S_i^{ан}$), мкмоль/г сухой массы клеточной стенки; $C^{исх}$ и $C^{равн}$ – исходная и соответствующая равновесная концентрации NaOH или HCl в растворе, mM; V – объем раствора, мл; g – навеска образца, г.

Расчет кривых титрования $S_i = f(pH_i)$ проводили по разработанной ранее методике согласно дифференциальным кривым ($dS_i/dpH_i = f(pH_i)$), как описано в работах [10, 11]. По дифференциальным кри-

вым определяли число типов групп в клеточной стенке *P. crista*, а также их количество (ΔS^j). В этом случае степень ионизации (α_j) групп может быть рассчитана по формуле:

$$\alpha_j = \frac{S_i^j}{\Delta S^j}, \quad (2)$$

где S_i^j – количество диссоциированных групп j -типа при pH_i .

Чтобы рассчитать константу ионизации для каждой ионогенной группы, использовали модифицированное Грегором уравнение Хендерсона–Хасельбаха [10]:

$$pH = pK_a + n \log_{10} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right), \quad (3)$$

где pK_a – кажущаяся константа ионизации ионогенной группы полимера, α – степень ионизации, n – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона [13]. Если зависимость $pH = f \left(\log_{10} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right)$ является прямолинейной, то в соответствии с уравнением (3) значение pH , при котором прямая пересекает ось y , будет равно величине pK_a , а тангенс угла ее наклона будет соответствовать значению константы n (уравнение (3)).

С установленными значениями параметров (ΔS^j , pK_a^j , n^j) рассчитывали S_i^{pac} по суммарному уравнению [14]:

$$S_i^{pac} = S_0^{кат} - \sum_{j, i=1}^{k, m} \frac{\Delta S^j}{1 + 10^{\left(\frac{pK_a^j - pH_i}{n^j} \right)}}, \quad (4)$$

где S_i^{pac} – расчетное значение ионообменной способности клеточной стенки при соответствующем значении pH_i ; $S_0^{кат}$ – максимальная катионообменная способность клеточных стенок; ΔS^j – количество ионогенных групп j -го типа; $S_0^{кат}$, ΔS^j и S_i^{pac} выражены в мкмоль на 1 г сухой массы клеточных стенок; pK_a^j – кажущаяся константа ионизации ионогенных групп j -типа; n^j – константа уравнения (3) для ионогенных групп j -типа; k – число точек на потенциометрической кривой, m – число типов ионогенных групп.

Адекватность примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия оценивали методом регрессионного анализа, определяя параметры уравнения:

$$S_i^{pac} = B \cdot S_i^{эксп} + A, \quad (5)$$

где $S_i^{эксп}$ и S_i^{pac} , мкмоль/г сухой массы клеточных стенок – экспериментальная и рассчитанная по уравнению (4) ионообменная способность при соот-

ветствующем значении pH_i ; A и B – параметры регрессии.

Содержание аминокрупп. Для определения количества аминокрупп в полимерном матриксе клеточных стенок методом неводного титрования в уксусной кислоте [15] навеску растертого и сухого препарата клеточных стенок (20 мг) заливали 7 мл 10 мМ раствора хлорной кислоты в ледяной уксусной кислоте. По истечении 2 сут образцы отделяли от раствора. До и после контакта с клеточными стенками раствор титровали 10 мМ раствором бифталата калия в ледяной уксусной кислоте в присутствии индикатора кристаллического фиолетового. Содержание свободных аминокрупп (N_{NH_2}) определяли по формуле [15]:

$$N_{NH_2} = \frac{(V_{исх} - V_{кон}) \times N_{бфк} \times V_{общ}}{V_a \times g}, \quad (6)$$

где $V_{исх}$ и $V_{кон}$ – количество бифталата калия, пошедшее на титрование исходного и конечного (после контакта с препаратами) раствора, мл; $N_{бфк}$ – нормальность бифталата калия, мМ; V_a – количество раствора, взятого для титрования, мл; $V_{общ}$ – общий объем раствора, которым заливали навеску образца, мл; g – навеска образца, г.

Весовой коэффициент набухания матрикса. Для определения в талломе водоросли весового коэффициента набухания полимерного матрикса клеточных стенок в воде и растворах набухшие в воде или растворах стандартизованные клеточные стенки обсушивали фильтровальной бумагой и определяли их сырую массу (G_F^{cw}). Затем образцы клеточных стенок высушивали при комнатной температуре и определяли их сухую массу (G_D^{cw}). Весовой коэффициент набухания стандартизованных клеточных стенок (K^{cw}) определяли по формулам [16]:

$$K^{cw} = \frac{G_F^{cw} - G_D^{cw}}{G_D^{cw}}, \quad (7)$$

где G_F и G_D – сырая и сухая масса образцов, г; индекс cw обозначает клеточную стенку.

Определение элементов. Элементный анализ таллома водоросли и выделенных из него клеточных стенок определяли на полуавтоматическом CHNS-анализаторе Perkin-Elmer 2400 (Швейцария).

Статистическая обработка. Использовали редактор Excel 7.0. Числа – средние значения из 3–8 повторностей и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные (рис. 1) показывают, что у *P. crispata* клеточные стенки характеризовались как анионо- ($S^{ан}$), так и катионообменной способностью ($S^{кат}$). В водных растворах $S^{ан}$ составляла 80, а

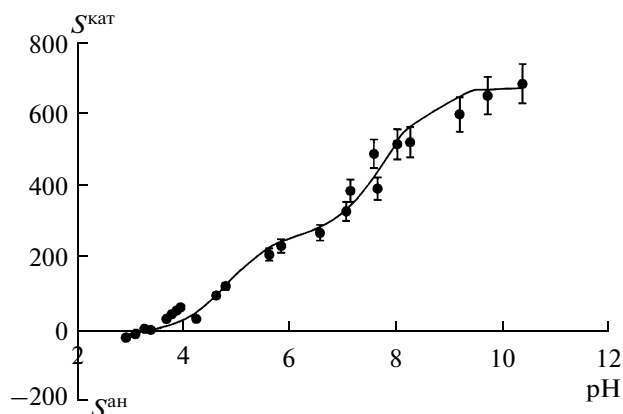


Рис. 1. Кривая потенциометрического титрования клеточных стенок, изолированных из таллома *P. crispata*. S , мкмоль/г сухой массы клеточных стенок – ионообменная способность клеточных стенок по катионам ($S^{кат}$, положительные значения) и анионам ($S^{ан}$, отрицательные значения). Сплошная линия – расчетная кривая (уравнение (6)), точки – экспериментальные данные. Бары – стандартные отклонения.

$S^{кат}$ достигала 700 мкмоль/г сухой массы клеточных стенок. Эти данные позволяют заключить, что так же, как у высших растений, клеточные стенки красной водоросли являются природным катионообменником, так как обладают, в основном, катионообменными свойствами. Но сравнительный анализ значений $S^{кат}$ и $S^{ан}$ показывает, что клеточные стенки таллома характеризуются в 1.5–2 раза меньшей сорбционной способностью и по анионам, и по катионам по сравнению с оболочками, изолированными из корней высших растений [10].

Экспериментальная кривая потенциометрического титрования для клеточных стенок *P. crispata*, так же, как и для полифункциональных ионитов, имела сложный полисигмоидный характер, что свидетельствует о наличии в полимерном матриксе нескольких типов функциональных групп. Анализ указанных зависимостей показал, что кривые имели три точки перегиба, что свидетельствует о наличии в структуре клеточных стенок красной водоросли трех типов функциональных групп. Таким образом, по дифференциальным кривым определяли число типов групп в клеточной стенке *P. crispata*, а также их количество (ΔS^j). Используя значения α_i (уравнение (2)), соответствующие им величины pH_i и уравнение (3), для каждой ионогенной группы были рассчитаны pK_a^j и n^j (табл. 1). Следует отметить, что уравнение (3) успешно используется для описания процессов кислотно-основного равновесия как в структуре полифункциональных синтетических ионообменников [14, 17], так и природных ионитов, к которым принадлежит клеточная стенка растений [10, 11, 18]. Расчеты показали, что выбранная модель полностью соответствует полученным в настоящей работе экспериментальным данным, о чем свиде-

тельствовали величины коэффициентов корреляции (r_{corr}) зависимостей $S_i^{расч} = f(S_i^{эксп})$ (рис. 2).

Таким образом, в структуре полимерного матрикса клеточных стенок *P. crispata* выявлено 3 типа ионогенных групп, которые способны принимать участие в ионообменных реакциях при соответствующих условиях.

Известно, что в клеточных стенках красных водорослей в составе кислых полисахаридов присутствуют сульфатные и карбоксильные группы. Данные элементного анализа свидетельствуют, что клеточные стенки *P. crispata* содержали 1.9% серы (табл. 2). Эти результаты соответствуют существующим представлениям о том, что сульфатированные галактаны являются важной составляющей полисахаридов красных водорослей [19, 20]. Однако предположение о том, что выявленные нами кислотные группы с $pK_a \sim 4.95$ являются сульфогруппами, не соответствует полученным экспериментальным данным (табл. 1), так как эти группы в составе полимеров характеризуются значением $pK_a \sim 1$ [16]. На основании изложенного можно заключить, что в составе сульфатированных галактанов *P. crispata* присутствуют алкилированные сульфатные группы, содержание которых достигает 600 мкмоль/г сухой массы клеточной стенки (табл. 2). Можно предположить, что у *P. crispata* эти группы участвуют в образовании сульфоновых поперечных связей между линейными полисахаридными цепями, подобно тем, которые присутствуют в синтетических сульфосодержащих ионитах [21].

Сопоставление полученных в настоящей работе значений pK_a с известными данными по химическому составу клеточных стенок красных водорослей [21] и анализ значений pK_a для различных типов групп в низкомолекулярных соединениях [22] привели нас к заключению, что группы с $pK_a \sim 4.95$ являются карбоксильными группами уроновых кислот.

Данные элементного анализа клеточной стенки и таллома *P. crispata* свидетельствуют, что важным компонентом ее полимерного матрикса является не только сера-, но и азотсодержащие полимеры, так как доля азота в стенках составляла 5.8% (табл. 2). В работе Тэлмеджа с соавт. [23] оценивали содержание белка в полимерном матриксе клеточных стенок ($G_{бел}$) по данным анализа общего азота ($N_{кc}$), проводя расчет по формуле: $G_{бел} = N_{кc} \times 6.25$. Аналогичные расчеты, проведенные для *P. crispata*, показывают, что у исследуемой красной водоросли белок является мажорным компонентом полимерного матрикса, так как его доля составляет 36% в расчете на единицу сухой массы клеточной стенки.

Известно, что белки в клеточных стенках водорослей, так же, как и в стенках высших растений, являются гликопротеинами, которые могут содержать до 10% свободных аминогрупп [24]. В соответствии с нашими данными, при титровании полимерного

Таблица 1. Параметры уравнения $pH = pK_a + \log_{10} \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right)$

для клеточных стенок *Phyllophora crispata* при ионной силе раствора 10 мМ NaCl

j	pK_a^j	n^j	R_j^2	k	ΔS^j
1	2.88 ± 0.05	0.22	0.931	5	80 ± 10
2	4.60 ± 0.03	0.939	0.961	10	260 ± 15
3	7.67 ± 0.08	1.098	0.964	10	400 ± 20

Примечание. j -тип группы; pK_a^j – константа ионизации группы j -типа; n^j – константа уравнения для группы j -типа; R_j^2 – коэффициент корреляции; ΔS^j (мкмоль/г сухой массы клеточных стенок) – количество групп j -того типа; k – количество точек на прямой; 1 – аминогруппы, 2 – карбоксильные группы уроновых кислот, 3 – катионообменные группы второго типа. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

матрикса клеточных стенок в водной среде в области $pH < 3.5$ происходит не выделение протона, а наоборот, его поглощение (рис. 1), т.е. в этой области pH происходит титрование основных групп в соответствии с реакцией: $\sim RNH_2 + HCl \rightarrow [RNH_3]^+Cl^-$, причем их количество составило 80 мкмоль/г сухой массы клеточных стенок (табл. 1). Можно полагать, что группы, выявляемые в указанной области pH ,

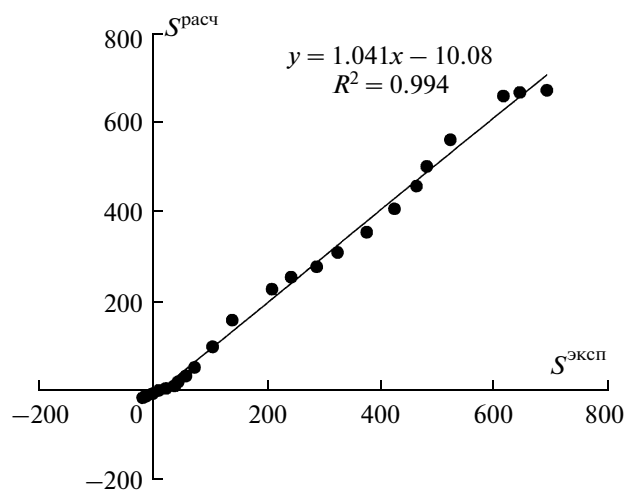


Рис. 2. Соответствие между экспериментальными и расчетными данными потенциметрического титрования клеточной стенки таллома *P. crispata*.

$S_i^{эксп}$ и $S_i^{расч}$, мкмоль/г сухой массы клеточных стенок – экспериментальная и рассчитанная по уравнению (5) ионообменная способность клеточных стенок таллома *P. crispata* при соответствующем значении pH_i . На диаграмме представлено уравнение линии тренда.

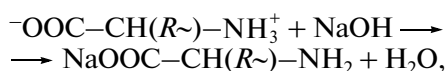
Таблица 2. Элементный анализ таллома *Phyllophora crispa* и изолированной из него клеточной стенки

Растительный материал	N(I)	C(I)	H(I)	S(I)	N(II)	S(II)
Таллом	2.98 ± 0.12	36.75 ± 0.59	6.12 ± 0.02	1.37 ± 0.19	2.13	0.43
Клеточная стенка	5.77 ± 1.00	41.37 ± 2.00	6.69 ± 0.21	1.92 ± 0.31	4.12	0.60

Примечание. Величины N(I), C(I), H(I), S(I) приведены в процентах, а N(II) и S(II) — в мМ азота и серы/г сухой массы таллома и клеточных стенок соответственно. Приведены средние значения из трех аналитических повторностей и их стандартные отклонения. I — данные элементного анализа, II — расчетные значения.

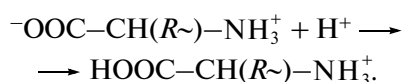
являются аминогруппами в полимерной структуре клеточной стенки, так как других основных групп в клеточной стенке не существует.

Для клеточных стенок высших растений было показано, что при титровании в водной среде происходит неполное определение аминогрупп в составе полимерного матрикса, вследствие образования внутрисолевой формы свободными аминокислотными фрагментами ($-\text{COO}^-\text{NH}_3^+$) в составе полимерного матрикса, и для полной их идентификации необходимо использовать метод неводного титрования [15]. Применение последнего к стандартизованным препаратам клеточных стенок *P. crispa* показало, что они содержат 436 ± 24 мкмоль аминогрупп/г сухой массы клеточных стенок, и это более чем в 5 раз превышает значение, полученное при титровании в водной среде. Эти данные позволяют предполагать, что, так же, как и у высших растений, в полимерном матриксе клеточных стенок красной водоросли присутствуют свободные аминокислотные фрагменты. Это предположение подкрепляется следующими данными. Число выявленных нами групп с $pK_a \sim 7.7$ составляет 420 мкмоль/г сухой массы клеточных стенок, которое в пределах погрешности эксперимента совпадает с общим содержанием аминогрупп, установленных методом неводного титрования. Далее можно полагать, что при добавлении NaOH в интервале pH 6.0–9.0, в котором мы наблюдали выделение протона, происходит депротонирование аминогрупп и одновременно разрушение цвиттер-ионной формы по реакции:



где $\text{R}\sim$ — полимерная цепь матрикса клеточной стенки.

В соответствии со значениями pK_a карбоксильной группы аминокислот ($pK_a \sim 2$; [22]) при титровании кислотой и $\text{pH} \leq 3.5$ начинается протонирование карбоксильной группы аминокислотного остатка, цвиттер-ионная форма разрушается, и аминогруппы приобретают положительный заряд:



Именно поэтому, только при концентрации HCl в среде более 0.5 мМ проявляется анионообменная способность клеточной стенки.

Степень ионизации слабых кислот и оснований, к которым относятся и ионогенные группы в полимерном матриксе клеточных стенок *P. crispa*, зависит лишь от двух факторов: от значений pH и pK_a . Последнее, как известно, является постоянной для любой кислоты или основания. Следовательно, для фиксированного значения pH степень ионизации α зависит только от природы кислоты (основания), независимо от того, была ли она предварительно нейтрализована [22]. Уравнение для расчета α выглядит следующим образом:

$$\alpha = \left\{ 1 / \left[1 + 1/10^{[(pH-pK_a)/n]} \right] \right\}, \quad (8)$$

и может быть использовано для определения α ионогенных групп клеточной стенки при соответствующих значениях pH внешней среды (рис. 3). Например, при pH 6.0 94% карбоксильных групп с $pK_a \sim 5$ ионизировано, в то время как все карбоксильные группы с $pK_a \sim 7.7$ не способны к реакциям

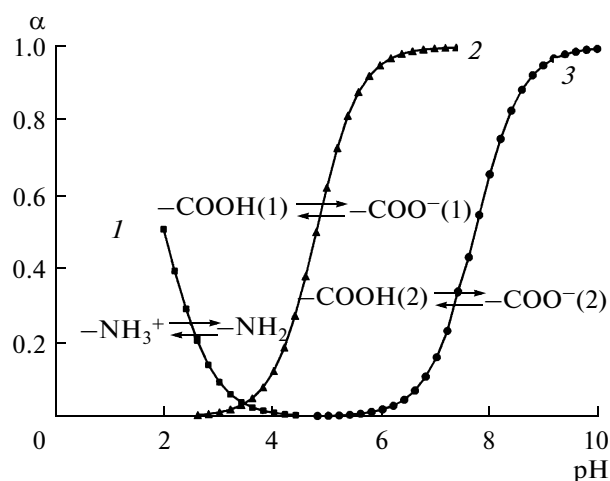


Рис. 3. Зависимость степени ионизации α различных ионогенных групп в клеточных стенках таллома *P. crispa* от pH внешнего раствора. Линии соединяют расчетные значения, которые получены по уравнению (8) с параметрами табл. 1: 1 — аминокислотные группы, 2 — карбоксильные группы; 3 — карбоксильные группы второго типа.

обмена с катионами внешней среды; при рН 8.0 обе указанные группы ионизированы на 100 и 65% соответственно. Следует отметить, что аминокислоты всегда закрыты (т.е. не диссоциированы) при физиологических условиях (рН 4.0–9.0) и, следовательно, не принимают участие в обменных реакциях с катионами внешней среды при этих условиях (рис. 3).

Одним из важных физико-химических показателей, которые количественно характеризуют свойства полимеров клеточных стенок как ионообменника, является набухание. Количественной характеристикой этого процесса служит весовой коэффициент набухания, равный отношению количества воды в полимере к 1 г его сухой массы. Причиной набухания ионообменных материалов в водном растворе является наличие гидрофильных групп, причиной нерастворимости — существование поперечных связей. Степень набухания ионообменного материала зависит от свойств ионита и состава внешнего раствора. Известно, что способность к набуханию возрастает с уменьшением степени поперечной связанности, с увеличением общего количества ионогенных групп, с увеличением степени их диссоциации, с уменьшением концентрации раствора и зависит от радиуса гидратированного иона, которым заполняется сорбент [16].

Результаты настоящего исследования показали, что величина коэффициента набухания варьирует от 1.5 до 1.9 г H_2O в расчете на единицу сухой массы клеточных стенок в интервале рН 4.0–10.0 (рис. 4). Основываясь на знаниях о физико-химических закономерностях набухания синтетических ионообменных материалов можно полагать, что главный фактор, который определяет способность к набуханию — это степень сшивки полимерных цепей в структуре клеточных стенок. Этот параметр невозможно определить экспериментальным путем, однако есть возможность оценить его величину непосредственным методом [14].

В соответствии с данными о набухании клеточных стенок высших растений [10] и результатами настоящей работы можно полагать, что у *P. crista* степень сшивки полимерных цепей в клеточных стенках выше по сравнению с корнями растений. Этот вывод следует из сравнительного анализа значений коэффициента набухания в растворах, который свидетельствует, что у красной водоросли этот параметр в 2–10 раз меньше, чем у высших растений. Полученные результаты показывают, что, в отличие от высших растений, у *P. crista* объем клеточных стенок варьирует в небольших пределах и мало зависит от ионных условий и рН в среде (рис. 4).

Таким образом, мы установили, что ионообменные свойства полимерного матрикса клеточной стенки *P. crista* обусловлены присутствием в ее составе двух типов катионообменных групп, которые способны принимать участие в обменных реакциях с ионами окружающей среды. Это карбоксильные

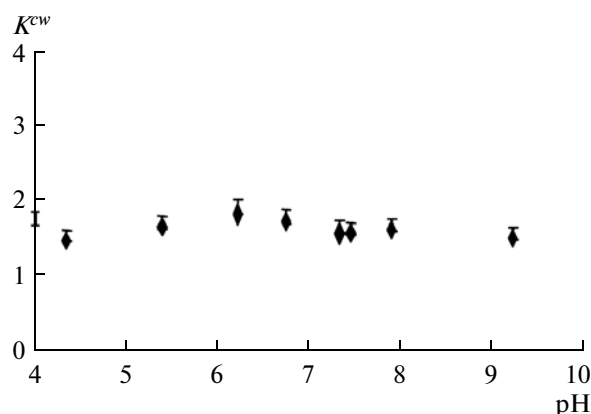


Рис. 4. Зависимость коэффициента набухания K^{cw} клеточных стенок, изолированных из таллома *P. crista*, от рН внешнего раствора. Значения K^{cw} выражены в г H_2O в расчете на 1 г сухой массы клеточных стенок. Бары — стандартные отклонения.

группы урновых кислот и карбоксильные группы, принадлежащие, вероятно, аминокислотным фрагментам. По-видимому, отличие в физико-химических свойствах внеклеточного матрикса красных водорослей и наземных высших растений является отражением не столько их таксономического положения, сколько различных условий обитания и различий в способах переноса воды и ионов от мест поглощения к местам утилизации.

Разработанный подход к количественной оценке ионообменных свойств полимерного матрикса клеточных стенок *P. crista* может быть применен к определению аналогичных свойств у других видов водорослей. Учитывая, что именно внеклеточный матрикс за счет механизмов ионного обмена выступает как сорбент, количественные показатели, характеризующие сорбционные свойства клеточных стенок других видов водорослей, могут быть использованы при их отборе в качестве объектов экологического мониторинга и биосорбентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 04-04-49379-а и № 08-04-01398-а) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” по направлению “Клеточные технологии” (Государственный контракт № П-403).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимова О.В. // Биология черноморских агарофитов. М.: ИОРАН, 1993. С. 7–24.
2. Возжинская В.Б., Камнев А.Н. Эколого-биологические основы культивирования и использования морских донных водорослей. М.: Наука, 1994. 202 с.
3. Бурдин К.С. Основы биологического мониторинга. М.: МГУ, 1985. 248 с.

4. Камнев А.Н., Воскобойников Г.М., Вершинин А.О., Жильцова Л.В., Возжинская В.Б. // Биология черноморских агарофитов. М.: ИОРАН, 1993. С. 141–162.
5. Torcuoglu S., Guven K.C., Balks N., Krbasoglu C. // Chemosphere. 2003. V. 52. № 10. P. 1683–1688.
6. Vilar V.J.P., Botelho C.M.S., Boaventura R.A.R. // Water Res. 2006. V. 40. № 2. P. 291–302.
7. Murphy V., Hughes H., McLoughlin P. // Water Res. 2007. V. 41. № 4. P. 731–740.
8. Garca-Ros V., Freile-Pelegn Y., Robledo D., Mendoza-Cozatl D., Moreno-Sanchez R., Gold-Bouchot G. // Aquatic Toxicol. 2007. V. 81. № 1. P. 65–72.
9. Herrero R., Lodeiro P., Rojo R., Ciorba A., Rodrriguez P., Sastre de Vicente M.E. // Bioresource Technol. 2008. V. 99. № 10. P. 4138–4146.
10. Meychik N.R., Yermakov I.P. // Plant and Soil. 2001. V. 234. № 2. P. 181–193.
11. Meychik N.R., Nikolaeva J.I., Yermakov I.P. // Plant and Soil. 2005. V. 277. № 1–2. P. 163–174.
12. Калугина-Гутник А.А. Фитобентос Черного моря. Киев: Наукова Думка, 1975. 248 с.
13. Шатаева Л.А., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Е. Карбоксильные иониты в биологии. Л.: Наука, 1979. 286 с.
14. Лейкин Ю.А., Мейчик Н.Р., Соловьев В.К. // Журн. физич. химии. 1978. Т. 52. № 7. С. 1420–1424.
15. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Ермаков И.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 8. С. 1145–1151.
16. Гельферих Ф. Иониты. М.: Иностранная литература, 1962. 490 с.
17. Мейчик Н.Р., Лейкин Ю.А., Гейнрих И.А. // Журн. физич. химии. 1989. Т. 63. № 8. С. 2164–2168.
18. Meychik N.R., Yermakov I.P. // Plant and Soil. 1999. V. 217. № 1–2. P. 257–264.
19. Kloareg B., Quatrano R. // Oceanorg. Mar. Biol. Ann. Rev. 1988. V. 26. P. 259–315.
20. Усов А.И. // Морские прибрежные экосистемы: водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки. Матер. II между. научно-практической конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2002. С. 38–52.
21. Тверской В.А., Федотов Ю.А., Вдовин П.А., Дубяга В.П. // Мембраны. Сер. Критические технологии. 2007. Т. 36. № 1. С. 17–40.
22. Альберт А., Сержент Е. Константы ионизации кислот и оснований. Л.: Химия, 1964. 140 с.
23. Talmadge K.W., Keegstra K., Bauer W.D., Albersheim P. // Plant Physiol. 1973. V. 51. № 1. P. 158–173.
24. Gassab G.I. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. V. 49. P. 281–309.

Ion-Exchange Properties of Cell Walls of Red Seaweed *Phyllophora crispa*

N. R. Meichik, N. I. Popova, Yu. I. Nikolaeva, I. P. Yermakov, and A. N. Kamnev

Department of Plant Physiology, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: meychik@mail.ru

Received June 20, 2010

Abstract—Research into ion-exchange properties of cell walls isolated from thallus of red seaweed *Phyllophora crispa* was carried out. Ion-exchange capacity and the swelling coefficient of the red alga cell walls were estimated at various pH values (from 2 to 12) and at constant ionic strength of a solution (10 mM). It was established that behavior of cell walls as ion-exchangers is caused by the presence in their matrix of two types of cation-exchange groups and amino groups. The amount of the functional group of each type was estimated, and the corresponding values of pK_a were calculated. It can be assumed that ionogenic groups with $pK_a \sim 5$ are carboxyl groups of uronic acids, and ionogenic groups with $pK_a \sim 7.5$ are carboxyl groups of the proteins. Intervals of pH in which cation-exchange groups are ionized and can take part in exchange reactions with cations in the environment are defined. It was found that protein was a major component of cell wall polymeric matrix because its content was 36%.

УДК 581.192.7:633.912.11

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭТИЛЕНА И АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ В ПЛОДАХ ЯБЛОНИ И БАНАНА ПРИ ДЕЙСТВИИ СТИМУЛЯТОРОВ И ИНГИБИТОРОВ БИОСИНТЕЗА ЭТИЛЕНА

© 2011 г. Е. А. Буланцева, М. А. Проценко, А. С. Торопкина, Н. П. Кораблёва

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

e-mail: protsenko@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 9.07.2010 г.

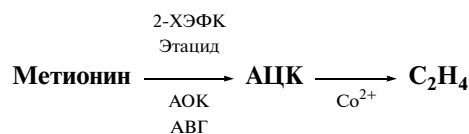
Обработка плодов яблони и банана препаратами 2-хлорэтилфосфоновая кислота и этацид индуцировала выделение этилена, вызывая ускорение созревания, а также накопление 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты в плодах яблони. Ингибиторы аминоксиуксусная кислота, аминоэтоксивинилглицин и CoCl_2 проявляли действие на разных этапах биосинтеза этилена, задерживая физиологический процесс старения, что приводило к увеличению продолжительности хранения. Обработка астаксантином и бутилоксианизолом увеличивала время до появления пика выделения этилена плодами. Содержание белкового ингибитора полигалактуроназы (БИПГ) коррелировало с интенсивностью выделения этилена. Поражаемость плодов фитопатогенными микроорганизмами снижалась в результате ингибирования активности полигалактуроназы патогенов. Динамика активности БИПГ в плодах свидетельствует о его важной роли в комплексе процессов созревания.

В высших растениях функционирует гормональная система, координирующая их рост и развитие. Фитогормон этилен участвует во многих физиологических процессах, включая созревание, старение и устойчивость к заболеваниям сочных запасующих органов [1]. Регуляция биосинтеза этилена в сочных плодах может повлиять на темпы созревания плодов и длительность их послеуборочного хранения.

В тканях незрелых плодов функционирует так называемая “система 1 биосинтеза этилена”, обеспечивающая образование незначительного количества эндогенного этилена. По мере созревания концентрация этилена постепенно повышается и достигает некоторого порогового уровня, вслед за чем начинается массивный его синтез. Это явление связывают с активированием “системы 2 биосинтеза этилена” – метионинового цикла [2]. В метиониновом цикле образуется предшественник этилена – 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АЦК). Накопление АЦК в плодах может быть вызвано также экзогенным внесением этилена. Изменить интенсивность образования этилена можно с помощью метаболических ингибиторов или физиологически активных соединений (ФАС) различной химической природы – продуцентов этилена, антиоксидантов и др. К метаболическим ингибиторам относятся: аминоксиуксусная кислота (АОК) – специфические ингибиторы синтазы АЦК, и хлористый кобальт (CoCl_2) – ингибирующий биосинтез этилена на эта-

пе превращения АЦК в этилен. Одним из продуцентов этилена является 2-хлорэтилфосфоновая кислота (2-ХЭФК), который можно использовать как самостоятельно, так и в составе комплексных препаратов. К числу препаратов нового поколения относится этацид, содержащий 2-ХЭФК и антибиотический компонент метацид. При разложении 2-ХЭФК выделяется этилен, который служит триггером запуска системы 2 биосинтеза этилена, вызывая ускорение созревания плодов.

Ниже приведена схема биосинтеза этилена в плодах с обозначением этапов, на которые действуют ингибиторы биосинтеза этилена и ФАС.



Обнаружена способность некоторых антиоксидантов ингибировать синтез этилена и влиять на длительность хранения плодов [3]. Свойства, характерные для таких антиоксидантов, проявляют астаксантин и бутилоксианизол (БОА). Астаксантин относится к семейству каротиноидов. По структуре молекулы он похож на другой каротиноид – бета-каротин, отличаясь наличием двух дополнительных атомов кислорода на каждом из колец. Эти дополнительные функциональные группы увеличивают антиоксидантные свойства астаксантина и придают ему иммуностимулирующие и антибактериальные

свойства. Действие препарата астаксантин основано на подавлении скорости инициации и образования перекисных радикалов [3, 4]. Представляет интерес изучение действия астаксантина и БОА на образование этилена в плодах.

Размягчение тканей при созревании сочных плодов связывают с активностью полигалактуроназы (ПГ – поли-[1,4- α -D-галактуронид]гликаногидролазы; КФ 3.2.1.15), повышение которой отмечено в зрелых сочных плодах многих растений [5]. ПГ, секретируемая патогенными организмами, служит одним из основных факторов, способствующих разрушению клеточных стенок и внедрению микроорганизмов в ткани растения [6]. Белковый ингибитор полигалактуроназы (БИПГ) снижает активность ПГ и может играть важную роль как при формировании качества плодов, так и в процессах, связанных с их устойчивостью к поражению микроорганизмами [7, 8]. Исследование биосинтеза этилена одновременно с определением активности БИПГ под влиянием обработок ФАС позволяет получить новые данные о молекулярных механизмах созревания и иммунитета растений, а также предложить биотехнологические приемы оптимизации этих функций.

Цель работы – изучение действия метаболических ингибиторов биосинтеза этилена, продуцентов этилена и антиоксидантов на выделение этилена, активность БИПГ, темпы созревания и степень устойчивости плодов яблони и банана к поражению фитопатогенными микроорганизмами.

МЕТОДИКА

Для экспериментов использовали плоды яблони (*Malus domestica* Borkh.) сортов Мантуанское и Антоновка, кожуру и мякоть плодов банана (*Musa acuminata* Colla) сортов Кавендиш и Королевский. Для проведения работы отбирали здоровые плоды, одинаковые по размеру, без механических повреждений, равномерно окрашенные. Степень зрелости плодов яблони обозначали как фазы созревания (I, II, III), которые характеризовали по интенсивности выделения этилена, а степень зрелости бананов определяли в зависимости от окраски: А – светло-зеленые, Б – светло-желтые и В – ярко-желтые.

Для тестирования устойчивости растений использовали плоды яблони, которые заражали фитопатогенными грибами, выделенными из пораженных растений. Интенсивность поражения тканей плодов при искусственном заражении оценивали измеряя радиус пятна поражения [9].

В процессе хранения определяли содержание этилена в плодах яблони и банана для оценки их физиологического состояния и соотносили с результатами анализа активности БИПГ. Этилен в пробах определяли методом ГЖХ. Для этого плоды на 1 сут

помещали в эксикаторы с газоотводной трубкой для отбора пробы газа. Для более детального исследования механизма действия регуляторов роста использовали экспериментальную модель – тонкий срез ткани плода толщиной 0.2–0.3 см и диаметром 1 см, общим весом около 1 г. 20 дисков инкубировали в 0.1 М фосфатном буфере (pH 4.5) в сосудиках емкостью 20 мл с газоотводной трубкой. Модель реагировала на внесение препаратов изменением содержания этилена. 1 мл пробы газа вводили в газовый хроматограф GC 2010 с масс-спектрометрическим детектором GCMS QP 2010, (“Shimadzu”, Япония). Колонка капиллярная MDN-1 (связанный неполярный метилсиликон) длиной 30 м, диаметром 0.32 мм. Газ-носитель – гелий. Режим деления потока 1 : 25, проток по колонке 1.8 мл/мин. Температуры: колонки – изотермический режим 40°C, инжектора 120°C, детектора 200°C. Этилен определяли по времени выхода – 1.2 мин [10].

Препараты, содержащие ПГ, получали путем осаждения сульфатом аммония 90%-ного насыщения из культурального фильтрата после выращивания грибов в течение 7 сут на качалке в жидкой среде с пектином [11]. Активность ПГ определяли “чашечным” методом [12]. Для этого делали лунки в слое геля, содержащего 1% агарозы, 0.05% деметоксированного яблочного пектина, 0.5% оксалата аммония, 0.01 М ЭДТА в 0.1 М ацетатном буфере, pH 5.2. В лунки вносили препараты БИПГ и ПГ. После инкубирования в течение 1 сут при 34°C гель обрабатывали 1%-ным раствором цетавлона (цетилтриметиламмоний бромистый). Активность ПГ проявлялась вокруг лунок в виде прозрачных ореолов на молочно-белом фоне. Ее оценивали по радиусу (R) прозрачной зоны вокруг лунки.

Для получения препаратов БИПГ гомогенат ткани растения промывали 20 мМ ацетатным буфером, pH 5.2, содержащим 2 мМ меркаптоэтанол (“Sigma”, США) и 0.2% Na₂S₂O₅ [13] и экстрагировали таким же буфером с добавлением 1 М NaCl. Из экстракта материал осаждали при 90%-ном насыщении (NH₄)₂SO₄. Осадок растворяли в минимальном количестве ацетатного буфера и диализовали против дистиллированной воды в течение 1 сут.

Ингибирующее действие препаратов БИПГ определяли по снижению активности ПГ тест-объекта – *Verticillium dahliae* Kleb. Интенсивность действия БИПГ выражали в условных единицах, рассчитанных как процент уменьшения под действием БИПГ радиуса обесцвеченной зоны, отнесенный к массе сырой ткани, из которой получен препарат. Данные, характеризующие активность БИПГ, отражают его содержание в исследуемых тканях.

Плоды обрабатывали растворами этиленпродуцентов (500 мг/л) или ингибиторов биосинтеза

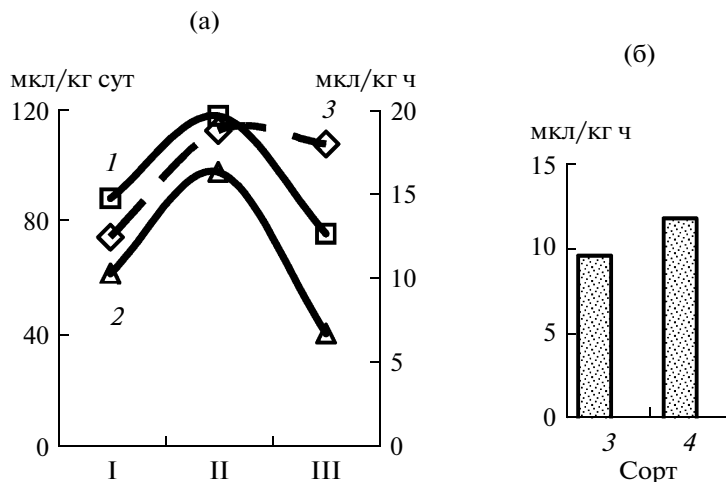


Рис. 1. Выделение этилена плодами яблони (а, мкл/кг-сут) и банана (б, мкл/кг ч) разных сортов при трех стадиях созревания (I, II, III). Яблоко: 1 – Мантуанское, 2 – Антоновка; банан: 3 – Кавендиш; 4 – Королевский.

этилена ($\text{CoCl}_2 - 10^{-3} \text{ M}$, АВГ – $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, АОК – 10^{-3} M).

Астаксантин использовали в виде комплекса, содержащего циклодекстрин и 8% астаксантина, что позволяло растворить препарат в воде при 40°C . Для обработки плодов бутилоксианизолом применяли 0.01%-ный раствор в воде с 96%-ным этанолом (в соотношении 10 : 1), контролем служил раствор спирта в воде. В остальных случаях контролем служили плоды, обработанные водой. После обработки все плоды обсушивали на воздухе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При созревании плодов яблони и банана в процессе хранения выявлено увеличение интенсивности биосинтеза этилена до максимума при достижении плодами физиологической зрелости, и постепенное его снижение при дальнейшем старении плодов (рис. 1а). Плоды банана несколько различались по интенсивности выделения этилена в зависимости от сорта (рис. 1б). При этом выделение этилена плодами банана было существенно ниже. Кривые выделения этилена целыми плодами и дисками имели куполообразную форму.

Отмечено увеличение содержания АЦК по мере созревания плодов (рис. 2). Сопоставление данных о влиянии препаратов, выделяющих этилен, на изменение содержания АЦК с данными об их влиянии на выделение этилена показало, что оба процесса активировались после лаг-периода, составляющего около 3 ч.

Содержание БИПГ изменялось по-разному в плодах яблони разных сортов в процессе роста на дереве и затем после съема, однако выявлены некото-

рые общие закономерности (рис. 3). Отмечены два основных пика увеличения содержания БИПГ. Один, меньший, проявлялся ко времени окончания роста плодов, но до наступления технической зрелости. Второй, значительно больший, обнаружен в период дозревания после съема плодов. Эти пики выявлялись как у поздних сортов, так и у ранних, изменялись только сроки их появления.

В плодах банана отмечена высокая активность ПГ в мякоти плодов. В кожуре она не выявлялась, хотя обнаружено существенное содержание БИПГ (рис. 4).

Обработка плодов яблони 2-ХЭФК и этацидом увеличивала выделение этилена в среднем на 20–25% в зависимости от сорта и физиологического состояния плодов и вызывала снижение ингибирующе-

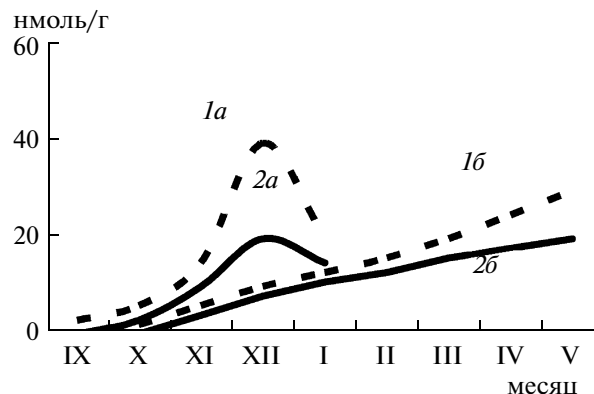


Рис. 2. Содержание АЦК (нмоль/г) в плодах яблони Антоновка (а) и Мантуанское (б) в процессе хранения и при действии ингибитора биосинтеза этилена: 1 – контроль; 2 – АВГ.

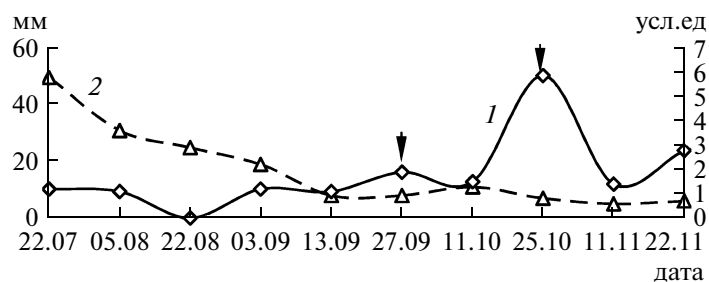


Рис. 3. Активность БИПГ в плодах яблони Антоновка в процессе созревания и интенсивность поражения их *M. fructigena*: 1 – активность БИПГ, усл.ед; 2 – интенсивность поражения, мм. Стрелками обозначены пики повышения активности БИПГ.

шего действия БИПГ, которое в контроле значительно возрастало во время II фазы созревания (рис. 5).

В плодах банана, находящихся в различном физиологическом состоянии, препараты, выделяющие этилен – 2-ХЭФК и этацид, вызывали увеличение выделения этилена: у плодов степени зрелости А и Б в среднем на 25–30%, В – на 10% (рис. 6а). При этом стимулировались одновременно созревания и выравнивание окраски плодов, что важно для их товарного вида. Важно отметить, что у бананов степени зрелости А и Б, обработанных этацидом, в течение последующих 10 сут хранения при комнатной температуре микробиологическое поражение не превышало 5%, тогда как в контрольных образцах составляло 10%. По-видимому, такое действие связано с антисептическими свойствами метацида [4].

Содержание БИПГ в препаратах из кожуры плодов банана на стадии А повышалось при действии 2-ХЭФК. Оно достигало максимальной величины на стадии Б и сильно снижалось на стадии В. Обработка этацидом приводила к снижению содержания БИПГ по сравнению с препаратами из кожуры кон-

трольных плодов. Возможно, что бактерицидный компонент вызывает некоторые биохимические изменения в кожее плодов банана (рис. 6б).

Проведенные исследования показали, что препараты, выделяющие этилен, оказывают влияние на систему биосинтеза этилена и содержание БИПГ в плодах, находящихся на различных стадиях созревания.

Инкубация ткани яблок двух сортов с АВГ в течение 1 ч уменьшала содержание АЦК в среднем на 30% (рис. 2). Эффективность обработки различалась в зависимости от сорта, определялась уровнем АЦК, предсуществующим в ткани, и зависела от сроков созревания разных сортов (стадия старения плодов Антоновки наступает в ноябре–декабре, а зимнего сорта Мантуанское – в апреле–мае).

При обработке целых плодов сорта Мантуанское раствором АВГ активность БИПГ в период II стадии созревания оказалась более высокой по сравнению с контролем (рис. 7). Поскольку эти изменения были наиболее выражены во II стадии созревания, характеризующейся пиком выделения этилена, очевидно

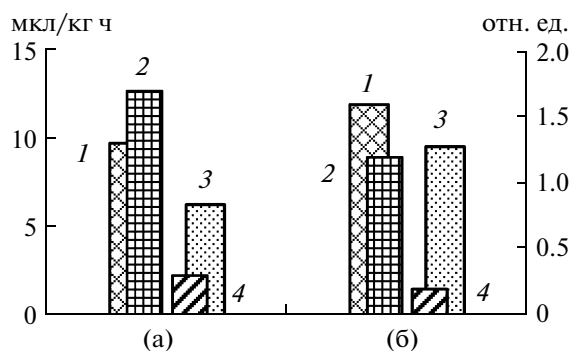


Рис. 4. Выделение этилена плодами банана (мкл/кг ч), содержание в них БИПГ (отн. ед.) и активность ПГ (R – радиус обесцвеченной зоны): (а) – Кавендиш, (б) – Королевский; 1 – этилен; 2 – БИПГ, кожура; 3 – БИПГ, мякоть; 4 – ПГ, мякоть.

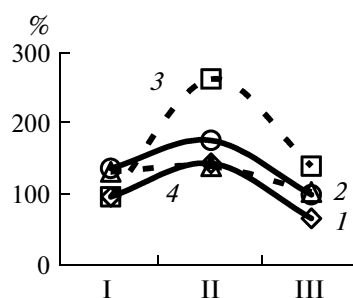


Рис. 5. Действие 2-ХЭФК на выделение этилена плодами яблони сорта Антоновка и активность БИПГ на разных стадиях созревания (I, II, III). За 100% приняты значения, полученные для контрольных плодов, находящихся в I фазе созревания: 1 – этилен, контроль; 2 – этилен, 2-ХЭФК; 3 – БИПГ, контроль; 4 – БИПГ, 2-ХЭФК.

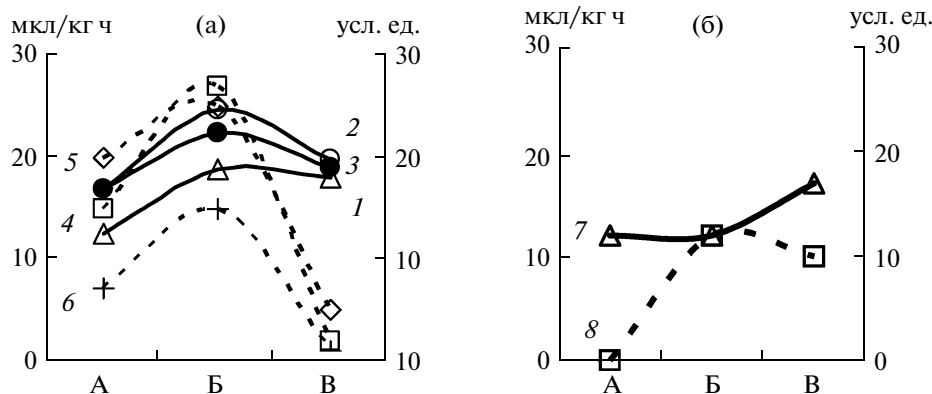


Рис. 6. Выделение этилена (мкл/кг ч) и активность БИПГ (усл. ед.) в плодах банана разной степени зрелости (А, Б, В), обработанных стимуляторами (а) и ингибитором (б) биосинтеза этилена. Этилен: 1 – контроль, 2 – 2-ХЭФК, 3 – этацид, 7 – АОК. БИПГ: 4 – контроль, 5 – 2-ХЭФК, 6 – этацид, 8 – АОК.

участие БИПГ в процессе послеуборочного дозревания плодов яблони.

Действие 10^{-3} М АОК подавляло выделение этилена целыми плодами Антоновки на 25–30%. Инкубация дисков из кожицы яблок в присутствии АОК снижала накопление АЦК.

Эффективность обработки бананов АОК наблюдалась только у плодов степени зрелости Б – выделение этилена снижалось примерно на 30%; у плодов зрелости А и В снижение не превышало 5%. Снижение интенсивности выделения этилена у плодов зрелости Б предотвращало преждевременное перезревание бананов, что важно для сохранения продукции в предреализационный период (рис. 8).

Содержание БИПГ в плодах банана снижалось при обработке АОК по сравнению с контролем (рис. 8) как на стадии А, так и Б. Это снижение было сопоставимо с вызываемым при действии этацида. Очевидно, участие БИПГ в процессах созревания плодов не связано непосредственно с интенсивно-

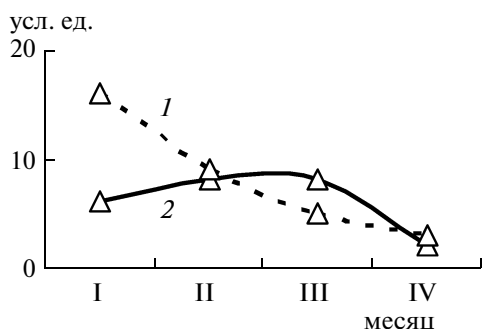


Рис. 7. Активность БИПГ (усл. ед.) в плодах яблони сорта Мантуанское, обработанных АВГ: 1 – контроль; 2 – АВГ.

стью выделения этилена, хотя его содержание повышалось во время II фазы созревания. Высказывается мнение о перспективности применения АОК в качестве экологически чистого потенциального ингибитора созревания плодов с целью увеличения длительности их хранения.

Co^{2+} ингибировал превращение АЦК в этилен, что приводило к снижению накопления этилена (рис. 9). Действие Co^{2+} зависело от продолжительности инкубации и от стадии зрелости. Как видно из рисунка, плоды фазы созревания I и II более чувствительны к действию Co^{2+} , нежели плоды, находящиеся в стадии старения.

Содержание БИПГ в обработанных Co^{2+} плодах прямо противоположно его содержанию в контроле. БИПГ локализуется в апопласте, связываясь с клеточной стенкой [14, 15]. Однако изменение актив-

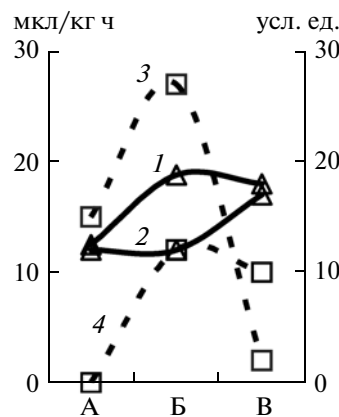


Рис. 8. Содержание этилена (мкл/кг ч) и активность БИПГ (усл. ед.) в плодах банана разной степени зрелости (А, Б, В), обработанных АОК. Этилен: 1 – контроль, 2 – АОК. БИПГ: 3 – контроль, 4 – АОК.

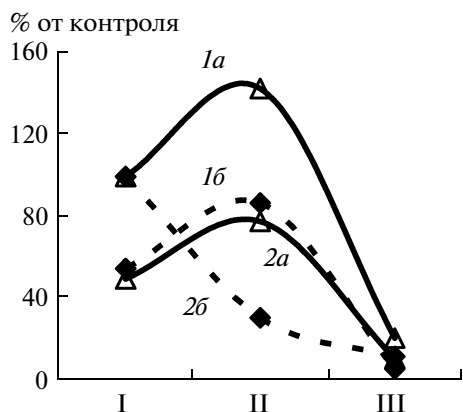


Рис. 9. Влияние Co^{2+} на интенсивность выделения этилена (1) и содержание БИПГ (2) в плодах яблони сорта Мантуанское в разные фазы созревания (I, II, III) (% от контроля, как на рис. 5): а – контроль, б – Co^{2+} .

ности БИПГ, по-видимому, не связано непосредственно с процессами, обуславливающими интенсификацию выделения этилена.

Из проведенных экспериментов следует, что АОК, АВГ и Co^{2+} ингибируют выделение этилена на разных этапах его биосинтеза, что приводит к замедлению созревания плодов.

В первые дни после обработки БОА повышалось выделение этилена целыми плодами яблони (рис. 10), а затем интенсивность биосинтеза этилена снижалась по сравнению с контролем, что приводит к замедлению процесса созревания. В экспериментах с дисками из кожицы плодов также отмечено ингибирование биосинтеза этилена при действии БОА, которое проявлялось в первые сутки. Обработка БОА препятствовала развитию физиологического забо-

левания “загара” и побурению целых плодов при хранении [4], что позволяет использовать препарат для улучшения лежкости плодов, при этом оптимальным оказался 0.01%-ный раствор препарата, обеспечивший сохранение товарного вида плодов.

Обработка 0.02%-ным раствором астаксантина плодов яблони сорта Антоновка через 2 нед после сбора снижала выделение этилена и отодвигала его пик на 5 сут (рис. 11). Поражаемость плодов яблони микробиологическими заболеваниями снизилась на 10–15% за 1 месяц хранения.

В плодах банана астаксантин задерживал пик выделения этилена на 3 сут по сравнению с контролем. Обработанные плоды бананов, хранившиеся 14 сут при комнатной температуре, сохраняли тургор. Другие обработанные плоды, хранившиеся при 10°C , нуждались еще в 2–3-суточном дозревании перед реализацией. Поражение микробиологическими заболеваниями плодов банана, обработанных астаксантином и хранящихся при комнатной температуре, не превышало 5%, а при 10°C снизилось до 1%, в контроле таких плодов было около 10%.

Определено ингибирующее действие БИПГ, выделенного из плодов яблони, на ПГ патогенов яблوك (*Monilia fructigena* Pers.), бананов (*Gloeosporium musarum* Sck. et Mass.) и других растений (*Verticillium dahliae* Kleb., *Penicillium* sp.). Как видно из рис. 12, БИПГ из яблук двух сортов по-разному ингибировал ПГ фитопатогенных грибов. При этом интенсивное ингибирующее действие, как правило, коррелировало со слабым поражением тканей плодов, что подтверждает участие БИПГ в повышении устойчивости растений к заболеваниям.

Таким образом, содержание БИПГ коррелировало с интенсивностью выделения этилена, характеризую физиологическое состояние плода, соответ-

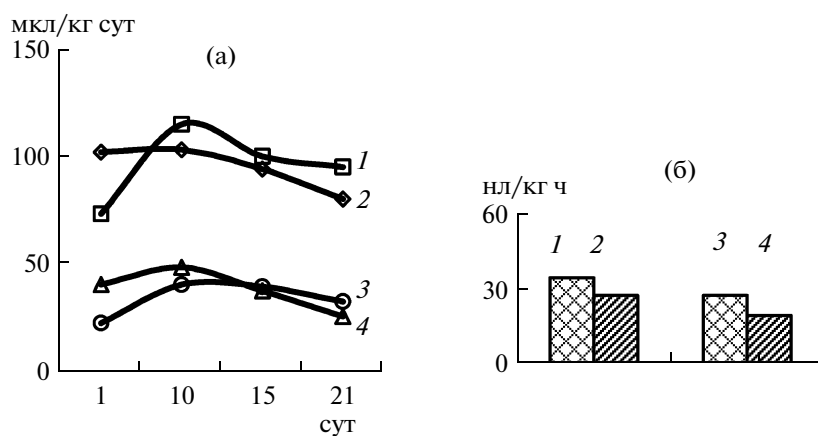


Рис. 10. Выделение этилена (мкл/кг сут) целыми плодами (а) и дисками из кожицы (б) яблони сортов Антоновка (1, 2) и Симиренко (3, 4), обработанными раствором БОА: 1, 3 – БОА; 2, 4 – контроль.

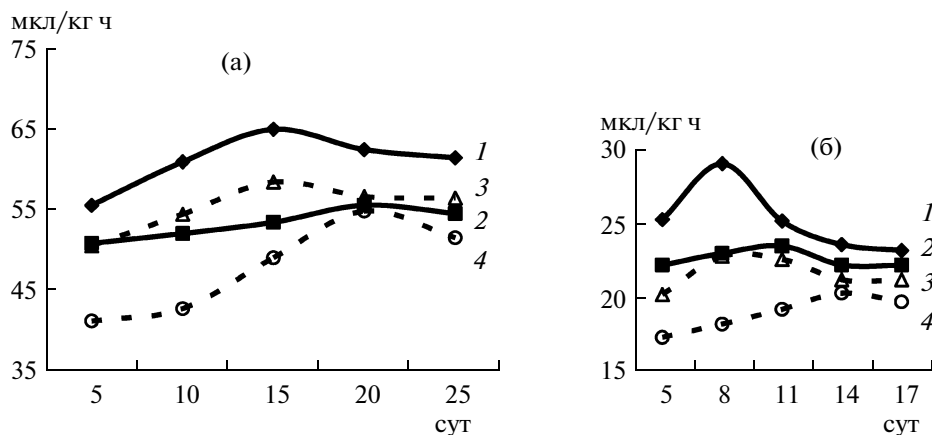


Рис. 11. Выделение этилена плодами яблони (Антоновка, а) и банана (Кавендиш, б), хранящимися при 18°C (1, 2) и 4°C (3, 4), и обработанными астаксантином: 1, 3 – контроль; 2, 4 – астаксантин.

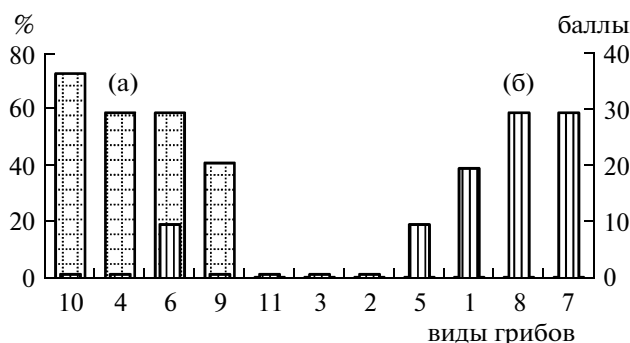


Рис. 12. Действие БИПГ из яблок на ПГ разных фитопатогенных грибов (а, % ингибирования) и интенсивность поражения яблок этими грибами (б, баллы заражения). Виды грибов обозначены номерами в соответствии с алфавитным списком: 1 – *Alternaria* sp. (томат); 2 – *Botrytis cinerea* Pers. (лук); 3 – *B. cinerea* (малина); 4 – *Fusarium graminearum* Schwabe (пшеница); 5 – *Fusarium* sp. (картофель); 6 – *Fusarium* sp. (томат); 7 – *M. fructigena* (яблоки); 8 – *Penicillium* sp. (лимон); 9 – *Septoria nodorum* Berk.; 10 – *V. dahliae* (хлопчатник); 11 – *Verticillium* sp. (картофель).

ствующее степени его зрелости. Ингибирующее действие БИПГ на ПГ фитопатогенных микроорганизмов способствовало снижению поражаемости плодов при хранении.

Результаты проведенных экспериментов показывают, что с помощью метаболитических ингибиторов и ФАС можно регулировать темпы созревания плодов яблони и банана, а также их устойчивость к болезням. Полученные биологические параметры применения изученных нами ФАС будут использованы при разработке новых биотехнологий повышения лежкоспособности плодов и прогнозирования длительности их хранения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pathak N., Asif M.H., Dhawan P., Srivastava M.K., Nath P. // Plant Growth Regulation. 2003 V. 40. № 1. P. 11–19.

2. Yang S.F., Hoffman N.E. // Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 1984. V. 35. P. 155–189.
 3. Michaeli R., Philosoph-Hadas S., Riov I., Meir S. // Physiologia Plantarum. 1999. V. 107. № 1. P. 166–173.
 4. Черных А.С., Буланцева Е.А., Шапошников Г.Л., Серебряный А.М., Проценко М.А., Салькова Е.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 3. С. 366–369.
 5. Jones T.M., Anderson A.J., Albersheim P. // Physiol. Plant Pathol. 1972. V. 2. № 2. P. 153–166.
 6. Hadfield K.A., Bennett A.B. // Plant Physiol. 1998. V. 117. № 2. P. 337–343.
 7. De Lorenzo G., D'Ovidio R., Cervone F. // Annu. Rev. Phytopathol. 2001. V. 39. P. 313–335.
 8. Проценко М.А., Буланцева Е.А., Короблёва Н.П. // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 3. С. 1–8.
 9. Буза Н.Л., Криницына А.А., Проценко М.А., Вартапетян В.В. // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38. № 5. С. 62–66.

10. Буланцева Е.А., Нгуен ТьенТханг, Ружицкий А.О., Проценко М.А., Кorableва Н.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 1. С. 104–108.
11. Гладких Т.А., Васильева К.В., Метлицкий Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1978. Т. 14. № 6. С. 833–848.
12. Dingle J., Reid W.W., Solomonos G.L. // J. Sci. Food. Agric. 1953. V. 4. № 2. P. 149–153.
13. Глинка Е.М., Гладких Т.А., Проценко М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1997. Т. 33. № 5. С. 503–507.
14. Ahsan N., Yoon H.-S., Jo J. // Plant Science. 2005. V. 169. № 6. P. 1081–1089.
15. Проценко М.А., Буза Н.Л., Криницына А.А., Буланцева Е.А., Кorableва Н.П. // Биохимия. 2008. Т. 73. № 10. С. 1317–1328.

The Effect of Physiologically Active Compounds on the Production of Ethylene and the Activity of Polygalacturonase Inhibiting Protein in Fruits

E. A. Bulantseva, M. A. Protsenko, A. S. Toropkina, and N. P. Korableva

Bach Research Institute for Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

e-mail: protsenko@inbi.ras.ru

Received July 9, 2010

Abstract—The treatment of apple and banana fruits with 2-CEFA and ethacrydine induced the production of ethylene and accelerated the ripening and accumulation of ACC in apple fruits. Inhibitors AOA, AVG, and CoCl₂ acted at the different steps of ethylene biosynthesis, inhibited the physiological aging process and increased storage longevity. Treatment with astaxanthine and BOA delayed the pick of ethylene production by fruits. The content of PGIP was correlated with intensity of ethylene production. The infection of fruits with phytopathogenic microorganisms lowered as the result of the inhibition of pathogen PG. The dynamics of PGIP activity in fruits suggests its important role in the processes of ripening.

УДК 581.19;577.1

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РАСТЕНИЯ–КОНЦЕНТРАТОРЫ И СВЕРХКОНЦЕНТРАТОРЫ МЕДИ И ЕЕ РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ ЭТИХ ВИДОВ

© 2011 г. М. Я. Ловкова*, Г. Н. Бузук**

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071 Россия
e-mail: inbi@inbi-ras.ru

**Витебский медицинский университет, Витебск, Белоруссия
e-mail: buzukg@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.2010 г.

Методом атомной абсорбции в сочетании со спектрофотометрией проведено тестирование лекарственных растений флоры России (~200 видов) на содержание меди (Cu), выявлены 36 видов – концентраторов и сверхконцентраторов этого элемента. Сопоставлена способность этих видов накапливать Cu с синтезом физиологически активных соединений (ФАС), преобладающими среди которых являются алкалоиды и фенольные соединения. Установлено стимулирующее влияние Cu на образование и накопление алкалоидов основных структурных типов – производных хинолизидина, изохинолина, тропана и индола. Обобщены данные о роли Cu-содержащих ферментов в метаболизме алкалоидов, а также фенольных соединений на примере флавоноидов. Обсуждается роль сконцентрированной меди в лечебном эффекте лекарственных растений и возникающей в связи с этим перспективы расширения спектра их применения, особенно в тех случаях, когда направленность действия ФАС и Cu различны.

Медь является одним из важнейших эссенциальных элементов. Ее главная функция в метаболизме человека, животных и растений – участие в окислительно-восстановительных процессах. В качестве кофермента Cu входит в состав большого числа ферментов, в числе которых цитохромксидаза, аминоксидаза, супероксиддисмутаза, лизиноксидаза, церулоплазмин, дофамин-β-гидроксилаза, тирозиназа и др. На фоне длительного дефицита Cu возникают серьезные заболевания: анемия, нарушение образования поперечных сшивок коллагеновых волокон, гиперхолестеринемия, отсутствие толерантности к глюкозе, патология процессов кератинизации и т.д. [1].

Суточные нормы потребления Cu составляют 2–5 мг, однако следует иметь в виду, что усвоение элемента, поступающего с пищей, не превышает 30% [2]. При уменьшении в пищевом рационе мясных продуктов, которые являются главными источниками Cu, создаются реальные предпосылки для развития дефицита элемента, что особенно характерно для лиц старшего и преклонного возраста. В то же время при использовании в течение длительного времени для коррекции дефицита Cu медицинских препаратов (неорганические соли элемента) возникает опасность их отрицательного побочного действия. Установлено, что их усвоение при пероральном введении чрезвычайно ограничено и составляет 3–10%. В связи с этим практикуемые лечебные дозы, исходя из данных по их усвоению, представляют собой достаточно большие величины, равные примерно 10-кратным биотическим дозам, необходимым для поддержания жизнедеятельности. Но при

использовании минеральных солей в таких больших дозах возможны передозировки и нежелательные побочные последствия, особенно отдаленные. В определенной мере передозировки могут быть также следствием индивидуальных различий в степени усвояемости элементов как таковых. В этих случаях хорошим дополнением к лекарственным средствам могут стать лекарственные растения. Открытие их способности концентрировать биологически важные элементы дало основание считать, что лечебный эффект этих видов зависит не только от присутствующих в растениях физиологически активных соединений (ФАС), но и обусловлен сконцентрированными элементами. При этом лекарственные растения имеют существенные преимущества перед минеральными солями. Так, в растениях микроэлементы находятся в органически связанной, т.е. наиболее доступной и усвояемой форме. Вследствие этого становится возможным снизить терапевтические дозы и как следствие этого снизить риск возникновения передозировок. Лекарственные растения имеют существенные преимущества также в связи с тем, что при их употреблении больные получают целый комплекс родственных соединений (комплекс ФАС различной природы), и они влияют мягче, чем синтетические средства. Кроме того, лекарственные растения, как правило, лишены кумулятивных свойств (не накапливаются), не вызывая в результате аллергических реакций.

Вместе с тем о лекарственных растениях, концентрирующих Cu, имеются лишь отдельные публикации и их массового обследования в этом плане не проводилось. В то же время эти исследования

представляют существенный интерес в плане фундаментальных работ, связанных с решением проблемы метаболизма ФАС и одновременно имеют существенное значение в практическом отношении. Последнее обусловлено возможностью использования лекарственных растений для лечения и профилактики микроэлементозов — многочисленных заболеваний, связанных с нарушением в организме человека микроэлементного равновесия, а также для лечения пограничных с микроэлементозами патологических состояний, распространение которых в настоящее время фактически повсеместно и напрямую связано с неблагоприятными экологическими условиями.

Цель работы — тестирование лекарственных растений флоры России, выявление неизвестных ранее концентраторов и сверхконцентраторов Си и определение ее роли в метаболизме ФАС этих видов.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования при проведении тестирования использовали лекарственные растения (≈ 200 видов) флоры России, большую часть которых выращивали в идентичных почвенных и климатических условиях на фармакопейных участках НГУ Всероссийского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР), Московская обл. Часть растений, для которых условия Московской области были непригодными, собирали в местах их естественного произрастания. Растительный материал собирали в стадии бутонизации, цветения или плодоношения. При выборе времени сбора руководствовались рекомендациями, принятыми в фармакопее для каждого конкретного вида. Собранный и фиксированный при 100°C растительный материал высушивали и измельчали. Содержание Си в образцах определяли после сухого озоления атомно-абсорбционным методом в сочетании со спектрофотометрией на спектрофотометре Z-6000 (“Hitachi”, Япония). Согласно литературе, на реализацию действия элементов в организме человека существенно влияет соотношение между их отдельными представителями [1]. При этом элементы могут усиливать (синергисты) или подавлять (антагонисты) действие друг друга. Последнее необходимо учитывать при использовании лекарственных растений в качестве лечебных средств. Исходя из этого, методом атомной абсорбции нами проведено тестирование растений, концентрирующих Си, на содержание синергистов (Fe) и антагонистов (Zn).

В случае растений, выращенных в ВИЛАРе, параллельно с растительным материалом на содержание Си анализировали почву. Почвенные образцы отбирали на глубине пахотного слоя и использовали 1 н. HCl для получения вытяжки. Содержание Си выражали в мкг/г для растительных образцов и мг/кг — для почв. О накоплении Си судили по ее абсолютному содержанию, а также по величине коэф-

фициента биологического накопления (КБН), который рассчитывали по формуле:

$$\text{КБН} = \frac{\text{содержание в растительной биомассе}}{\text{содержание в почве}}$$

Данные по содержанию Си в мкг/г сопоставляли со средней величиной ее содержания у растений сходных зон произрастания [3] — Кларк (К). При превышении К в опытных образцах на порядок и более растения классифицировали как сверхконцентраторы, а при превышении в 3–6 раз — в качестве концентраторов элемента (К Си равен 5 мкг/г).

Для определения влияния Си на образование и накопление алкалоидов применяли модельные системы, проанализированные нами ранее [4]. В этих опытах в качестве объектов использовали 5-суточные проростки люпина многолистного (*Lupinus polyphyllus* L.), мака снотворного (*Papaver somniferum* L.), белены черной (*Hyoscyamus niger* L.) и катарантуса розового (*Catharanthus roseus* L.), в которых происходит синтез алкалоидов основных структурных типов — производных хинолизидина, изохинолина, тропана и индола соответственно. Эти гетероциклы являются структурной основой подавляющего большинства алкалоидов, известных в настоящее время. Выбор перечисленных видов объясняется еще и тем, что для лекарственных растений, концентрирующих Си, характерно присутствие (и, следовательно, синтез) алкалоидов этих же типов, в их числе хинолизидины — кубышка желтая (*Nuphar lutea* (L.) Smi), изохинолины — чистотел большой (*Chelidonium majus* L.), тропаны — красавка-белладонна (*Atropa belladonna* L.) и белена черная (*Hyoscyamus niger* L.) и, наконец, индолы — барвинок малый (*Vinca minor* L.).

Проращивание семян проводили в чашках Петри, смоченных дистиллированной водой (контроль) или водными растворами хлорида меди, различных концентраций (опыт). По окончании опыта навеску сырого растительного материала гомогенизировали в ступке с 96%-ным этанолом для получения однородной суспензии. Полученную суспензию количественно переносили в мерную колбу на 25 мл, доводили до метки этанолом и настаивали в течение 3–5 ч при комнатной температуре, периодически перемешивая. Затем суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 6000 g. Из 20 мл полученного супернатанта растворитель отгоняли досуха на ротационном испарителе. Остаток растворяли в 3–4 мл эфира, прибавляли 10 мл 2%-ного раствора уксусной кислоты и эфир отгоняли. Полученный воднокислый раствор, содержащий сумму алкалоидов, охлаждали, отфильтровывали и подвергали дальнейшей очистке путем повторных экстракций растворителями. Для количественного определения алкалоидов использовали известную реакцию этих соединений с бромкрезолпурпурным в сочетании со спектрофотометрией окрашенных комплексов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о растениях, концентрирующих Cu, суммированные в табл. 1, показывают, что способностью к накоплению этого элемента в той или иной мере обладают 36 видов из 200 обследованных. Количественный показатель этого накопления от вида к виду подвержен большим колебаниям. Последнее, очевидно, обусловлено различной способностью растений избирательно поглощать Cu из почвы, концентрируя ее в повышенных дозах. Эта особенность концентраторов и сверхконцентраторов Cu, скорее всего, является одним из проявлений их видовой специфичности.

Как видно из табл. 1, лидирующее положение среди выявленных сверхконцентраторов занимает сушеница топяная (*Gnaphalium uliginosum* L.), у которой содержание Cu составляло 105.1 мкг/г, превышая К в 21 раз, а КБН в зависимости от фазы развития равен 4–7. Величины КБН, как известно, дают дополнительную информацию о растениях–концентраторах элементов, позволяя сопоставить их способность к накоплению с содержанием тех же элементов в почвах. Для большинства элементов, присутствие которых в почвах является сбалансированным и достаточным, величина КБН у растений–концентраторов, в том числе Cu, равна единице или превышает ее незначительно (табл. 1). Вместе с тем величина КБН в равной мере зависит от абсолютного значения числителя (содержание элемента в растении) и от знаменателя (содержание элемента в почве) и возрастает либо в ответ на увеличение числителя либо в ответ на уменьшение знаменателя (см. формулу). Последнее, очевидно, характерно для почв, обедненных элементами, в нашем случае Cu. Согласно полученным результатам, подобная ситуация имела место у сушеницы, вследствие чего величина КБН достигала 4–7. Можно говорить о том, что способность к накоплению Cu у этого вида реализована в условиях опыта не полностью и при других благоприятных обстоятельствах сушеница топяная сможет накапливать Cu в еще большем количестве. У трех других сверхконцентраторов Cu: кубышки желтой (*Nuphar lutea* (L.) Smith), лобелии вздутой (*Lobelia inflata* L.) и аниса обыкновенного (*Pimpinella anisum* L.), содержание Cu колебалось в пределах 33.4–43.3 мкг/г соответственно, т.е. у них способность к избирательному поглощению элемента из почвы также имеет место, но выражена в меньшей, чем у сушеницы топяной степени. Что касается подавляющего большинства остальных видов, концентрирующих Cu, то, согласно общепринятой классификации, их следует рассматривать в качестве концентраторов элемента.

Полученные данные о растениях–концентраторах и сверхконцентраторах Cu, которые накапливают Fe и Zn (табл. 2 и табл. 3 соответственно) свидетельствуют об их способности избирательно поглощать из почвы оба этих элемента. В наибольшей

мере эта способность проявляется по отношению к Fe. Установлено, что 28 растений из 36 обследованных являются либо концентраторами (18 видов), либо сверхконцентраторами (10 видов) этого элемента. У последних содержание Fe превышало К более чем на два порядка, а у концентраторов – в 3–9 раз. Железо – один из важнейших эссенциальных элементов, является кофактором многочисленных ферментов (цитохромы a, b, c, P-450, каталаза, пероксидаза и др.) и катализирует основные обменные процессы, связанные с поддержанием жизни [1,2]. В свою очередь Cu играет существенную роль в усвоении Fe. Известно, что при необходимости устранения дефицита Fe в клинической и сельскохозяйственной практике наряду с этим элементом применяют препараты Cu. Другим примером взаимодействия Cu и Fe является – супероксиддисмутаза – фермент, в составе которого содержатся оба этих элемента и который осуществляет расщепление супероксидного радикала, известного своей токсичностью. Установленная способность лекарственных растений одновременно концентрировать (в том числе в сверхдозах) Cu и Fe очевидно существенно усиливает оказываемый этими видами лечебный эффект.

В отличие от Fe, Zn по отношению к Cu проявляет свойства антагониста. Однако у лекарственных растений–накопителей Cu содержание Zn, даже у тех видов, которые его концентрируют, не велико и превышает К не более, чем в 2.6 раза, т.е. эти виды согласно классификации не являются его концентраторами. Таким образом, какого-либо отрицательного воздействия на усвоение и функционирование Cu у этих видов Zn, имеющийся *in situ*, оказывать не должен.

Известно, что главную роль в терапевтическом воздействии лекарственных растений играют многочисленные природные соединения специализированного обмена – ФАС. Анализ литературных данных показывает, что лекарственные растения, концентрирующие Cu, синтезируют подавляющее большинство из известных типов этих соединений. Среди них алкалоиды, фенольные соединения, в том числе флавоноиды, дубильные вещества, кумарины и лигнаны, кроме того терпеноиды, среди них эфирные масла, гликозиды, в числе которых сапонины, а также сердечные гликозиды и иридоиды, и, наконец, органические кислоты, слизи, камеди, витамины и др. (табл. 1) [5–7]. При этом у большого числа видов, концентрирующих Cu, преобладают алкалоиды и флавоноиды.

В литературе сообщается о том, что у лекарственных растений ряд сконцентрированных элементов оказывает стимулирующий эффект на синтез ФАС различных классов [6]. В свете этого представлялось важным определить роль Cu в синтезе ФАС, присутствие которых характерно для ее концентраторов. Для решения вопроса в качестве модели были из-

Таблица 1. Лекарственные растения—концентраторы и сверхконцентраторы меди

Вид растения	Семейство и орган	Содержание меди		ФАС
		мкг/г	КБН	
Сушеница топяная, бутонизация, цветение	Астровые, надземная часть		7.72	Флавоноиды, дубильные вещества, смолы, витамины
		105.10	4.22	
		49.65		
Анис обыкновенный	Сельдерейные, плоды	43.30	—	Эфирные масла (до 6%), жирные масла
Лобелия вздутая	Лобелиевые, надземная часть	41.10	—	Алкалоиды
Кубышка желтая	Кубышковые, корневища	33.30	—	Алкалоиды
Вздутоплодник сибирский	Сельдерейные, корни	27.00	1.86	Фурукумарины
Черемуха Маака обыкновенная	Розоцветные, плоды	26.20	—	Дубильные вещества, орган. кислоты, флавоноиды, антоцианы, витамины
		19.90	—	
Аденостилес ромболистный	Астровые, корневища	24.00	1.86	Алкалоиды
Лапчатка прямостоячая	Розоцветные, корневища	22.60	1.04	Дубильные вещества (35%), три-терпеноиды (6%), флавоноиды
Горицвет весенний	Лютиковые, надземная часть	22.40	—	Сердечные гликозиды (25 карденолидов)
Дурман индейский	Пасленовые, листья	22.20	—	Алкалоиды, дубильные вещества
Красавка-белладонна	Пасленовые, корни, листья	21.50	0.93	Алкалоиды, кумарины, флавоноиды
		15.10	—	
Чемерица Лобеля	Лилейные, надземная часть	21.40	1.35	Алкалоиды, дубильные вещества, смолы
Авран лекарственный	Норичниковые, надземная часть	20.60	0.95	Алкалоиды, сапонины, иридоиды
Астрагал шерстисто-цветковый	Бобовые, надземная часть	20.40	0.20	Алкалоиды, кумарины, флавоноиды
Лимонник китайский	Лимонниковые, листья	20.30	0.80	Лигнаны, сесквитерпиноиды, дубильные вещества
Мать и мачеха	Астровые, листья	20.20	0.78	Сапонины
Ландыш майский	Лилейные, листья	20.10	0.39	Сердечные гликозиды
Шиповник Воронцовский	Розоцветные, плоды	19.60	1.15	Витамины: С(6%), каротин, В ₂ , К, Р; флавоноиды
Горец перечный, почечуйный	Гречишные, надземная часть	19.40	1.04	Флавоноиды: рутинкверцитин, сесквитерпеноиды, эфирное масло
		16.00	—	
Чистотел большой	Маковые, трава	19.40	1.04	Алкалоиды, эфирное масло, каротин
Арника олиственная	Астровые, соцветия	18.40	1.30	Три-терпеноиды, эфирное масло, дубильные вещества (5%), флавоноиды
Ортосифон тычиночный	Яснотковые, надземная часть	18.30	0.80	Алкалоиды, жирное масло, гликозид ортосифонин
Подорожник блошный, Подорожник большой	Подорожниковые, надземная часть, листья	18.30	1.08	Иридоидный гликозид, аукубин, дубильные вещества, сапонины, слизи, флавоноиды
		15.70	0.92	
Белена черная	Пасленовые, листья	17.90	1.43	Алкалоиды
Фенхель обыкновенный	Сельдерейные, плоды	17.80	1.05	Эфирное масло (6.5%), жирное масло (18%)

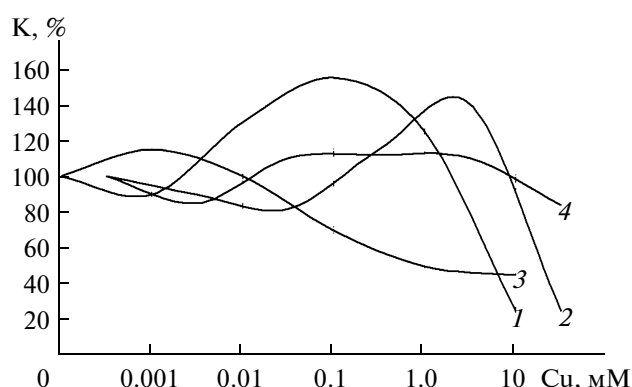
Таблица 1. (Окончание)

Вид растения	Семейство и орган	Содержание меди		ФАС
		мкг/г	КБН	
Барвинок малый	Кутровые, надземная часть	17.70	0.37	Алкалоиды
Наперстянка пурпурная	Норичниковые, листья	17.00	0.62	Сердечные гликозиды, сапонины, флавоноиды
Расторопша пятнистая	Астровые, семена	17.00	1.16	Эфирное масло, жирное масло, лигнаны (3.8%), флавонол
Пододилл гималайский	Барбарисовые, корневища и корни	16.90	1.19	Лигнаны, сапонины, берберин (алкалоид)
Боярышник кроваво-красный	Розоцветные, соцветия	16.90	0.35	Эфирное масло, дубильные вещества (10%), флавоноиды, органические кислоты
Страстоцвет мясо-красный	Страстоцветковые, надземная часть	16.90	0.73	Алкалоиды, флавоноиды, сапонины, кумарины
Заманиха высокая	Орляевые, корневища с корнями	16.70	0.65	Эфирное масло (2.7%), флавоноиды, кумарины, смолы (11.5%)
Ромашка аптечная	Астровые, соцветия	16.60	0.66	Эфирное масло, флавоноиды, кумарины, сесквитерпеновые лактоны, фитостерины
Рапонтikum софлоровидный	Астровые, корневища с корнями	16.50	—	Алкалоиды, дубильные вещества (12%), эфирное масло, флавоноиды, сапонины
Петрушка кудрявая	Сельдерейные, надземная часть	16.20	1.95	Эфирное масло, флавоноиды, жирное масло
Шалфей лекарственный	Яснотковые, листья	15.50	—	Эфирное масло (2.5%), алкалоиды, дубильные вещества (12%), флавоноиды

браны алкалоиды. Роль Cu в их синтезе анализировали на примере хинолизидинов, тропанов, изохинолинов и индолов. Установлено (рисунок), что Cu активизирует синтез всех перечисленных типов алкалоидов, но степень участия элемента в процессе образования этих соединений различна: колебания в пределах 12–58% по отношению к контролю, принятому за 100%, составляют 18, 20, 45 и 58% соответственно для тропанов, хинолизидинов, изохинолинов и индолов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтез алкалоидов, с одной стороны, и концентрирование Cu, с другой, взаимозависимы и представляют собой единый интегральный фактор специфичности химизма концентраторов Cu. К тому же сопоставление этих результатов с литературными данными и их обобщение позволяет заключить, что подобная взаимосвязь между ФАС и некоторыми из сконцентрированных элементов, участвующих в образовании этих природных соединений, характерна для лекарственных растений в целом.

Наряду с алкалоидами у большинства видов, концентрирующих Cu, как отмечалось выше, синтезируются также фенольные соединения. Среди них наиболее широко представлены флавоноиды (20 видов) и дубильные вещества (17 видов), на долю кото-

рых приходилось 55 и 47% от общего числа исследованных растений соответственно. Лигнаны обнаружены только у нескольких видов. Фенольные соединения, как известно, являются одним из наиболее многочисленных классов природных соединений, отличающихся большим разнообразием хи-



Влияние концентрации Cu (мМ) на содержание алкалоидов в проростках катарантуса розового (1), мака снотворного (2), белены черной (3) и люпина многолистного (4). К — контроль.

Таблица 2. Содержание железа у лекарственных растений—накопителей меди, К = 100 мкг/г

Вид растения, орган	Содержание Fe, мкг/г	Вид растения, орган	Содержание Fe, мкг/г
Красавка-белладонна Корни	2400	Вздутоплодник лекарственный, корни	800
Листья	500		
Сушеница топяная, бутонизация надземная часть	2300	Шалфей лекарственный, листья	800
Чемерица Лобеля, надземная часть	2300	Барвинок малый, надземная часть	700
Страстоцвет мясокрасный, надземная часть	1600	Горицвет весенний, надземная часть	600
Авран лекарственный, надземная часть	1460	Чистотел большой, трава	600
Кубышка желтая, корневища	1400	Пододилл гималайский, корне- вища с корнями	500
Наперстянка пурпурная, листья	1400	Ортосифон тычиночный, надземная часть	500
Аденостилис ромболистный, корневища	1340	Авран лекарственный, надземная часть	460
Астрагал шерстистоцветковый, надземная часть	1270	Заманиха высокая, корневища с корнями	460
Лобелия вздутая, надземная часть	1050	Петрушка кудрявая, надземная часть	400
Белена черная, надземная часть	900	Лапчатка прямостоячая, корневища	400
Расторопша пятнистая, семена	800	Горец перечный, надземная часть	300
Рапонтикум софлоровидный, корневища с корнями	800	Арника олиственная, соцветия	300
Дурман индийский, листья	800	Ромашка аптечная, соцветия	300

Таблица 3. Содержание цинка у лекарственных растений—накопителей меди, К = 50 мкг/г

Вид растения, орган	Содержание Zn, мкг/г	Вид растения, орган	Содержание Zn, мкг/г
Наперстянка пурпурная, надземная часть	130.0	Сушеница топяная, надземная часть	98.2
Лапчатка прямостоячая, корневища	128.0	Шалфей лекарственный, плоды	97.4
Дурман индийский, листья	103.0	Лобелия вздутая, надземная часть	92.5
Лимонник китайский, плоды	98.8	Ортосифон тычиночный, надземная часть	90.0

мического строения [8]. Вместе с тем установлено, что наиболее активизирован биосинтез именно флавоноидов, вследствие чего происходит их накопление, и этот факт присущ большому числу лекарственных растений. Следует подчеркнуть, что конденсированные дубильные вещества, в свою очередь, образуются из восстановленных форм флавоноидов.

Многочисленные исследования по расшифровке молекулярных механизмов действия Cu на биосин-

тез и алкалоидов, и фенольных соединений показали, что влияние элемента на образование тех и других реализуется на энзиматическом уровне регуляции через Cu-содержащие ферменты. Одно из центральных мест среди них занимает полифенолоксидаза (КФ 1.14.18.1) — активный участник метаболизма этих природных соединений. Так, например, полифенолоксидаза в проростках мака снотворного катализирует несколько ранних стадий биосинтеза алкалоидов — производных изохинолина. В их числе гидроксилирование тирозина до диок-

Таблица 4. Фармакологическая активность лекарственных растений, накапливающих медь, не связанная с элементом

Вид растения	Фармакологическая активность	Вид растения	Фармакологическая активность
Ортосифон тычиночный	Диуретик	Астрагал шерстистоцветковый	Желчегонное средство
Петрушка кудрявая	Диуретик	Красавка-белладонна	Спазмалитик
Лабелия вздутая	Возбуждающее средство	Вздутоплодник сибирский	Спазмалитик
Заманиха высокая	Возбуждающее средство	Фенхель обыкновенный	Ветрогонное средство
Ропонтикум софлоровидный	Возбуждающее средство	Шалфей лекарственный	Инсулиноподобное средство
Арника олиственная	Возбуждающее средство		

сифенилаланина, 4-гидрокси-фенил-ацетальдегида до 3,4-дигидрокси-фенилацетальдегида и, наконец, N-метилкоклаурина до 3-гидрокси-N-метилкоклаурина [8–10]. Показательно, что активность полифенолоксидазы является хорошим индикатором обеспеченности растений алкалоидоносом Cu и стимулируется в ответ на введение дополнительного количества этого элемента [11]. Важную роль в биосинтезе алкалоидов многочисленных структурных типов, в числе которых производные пирролизидина, пирролидина, тропана, лобелина, лупинана и др. играют два Cu-содержащих фермента: амино- и диаминоксидазы, которые катализируют переаминирование аминокислот и окислительное дезаминирование диаминов, соответственно, на ранней стадии биосинтеза алкалоидов [12].

Полифенолоксидаза – основной участник метаболизма фенольных соединений. Совместно с гликозидазами и пероксидазой она входит в состав своеобразного фенолрасщепляющего комплекса ферментов, катализирующего их окислительное расщепление и взаимопревращение при ресинтезе отдельных представителей этого класса [13]. Другой Cu-содержащий фермент – фенолоксидаза (КФ 1.10.3.11) катализирует реакцию превращения пара-кумаровой кислоты в кофейную кислоту, а также катализирует гидроксильное кольцо В в положении С-3-ряда флавоноидов (кемпферол, нарингенин) [14]. Медь необходима для проявления активности 3-дегидрохинатсинтазы (КФ 4.2.1.10), осуществляющих катализ реакции, в ходе которой образуется 3-гидрохинная кислота, содержащая в своем составе бензольное ядро – основной структурный фрагмент фенольных соединений всех типов [15, 16].

Стимулирующее влияние Cu на метаболизм алкалоидов и фенольных соединений может быть также опосредовано ее участием в окислительно-восстановительных процессах, в результате чего повышается энергетический потенциал растительной клетки, а также через интенсификацию азотфиксации [17]. Активизация азотфиксации, в свою очередь, способствует лучшему усвоению азота и вследствие этого накоплению протеиногенных аминокислот, в том числе лизина, тирозина, фенилаланина и триптофа-

на, роль которых в качестве первичных предшественников алкалоидов и фенольных соединений общеизвестна.

Вместе с тем у растений–концентраторов медь не только активный участник биосинтеза ФАС, присутствие которых характерно для этих видов, но также играет существенную роль в оказываемом ими лечебном эффекте. Известно, что Cu обладает выраженной противовоспалительной активностью. При этом в условиях однонаправленного характера действия (противовоспалительного) Cu, с одной стороны, и ФАС, присутствующих в растениях–концентраторах элемента, с другой, происходит суммирование их влияния. Это явление характерно для видов, содержащих дубильные вещества и эфирные масла в качестве основного действующего начала. К таким видам относятся, например, сушеница топяная, лапчатка прямостоячая (*Potentilla erecta* (L.) Racusch), анис обыкновенный и др.

Вместе с тем подобная однонаправленность действия ФАС и элементов, сконцентрированных в повышенных дозах, свойственна далеко не всем лекарственным растениям. В табл. 4 суммированы лекарственные растения, накапливающие Cu, фармакологическая активность которых не связана с присутствием повышенных доз этого элемента. Терапевтический эффект этих видов предопределен ФАС, присутствие которых для них характерно. Однако это не означает, что Cu в этих случаях не оказывает своего положительного влияния. Вместе с тем оно не учитывается, оставаясь как бы за кадром. В связи с этим открывается реальная перспектива расширения спектра применения лекарственных растений–концентраторов Cu, при использовании которых в качестве лечебных средств не учитывается повышенное содержание в них этого элемента.

Итак, проведено тестирование лекарственных растений флоры России на содержание Cu и выявлены концентраторы и сверхконцентраторы этого элемента. Сопоставлена способность этих видов избирательно поглощать Cu из почвы с синтезом ФАС различных типов, наибольшее распространение среди которых имеют алкалоиды и фенольные соединения. Суммированы данные о роли Cu и Cu-содержащих ферментов в метаболизме этих ФАС. Рас-

смотрена возможность расширения сферы применения лекарственных растений, концентрирующих медь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авцин А.П., Жаворонков А.А., Риш Н.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. М.: Медицина, 1991. 495 с.
2. Агаджанян Н.А., Скальный А.В. Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека. М.: КМК, 2001. 83 с.
3. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. 440 с.
4. Ловкова М.Я., Бузук Г.Н., Соколова С.М., Бузук Л.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 3. С. 340–346.
5. Ловкова М.Я., Рабинович А.М., Пономарёва С.М., Бузук Г.Н., Соколова С.М. Почему растения лечат. М.: Наука, 1990. 254 с.
6. Ловкова М.Я., Бузук Г.Н., Соколова С.М., Климентьева Н.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 3. С. 261–273.
7. Ловкова М.Я., Бузук Г.Н., Соколова С.М., Деревяго Л.Н. // Микроэлементы в медицине. 2005. Т. 6. № 4. С. 4–10.
8. Loeffler S., Stadler R., Nigakura N. // J. Chem. Soc. Commun. 1987. V. 5. № 15. P. 1160–1162.
9. Rueffler M., Cenk M.H. // Z. Naturforsch. 1987. B. 42. № 4. S. 319–332.
10. Запретов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука, 1993. 272 с.
11. Marriach M., Lam C.H. // J. Plant Nutr. 1987. V. 10. № 9. P. 2089–2094.
12. Mothes K., Schutte H. Biosynthese der Alkaloide. Berlin: VEB Dtsch. Verl. Wiss., 1969. 703 s.
13. Кунаева Р.М. Гидролитические и окислительные ферменты обмена фенольных соединений. Алма-Ата: Наука, 1986. 157 с.
14. Butt V.S. // The Biochemistry of Plant Phenolics. Oxford: Clarendon Press, 1985. P. 343–366.
15. Jamamoto E. // Plant Cell Physiol. 1977. V. 18. № 5. P. 995–1007.
16. Jamamoto E. // Phytochemistry. 1980. V. 19. № 5. P. 779–781.
17. Seliga H. // Acta Physiol. Plant. 1990. V. 12. № 4. P. 287–291.

Medicinal Plants: Concentrators and Superconcentrators of Copper and Its Role in Metabolism of These Species

M. Ya. Lovkova^a and G. N. Buzuk^b

^a *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*
e-mail: inbi@inbi-ras.ru

^b *Vitebsk Medical University, Vitebsk, Belorussia*
e-mail: buzukg@mail.ru

Received April 26, 2010

Abstract—With the combination of the atomic absorption method and spectrophotometry, we conducted the testing of medicinal plants of Russian flora (approximately 200 species) on the content of copper (Cu). We revealed 36 species—concentrators and superconcentrators of this element. The capability of these species to accumulate Cu is compared with the synthesis of physiologically active compounds (PAC), among which alkaloids and phenolic compounds prevail. The stimulating influence of Cu on the formation and accumulation of alkaloids of main structural types—derivatives of chinolysidine, isochinoline, tropane, and indole—is established. The data about the role of Cu-containing enzymes in the metabolism of alkaloids, as well as of phenolic compounds, are reviewed on the example of flavonoids. The role of concentrated copper in the medicinal effect of medicinal plants and, thus, the appearing perspective to widen their application spectrum, especially in the cases when the orientation of the action of PAC and Cu are different, is discussed.

UDC 577.158

GLUCOSE OXIDASE-POLYPYRROLE ELECTRODES SYNTHESIZED IN *p*-TOLUENESULFONIC ACID AND SODIUM *p*-TOLUENESULFONATE

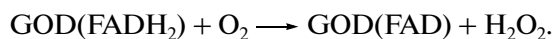
© 2011 G. Ozyilmaz, A. T. Ozyilmaz, F. Can

University of Mustafa Kemal, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, 31040 Hatay-Turkey
e-mail: gozyilmaz@gmail.com

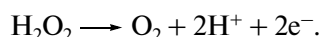
Received May 20, 2010

Amperometric glucose biosensors have been developed based on entrapment on platinum (Pt) electrode using cyclic voltammetry technique in glucose oxidase (GOD) and pyrrole containing *p*-toluenesulfonic acid (pTSA) or sodium *p*-toluenesulfonate (NapTS) as supporting electrolyte solutions. Both of electrolyte solutions were suitable media for the formation and deposition of polypyrrole-GOD (PPy-GOD) layers on Pt substrate. Pt/PPy-GOD electrodes brought about in different morphological properties as well as different electrochemical and biochemical response. The highest responses obtained in pTSA and NapTS electrolytes were observed at pH of 4.5 and 7.0 for Pt/PPy-GOD electrodes, respectively. While linearity was observed between 0.0–1.0 mM glucose substrate for both electrodes, I_{\max} value of Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrode was approximately twice as high as that of Pt/PPy-GOD_{pTSA} electrode as 25.4 and 14.2 μA , respectively. Five commercial drinks were tested with enzyme electrodes and compared with results obtained spectrophotometrically using glucose kit. Results revealed that Pt/PPy-GOD_{NapTS} electrode exhibited better biosensor response.

Detection of glucose is rather a common practise both in medicine and also in food nutrient industry. There are several ways to measure glucose level based on chemical methods using Folin-Wu, Fehling, Benedict, *o*-toluidine reagent, etc. [1, 2]; enzymatic methods such as glucose oxidase [3, 4] in addition to electrochemical methods [5, 6]. Enzymatic methods are widely used due to specific features of the substrate and absence of any side effects. Detection of glucose level with glucose biosensor is an intensively investigated research area on account of its several advantages, e.g. ease of application, rapidity, simple pretreatment and time saving. Glucose oxidase (EC 1.1.3.4), which is the first enzyme used to construct enzyme electrode, catalyses the oxidation of glucose and produces hydrogen peroxide according to the reaction given below:



Since hydrogen peroxide concentration is proportional to glucose concentration, the latter can be easily determined by current response detected by the amperometric method from hydrogen peroxide oxidation reaction:



There is a considerable demand for the immobilization of GOD onto electrode surfaces and preparation of biosensors based on electrocatalytic systems of enzymes [7–11]. Conducting polymer immobilization matrices are conceptually attractive as a means of providing a three-dimensional 'conducting' network, where charge transfer can occur between a redox species and the polymer within the pores of the matrix [12]. In particular, im-

mobilization of enzymes on electrode surfaces via various conductive polymers such as polypyrrole [9, 13–15], polyaniline [8, 10, 16], poly(3-methylthiophene-co-thiophene-3-acetic acid) [17], poly(phenylenediamine) [7, 18, 19], Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) [20], poly(*o*-anisidine) [16, 21] has been extensively studied because of its high conductivity, stability and ease in preparation. Since polypyrrole is compatible with most enzymes and can be easily synthesized from pyrrole monomer in either aqueous or organic solution, the polypyrrole/glucose oxidase (PPy/GOD) biosensor is the most attractive topic of research in biosensor area [22]. When entrapment method is used to prepare the GOD electrode, biosensor properties such as porosity of conductive polymer, diffusion rate of glucose and O₂ into enzyme microenvironment, the catalytic efficiency of GOD and charge transfer rate are affected by electrosynthesis technique, electrolyte solution and its pH, potential range and scan rate. Choosing the electropolymerization conditions for PPy/GOD system in terms of electrolyte solution is crucial because both anions and cations influence the polymer morphology and its electrochemical properties. There are several studies related with PPy/GOD electrode preparation in different electrolyte systems, namely KCl solution [22–24], phosphate buffer [25], NaCl [26], osmium complex containing tetramethylammoniumperchlorate [14].

It is well known that when acidic electrolyte solution is used, synthesized polymer becomes more conductive, an important parameters for biosensors [27]. However, partial denaturation of the enzymes can be observed when entrapment method is used as an immobilization way. Therefore, it was found worthy to investigate the effect of acidity of electrolyte used in establishing the glucose bio-

sensor while different anion was absent in the electrolyte solution.

In this study, GOD was entrapped in PPy which synthesized by cyclic voltametry technique onto Pt to constitute PPy/GOD electrode. Synthesis was achieved in acidic and neutral supporting media as paratoluensulfonic acid (pTSA) and sodium paratoluenesulfonate (NapTS). Accordingly, the effects of pH and glucose concentration on biosensor response were studied. Operational stability for 50 uses depending on glucose concentration as well as storage stability were investigated. Glucose concentration of five different beverage samples was determined by Pt/PPy-GOD electrodes prepared in pTSA and NapTS electrolytes.

MATERIALS AND METHODS

All the chemicals used were of analytical grade. Glucose oxidase (GOD) from *Aspergillus niger* (Sigma). Pyrrole was freshly distilled and stored in the dark. The solutions were prepared with double distilled water and all experiments were carried out at room temperature open to atmosphere. In this study, all the electrochemical experiments were performed in a single compartment cell with three electrode configurations. Reference electrode was an Ag/AgCl (3 M, KCl) electrode and counter electrode was a platinum sheet with a surface area of 2.0 cm². A CHI 660b model digitally controlled electrochemical analyzer (serial number: A1420) was used in electrochemical experiments. All of the potential values were referred to the Ag/AgCl (3 M, KCl) electrode. The working electrode was a platinum sheet with a surface area of 0.18 cm². Before electropolymerization, rinsed in 1 : 1 ethanol acetone mixture, washed with bi-distilled water and dried.

Preparation of the enzyme electrodes. Enzyme modified electrodes were prepared by incorporating enzyme into the polypyrrole (PPy) during the polymerization of pyrrole (Py) on Pt electrode. To this end, thin films of PPy were synthesized electrochemically on platinum electrode using cyclic voltammetric technique, in presence of GOD. In order to use similar electrochemical conditions, the electropolymerization of Py was carried out in the 0.20 M pTSA or 0.20 M NapTS as supporting electrolyte containing 0.10 M Py and 2.50 mg/ml GOD. PPy films on Pt electrode were deposited by applying sequential linear potential scan rate of 50 mV/s between 0.10 to 1.00 V for NapTS solution and 0.10 to 0.75 V for pTSA solution in 50 cycles. Enzyme modified PPy films were obtained with 50 cycles for electropolymerization. Having been deposited, the films were washed with bi-distilled water and dried. Enzyme electrodes obtained in NapTS and pTSA electrolytes were referred to as Pt/PPy-GOD_{NapTS} and Pt/PPy-GOD_{pTSA}, respectively.

Electrochemical characterization of the enzyme electrodes. Linear sweep voltametry technique was applied to Pt/PPy-GOD_{NapTS} and Pt/PPy-GOD_{pTSA} electrodes at potential range between 0.10 and 0.75 V by 1 mV s⁻¹ scan rate. Cyclic voltametry was also applied at the same po-

tential ranges using 5.0 mV s⁻¹ scan rates. The characterization curves of enzyme modified PPy films were obtained with 10 cycles.

Biochemical characterization of the enzyme electrodes.

Both electrodes were biochemically characterized by monitoring the current values using glucose solutions at various conditions such as different potential, pH and substrate concentration rates. Operational stabilities in 5, 10 and 20 mM glucose solutions by 50 repeatedly uses and storage stabilities at 10°C were also investigated. Five different beverages such as malt drink, fizzy drink, wine, honey and grape juice were tested by Pt/PPy-GOD_{NapTS} and Pt/PPy-GOD_{pTSA} electrodes for determination of glucose concentration and compared with results obtained using commercial glucose kit.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis. Figure 1 shows the first and fiftieth scans of the cyclic voltammograms recorded for Pt electrode in monomer free electrolyte (1), 0.10 M Py and electrolyte (2), and GOD and Py containing electrolyte (3) solutions in supporting electrolytes as 0.20 M NapTS (a) and in 0.20 M pTSA (b), respectively.

All measurements were taken at scan rate of 50 mV s⁻¹. In absence of monomer and GOD, anodic and cathodic current values obtained for NapTS medium remained almost constantly close to zero up to 0.75 V. With the aim of better quality PPy film, PPy film in NapTS solution was deposited on Pt electrode by applying sequential linear potential scan rate 50 mV/s between 0.10 to 1.00 V potential range. In Py containing NapTS solution, potentiodynamic behaviours were significantly different from that of monomer free solution. While current values remained constant close to zero up to 0.34 V, the rapid anodic current increase after approx. 0.58 V was related to the oxidation of pyrrole. It must be noted that the current values decreased dramatically with increasing cycle numbers. In every case, these current values recorded for NapTS and Py containing solution after 0.34 V were significantly higher when compared with that of pure NapTS solution. During first reverse scan, cathodic peaks after approx. 0.36 V was attributed to the reduction of previously produced thin PPy film on platinum electrode. Cathodic current values were found to decrease regularly with increasing scanning numbers. In presence of GOD containing Py and NapTS solution, first cyclic voltammogram was significantly different from those recorded in monomer containing aqueous NapTS and only NapTS solution. Yet, behaviours similar to those of GOD free medium were obtained up to 0.74 V in presence of GOD with negligible small current values. Then, anodic current wave, which shifted to cathodic potential during every scan, was attributed to GOD oxidation process. During this potential scanning, the monomer oxidation process was observed as an increase in current. These anodic current values rose in increasing scan number. Yet, these values recorded for monomer oxidation in GOD containing

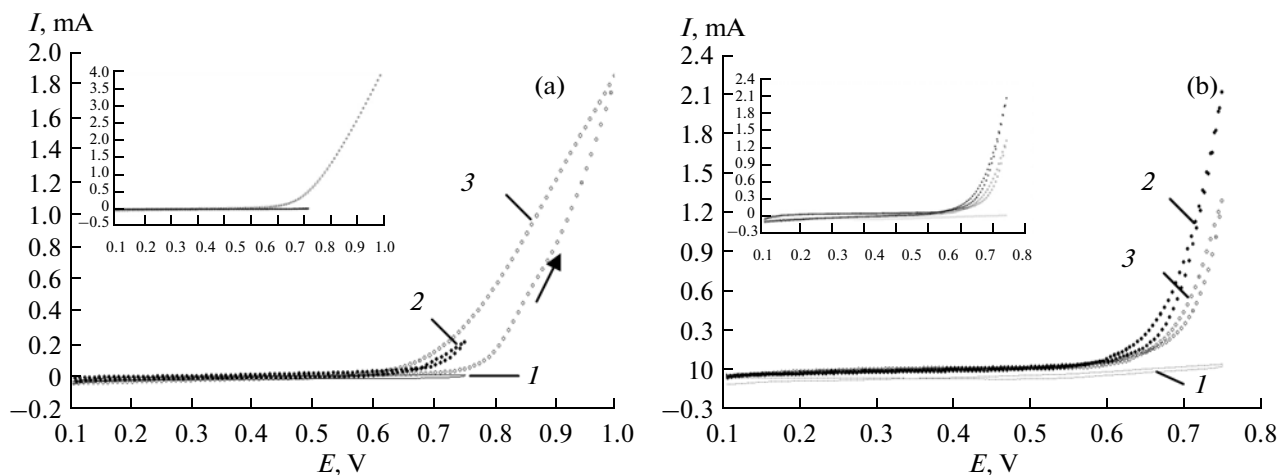


Fig. 1. First cyclic voltammograms recorded for Pt electrode in free monomer electrolyte (1), Py and electrolyte (2) and GOD, Py and electrolyte (3) solutions, in 0.20 M NapTS (a) and in 0.20 M pTSA (b) such as electrolyte solution, respectively. Scan rate: 50 mV s^{-1} . Inset graphs are fiftieth CVs.

Py and NapTS solution were fairly higher than those of Py and NapTS solution. This could be due to higher conductivity of PPy film with GOD freshly synthesized in presence of GOD including solution than in GOD free conditions, in NapTS solution. During the fiftieth scan, current values recorded for GOD containing Py and NapTS solution were significantly higher when compared with that of monomer containing aqueous NapTS and pure NapTS solution (Fig. 1a, insert). The position of the GOD oxidation wave shifted to negative direction such as approx. 0.57 V, during the fiftieth scan. The Pt surface in GOD containing Py and NapTS condition was covered with a greenish, uniform film.

In order to determine different processes occurring at Pt electrode surfaces, Pt electrode was coated with PPy in aqueous pTSA and GOD solutions. The first and the fiftieth cyclic voltammogram curves with and without GOD in monomer containing and monomer free pTSA medium were given in Fig. 1b. In presence of pTSA solution, behaviours similar to that of NapTS medium were observed as almost constantly close to zero from 0.10 to 0.75 V. In Py containing pTSA solution, while current values remained almost zero in a wide potential range up to approx. 0.60 V, current increases after this potential value were attributed to the oxidation of monomer. In presence of GOD containing Py and pTSA solution, although first cyclic voltammogram was significantly similar to those recorded in monomer containing aqueous pTSA solution, current values obtained for GOD containing Py and pTSA solution were relatively lower when compared with those of monomer containing aqueous pTSA and pure pTSA solution. This could be due to higher conductivity of PPy film synthesized in presence of GOD free acidic solution when compared with that of GOD containing Py and pTSA conditions. During the fiftieth scan, also the current values recorded for Py and pTSA solution were significantly higher when compared with those of GOD

containing Py and pTSA solution and pure pTSA solution (Fig. 1b, insert). The position of the GOD oxidation wave remained at almost the same potential, during the fiftieth scan. The Pt surface in GOD containing Py and pTSA condition was covered with a black uniform film.

SEM images of Pt/PPy electrodes prepared in pTSA and NapTS with GOD and GOD free, which are referred to here as Pt/PPy-GOD_{pTSA}, Pt/PPy-GOD_{NapTS}, Pt/PPy_{pTSA} and Pt/PPy_{NapTS}, respectively were given in Fig. 2. The morphology of PPy film can be influenced by the dopant anion, composition of the electrolyte, current or potential for polymerization and electrode configuration [28]. PPy films on Pt/PPy electrodes obtained in NapTS and pTSA solution has different morphologies as seen in Figs. 2a and 2c, respectively. This may be due to different hydrogen ions concentration which can affect the PPy charge. It was also seen from the Figs. 2b and 2d that SEM images of Pt/PPy-GOD_{NapTS} and Pt/PPy-GOD_{pTSA} electrodes were different from their enzyme free counterpart. As the polymerization conditions such as monomer and enzyme concentration, applied potential and electrode configuration were the same in this study, the different morphology might be related to interactions between enzyme molecules and the conducting polymer [28].

Electrochemical characterization of enzyme electrodes. GOD enzyme entrapped polypyrrole (PPy) electrodes were obtained for glucose oxidation. Linear sweep voltammograms recorded for glucose oxidation currents of GOD immobilized PPy coated platinum (Pt/PPy-GOD_{NapTS} and Pt/PPy-GOD_{pTSA}) electrodes in solutions with and without different glucose concentration are given in Fig. 3. On GOD modified PPy electrodes, electron transfer between enzymes and the electrode surface through PPy film was obtained with higher current values. Higher oxidation currents for 1, 10 and 20 mM glucose solution above 0.52 V versus Ag/AgCl were testified to the

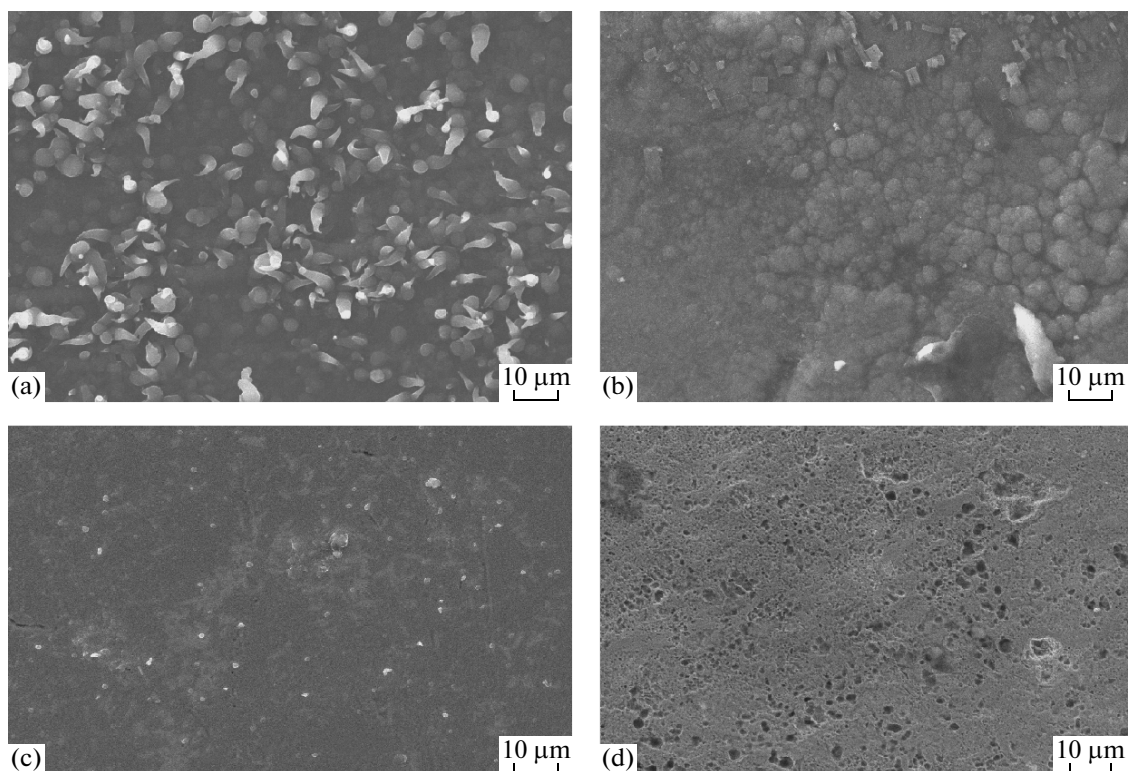


Fig. 2. SEM images of Pt/PPy_{NapTS} (a), Pt/PPy-GOD_{NapTS} (b), Pt/PPy_{pTSA} (c), Pt/PPy-GOD_{pTSA} (d) electrodes.

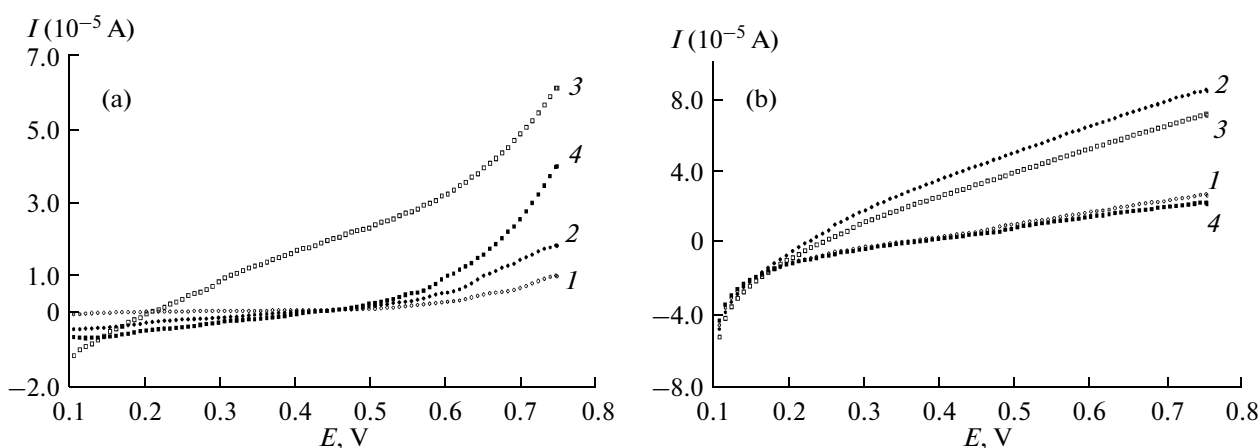


Fig. 3. Linear sweep voltammograms for glucose oxidation of 0 mM (1), 1 mM (2), 10 mM (3) and 20 mM (4) for Pt/PPY-GOD_{NapTS} (a) and Pt/PPY-GOD_{pTSA} (b) electrodes, scan rate: 1 mV s^{-1} , 0.10 M phosphate buffer solution.

presence of glucose in the solutions. For buffer solution without glucose, dramatically low oxidation current values were observed due to deterioration of polypyrrole film when potential was moved to more positive potential than 0.46 V. But, it must be noted that this degradation process was not significant in terms of electron transfer of polymer film.

For Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode, glucose oxidation was performed with glucose concentration up to 20 mM.

Maximum oxidation current was observed with glucose concentration of 10 mM. However, glucose oxidation current values increased in cathodic direction with the increasing glucose concentration when the potential was lower than approx. 0.46 V, except 10 mM glucose solution. Oxidation current values for 20 mM were significantly lower than that of 10 mM. Similar behavior was reported by Yu et al. [28] who argued that this case could be explained by sensitivity to glucose concentration up to 20 mM. For Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode, irregular oscil-

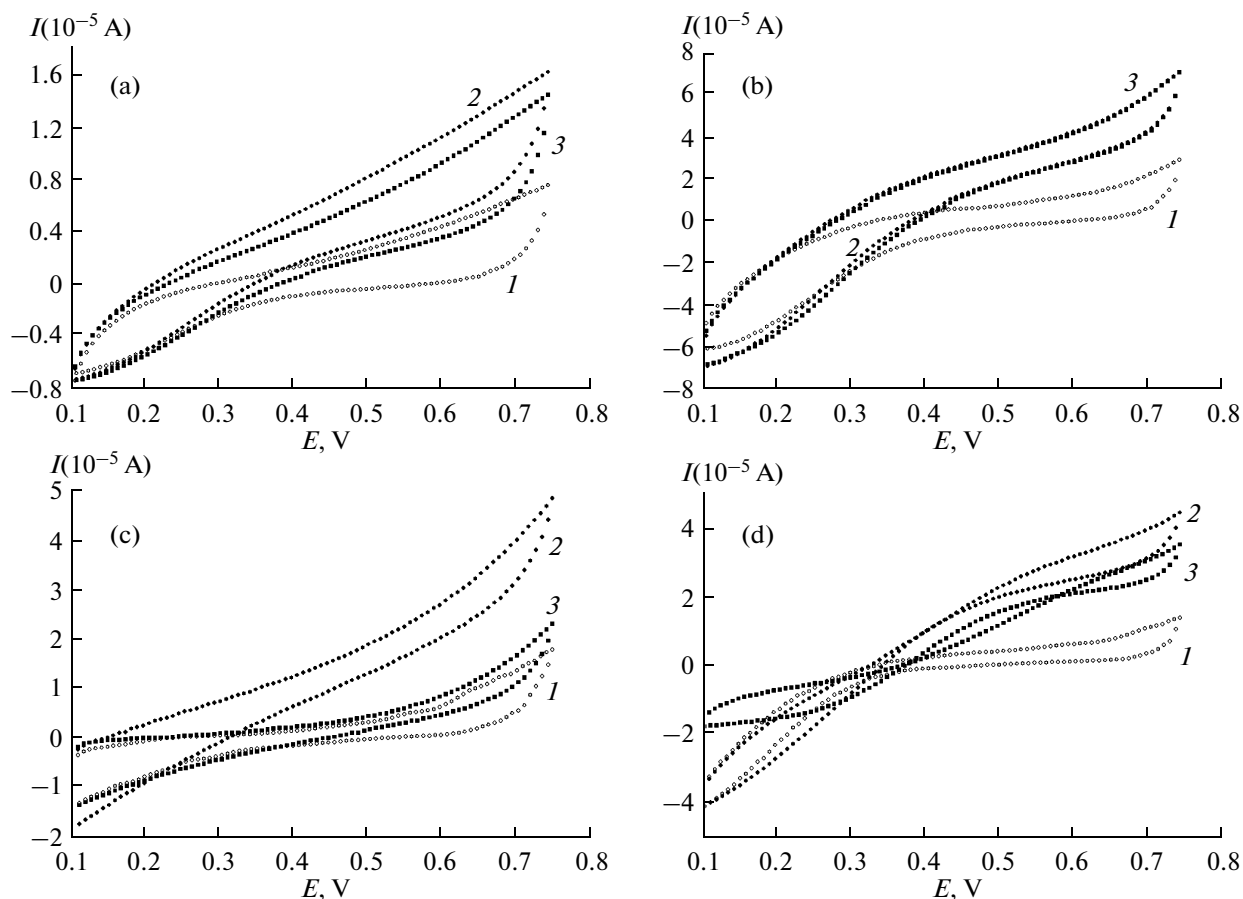


Fig. 4. First (a, c) and tenth (b, d) cyclic voltammograms for glucose oxidation of 0 mM (1), 10 mM (2) and 20 mM (3) on Pt/PPY-GOD_{pTSA} (a, b) and Pt/PPY-GOD_{NapTS} (c, d) electrodes, scan rate: 5 mV s^{-1} , 0.10 M phosphate buffer solution.

lation in current values depending on glucose concentration was observed. Maximum current was detected with glucose concentration of 1 mM. The declining current values with increasing glucose concentration were related to poor electron communication between enzyme active centre and electrode. This was attributed to poor amount of GOD entrapped in polypyrrole matrix, which had low current value passed for the electropolymerization in pTSA solution when compared with that of NapTS solution (Figs. 1a and 1b). Besides, the partial denaturation of GOD in 0.20 M pTSA solution, which is at low pH value was another reason for the limited GOD entrapped and moved into polymer matrix.

Figure 4 shows the cyclic voltammograms for the glucose oxidation on the Pt electrode of GOD entrapped PPy film formed in pTSA solution, which is referred to here as Pt/PPY-GOD_{pTSA}. In presence of glucose containing buffer solution, oxidation current values for Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode were fairly higher when compared with that of glucose free buffer solution during first scan (Fig. 4a, 1). Maximum oxidation current values were obtained with glucose concentration of 10 mM. Yet, the current values recorded for 20 mM were significantly lower than that of 10 mM glucose concentration. This

case suggested that Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode had sensitivity to glucose concentration up to 10 mM. With both glucose concentrations, oxidation current values decreased proportional to an increase in scan numbers as seen in Fig. 4b, 1 which showed the results of tenth scan number. Current values during every scan were highest in 10 mM glucose concentration solution. Buffer solution with and without glucose, higher anodic current values were obtained in case of glucose, indicating the oxidation of glucose together with PPy while the oxidation/reduction redox behaviours of PPy film were observed during the first and the tenth anodic and cathodic scans of cyclic voltammograms. Yet, oxidation current values recorded for Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode were rather higher when compared with that of Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode in presence of glucose.

Figures 4c, 4d shows cyclic voltammograms for the glucose oxidation on the Pt electrode of GOD entrapped PPy film formed in NapTS solution, which is referred to here as Pt/PPY-GOD_{NapTS}. In case of glucose free buffer solution, current values over 0.28 V remained almost constant in vicinity of zero up to 0.51 V, while small current values at approx. 0.28 V were observed during first anodic and cathodic scans of cyclic voltammograms. These redox

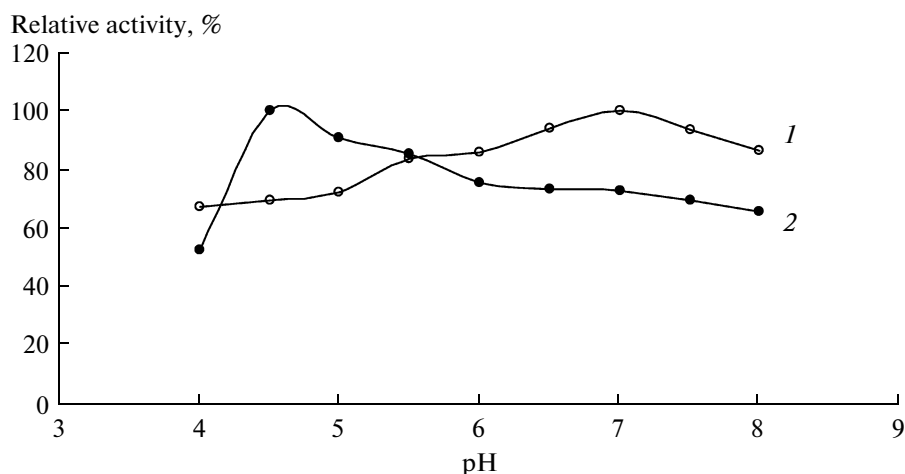


Fig. 5. The effect of pH on current responses of Pt/PPY-GOD_{NapTS} (1) and Pt/PPY-GOD_{pTSA} (2) electrodes (at 10 mM of glucose solution).

peaks were due to oxidation/reduction of PPY film. The oxidation current wave which increased rapidly after 0.51 V was attributed to the deterioration of PPY film. In presence of glucose containing buffer solution, oxidation current values for Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode were higher when compared with that of glucose free buffer solution. These values decreased with increasing glucose concentration. Besides, the oxidation current values recorded for 10 mM glucose concentration solution started to increase at former potential values. This proved that the electron transfer between the enzyme active centre and the electrode was rather vigorous. In presence of buffer solution with and without glucose (Figs. 4c, 4d), cyclic voltammograms of the tenth scan for Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode were significantly different from those recorded in glucose containing buffer and buffer solution. In glucose containing buffer solutions, current values decreased due to activity loss of Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode, while an increment was observed for glucose free buffer solution due to the detriment of PPY, during the tenth scan. Moreover, similar behaviours to that of 10 mM glucose medium were obtained up to 0.13 V, in presence of 20 mM glucose solution with negligible small current values. Then, anodic current increases for 10 mM glucose solution were observed after approx. 0.13 V due to glucose oxidation process.

Biochemical characterization of enzyme electrode. The biochemical characterization of the enzyme electrodes was carried out by measuring current response at varied conditions. The principle of the determination of the current response is based on the decomposition of hydrogen peroxide which was produced during the enzyme-catalyzed reaction. Catalytic activities of most enzymes are affected from their ambient pH values. The pH value is an important variable that affects enzyme activity and therefore current response of the enzyme electrodes. Therefore, generally determined is the pH value known as optimal pH, at which enzyme exhibits the maximum reaction

rate. So, current values were measured using 10 mM glucose solutions at varied pH between 4.0 and 8.0 for Pt/PPY-GOD_{pTSA} and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrodes at first. Figure 5 represents the effect of pH on the response of Pt/PPY-GOD_{pTSA} and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrodes.

As seen in Fig 5, the biosensor response increased with increasing pH value from 4.0 to 7.0 for Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode, and from 4.0 to 4.5 for Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode, then decreased as pH increased further. Maximum responses were observed at 4.5 and 7.0 pH values for Pt/PPY-GOD_{pTSA} and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrodes, respectively. Ren et al. [29], PPY synthesized onto Pt electrode in pTSA containing almost neutral (pH 6.86) electrolyte solution, on which GOD was adsorbed to get glucose biosensor. When they investigated the effect of pH on the response of the PPY/GOD electrode, they observed the maximum response at pH value of 6.86.

The effect of substrate concentration on Pt/PPY-GOD_{pTSA} and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrodes was investigated using glucose solution with concentration varying between 0.10 and 30.0 mM at optimal pH values for each electrode types. Current value of glucose free solution was subtracted from current values of glucose solutions to calculate the response of electrode depending on substrate concentration. As seen in Figs. 6a, 6b, current values increase in parallel with the rise in glucose concentration at Pt/PPY-GOD_{pTSA} and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrodes, respectively.

Electrodes (current values were measured by 10 mM glucose solution in optimal pH buffers) linearity was observed upto 1.0 mM while current values were not proportional with glucose concentration at upper concentration values.

I_{max} values were calculated as 25.4 and 14.2 μ A whereas K_M^{app} values were 5.2 and 1.7 mM for Pt/PPY-GOD_{pTSA} and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrodes, respectively by using Lineweaver-Burk plots. It was clearly seen that, response

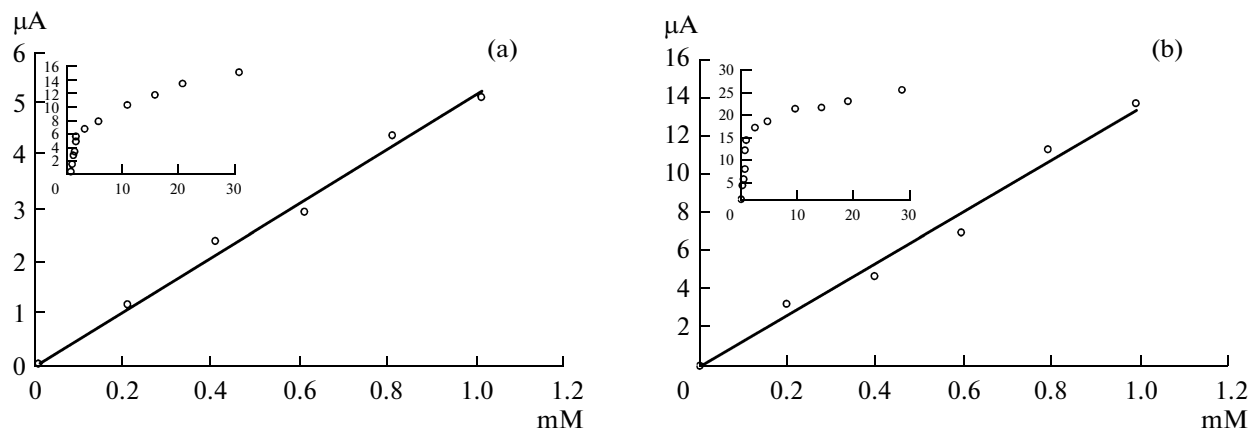


Fig. 6. The effect of glucose concentration (mM) on current responses (μA) of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode (at pH 4.5, a) and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode (at pH 7.0, b).

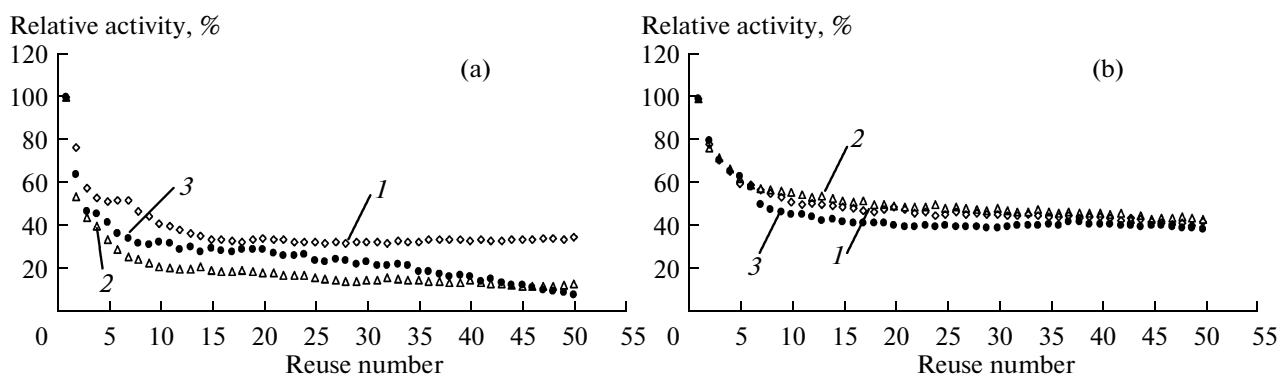


Fig. 7. Reusability of Pt/PPY-GOD_{pTSA} (a) and Pt/PPY-GOD_{NapTS} (b) electrodes in glucose solution at different concentration 5 (1), 10 (2), 20 mM (3).

of Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode was as two much as higher than that of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode. Moreover, K_M^{app} value of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode was higher than that of Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode. It may be probably due to acidic medium of pTSA electrolyte solution used for preparation of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode which played a role in partial denaturation of GOD protein causing a decline in affinity to glucose substrate. It was observed that PPy film was synthesized as more conductive when pTSA electrolyte was used as electrolyte as seen from Fig. 4 and Fig. 5. However, when current value of glucose free solution was subtracted from glucose solution at certain concentration, it was clearly seen that Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode showed better biosensor response. So, these results indicated that biosensor response was more affected from GOD efficiency. Ma et al. [30] prepared GOD/PPy film on to Pt electrode by adsorption of GOD on PPy polymer, and they found linearity ranging between 0 and 17 mM at a potential of 0.40 V [30]. Ekanayake and Preethichandra [31] established an amperometric glucose biosensor by adsorbing GOD onto platinum-coated nonporous alumina electrode and they

reported the K_M^{app} and I_{max} values as 7.01 mM and 120 μA , respectively.

Operational stability of Pt/PPY-GOD_{pTSA} and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrodes was investigated by 50 repeated uses in three glucose solutions at 5, 10 and 20 mM. Results were given in terms of relative activity percentage depending on reuse number in Figs. 7a and 7b for Pt/PPY-GOD_{pTSA} and Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrodes, respectively.

As observed usually in enzymatic studies in the literature, response sharply declined in the first 5 uses and then decreased slowly in subsequent uses for all measurements. Operational stability of Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode was not affected from glucose concentration as seen in Fig. 7b. Operational stabilities which realized as approximately 40% at the end of 50 uses were similar for Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode used with 5, 10 and 20 mM glucose substrates. However, in the case of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode, while similar results were obtained for 10 and 20 mM glucose (approximately 10%), more stability (35.2%) was observed for 5 mM glucose solution at the end of 50 uses. Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode showed better operational

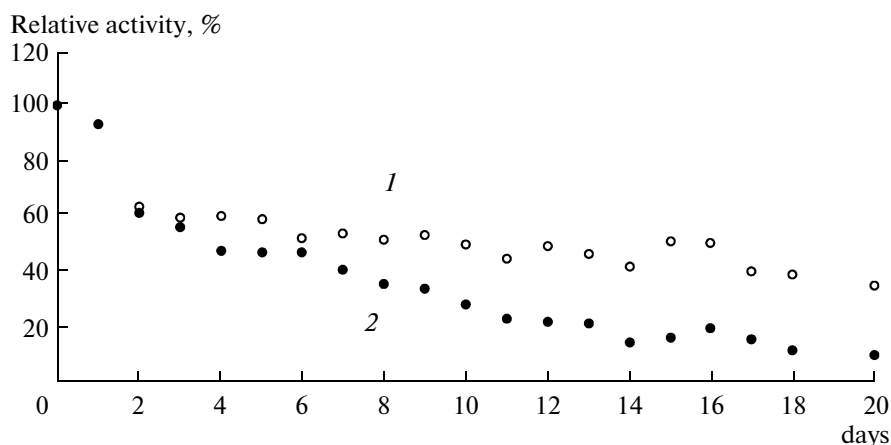


Fig. 8. Storage stability of Pt/PPY-GOD_{NapTS} (1) and Pt/PPY-GOD_{pTSA} (2) electrodes (current values were measured by 10 mM glucose solution in optimal pH buffers).

stability than that of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode. Immobilized enzymes generally lose activity depending on the number of uses [32, 33]. In the case of GOD, two more factors namely production of H₂O₂ and gluconic acid cause decrease in activity by repeated use. H₂O₂ inactivate GOD [34, 35] and decrease pH by gluconic acid accumulation around the microenvironment of GOD [32] and then causing denaturation of the enzyme. It was expected that if the amounts of accumulated H₂O₂ and gluconic acid varied, the decrease in activity would change too. But, when Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode was used, the tendencies of 3 curves were almost the same. It may be glucose concentrations were higher than K_M values of 1.7 mM, which caused a similar activity close to V_{max} . On the other hand, H₂O₂ did not accumulate due to its electrochemical oxidation, so it did not cause an inactivation. However, in the case of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode whose K_M value was 5.2 mM, it was supposed that, GOD activity in consequence of gluconic acid accumulation increased by increasing glucose concentration. Therefore, stability decreased by increasing the glucose concentration upto 40th uses, as seen in Fig. 7a. Better operational stability was observed with Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode probably due to partial neutralization of gluconic acid by reaction solution

with pH 7.0, which was higher than that of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode (pH 4.5).

Storage stabilities of Pt/PPY-GOD_{NapTS} and Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrodes were investigated for 20 days and results were given in Fig. 8. As seen, Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode was more stable than that of Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode. Pt/PPY-GOD_{NapTS} and Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrodes showed 34.6 and 9.32% of their initial activity, respectively. It should be noted that electrodes were repeatedly used while investigating storage stability. So, results exhibited not only storage stability, but also operational stability. Another reason for decline in the response of both Pt/PPY-GOD electrodes might be the leaching out GOD from the PPy during glucose sensing.

Pt/PPY-GOD_{NapTS} and Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrodes were also used to determine the glucose concentrations of varied beverages such as malt drink, fizzy drink, wine, fresh grape juice and honey. Measurements were done by properly diluting each sample. Glucose concentrations were also determined spectrophotometrically by glucose kit. As seen in table, glucose levels of five beverages determined by Pt/PPY-GOD_{NapTS} electrode was more similar to UV results. Although glucose concentrations of malt drink, fizzy drink and honey were similar to glucose values obtained spectrophotometrically, results of fresh grape

Compared of Pt/PPY-GOD_{NapTS} and Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrodes according to glucose level measurements of varied beverages

Samples	Glucose level determined by glucose kit, w/v %	Glucose level by Pt/PPy-GOD electrodes, w/v %	
		Pt/PPY-GOD _{pTSA}	Pt/PPY-GOD _{NapTS}
Malt Drink	3.47	3.61	3.37
Fizzy Drink	4.29	4.27	4.34
Fresh Grape Juice	5.68	2.35	5.36
Honey	28.48	28.70	27.2
Wine	0.05	0.09	0.04

juice and wine were not satisfying when Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrode was used.

There are several studies about GOD entrapment in PPy to establish the glucose biosensor in electrolyte solutions at different pH such as pH 7.0 [14, 36], pH 5.0. Uang and Chou [22] prepared glucose biosensor by GOD entrapment in PPy on Pt rod in KCl electrolyte with different pH between 2.8 and 11.5 by galvanostatic method, and they reported that the best results were obtained in terms of response when they constructed the biosensor at the neutral pH. In this study we firstly focused on pH effect of electrolyte solution which was used for enzyme electrode preparation. As anions were the same as *p*-toluenesulphonate in both media, only acidities were different.

Pt/PPY-GOD_{NapTS} and Pt/PPY-GOD_{pTSA} electrodes were prepared with cyclic voltametry technique in two different electrolyte solutions with NapTS and pTSA electrolytes which were neutral and acidic solutions, respectively. Entrapment of GOD into PPy was achieved in both electrolyte systems as explained in electrochemical and biochemical characterization studies. While acidic medium is preferred to enhance conductivity of polypyrrole, it also causes the partial denaturation of GOD enzyme. So, it was concluded that NapTS proved to be better medium to construct enzyme electrode in terms of response, operational stability, storage stability and analytical applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by Scientific Research Units of the University of Mustafa Kemal in Turkey, Project Nos. 01 Y 0103 and 06 F 0502.

REFERENCES

1. Yebra, M.C., Gallego, M., and Valcarcel, M., *Anal. Chim. Acta*, 1993, vol. 276, pp. 385–391.
2. Undeen, A.H., Vander, and Meer R.K., *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2007, vol. 41, pp. 129–132.
3. Hall, M.B. and Keuler, N.S., *J. Aoac Int.*, 2009, vol. 92, pp. 50–60.
4. Yuen, V.G. and McNeill, J.H., *J. Pharmacol. Toxicol.*, 2000, vol. 44, pp. 543–546.
5. Lee, J. and Park, S.M., *Anal. Chim. Acta*, 2005, vol. 545, pp. 27–32.
6. Voloshin, A.G., Teterin, G.A., Kolesnikova, I.P., Metelichenko, B.L., Kapenasyuk, N.S., Kalyuzhnaya, E.A., Muntyan, G.I., Seidguseinov, A.A., Kalikhman, V.L., *Ukrainskii Khimicheskii Zhurnal*, 1985, vol. 51, pp. 845–848.
7. Garjonyte, R., Malinauskas A., *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 1999, vol. 56, pp. 85–92.
8. Eftekhari, A., *Synthetic Met.*, 2004, vol. 14, pp. 211–216.
9. Rubio Retema, J., Lopez Cabarcos, E., Mecerreyes, D., and Lopez-Ruiz, B., *Biosens. Bioelectron.*, 2004, vol. 20, pp. 1111–1117.
10. Gerard, M. and Malhotra, B.D., *Curr. Appl. Phys.*, 2005, vol. 5, pp. 174–177.
11. Shan, D., Wang, S., He, Y., and Xue, H., *Mater. Sci. Eng. C*, 2008, vol. 28, pp. 213–217.
12. Skinner, N.G. and Hall, E.A.H., *J. Electroanal. Chem.*, 1997, vol. 420, pp. 179–188.
13. Liu, X., Neoh, K.G., Cen, L., and Kang, E.T., *Biosens. Bioelectron.*, 2004, vol. 19, pp. 823–834.
14. Reiter, S., Habermüller, K., and Schuhmann, W., *Sens. Actuat. B-Chem.*, 2001, vol. 79, pp. 150–156.
15. Shirsat, M.D., Too, C.O., and Wallace, G.G., *Electroanal.*, 2008, vol. 20, pp. 150–156.
16. Borole, D.D., Kapadi, U.R., Mahulikar, P.P., and Hundiwale, D.G., *J. Mater. Sci.*, 2007, vol. 42, pp. 4947–4953.
17. Liu, C.J., Kuwahara, T., Yamazaki, and R., Shimomura, M., *Eur. Polym. J.*, 2007, vol. 43, pp. 3264–3276.
18. Ekinici, E., Karagozler, A.A., and Karagozler, A.E., *Synthetic Met.*, 1996, vol. 79, pp. 57–61.
19. Jing-Juan, X. and Hong-Yuan, C., *Anal. Biochem.*, 2000, vol. 280, pp. 221–226.
20. Nien, P.C., Tung, T.S., and Ho, K.C., *Electroanal.*, 2006, vol. 18, pp. 1408–1415.
21. Angaleeswari, B., Dura Amirtham, R.M., Jeevithaa, T., Vaishnavi, V., Eevera, T., Berchmans, S., and Yegnarman, V., *Sensors Actuat. B-Chem.*, 2008, vol. 129, pp. 558–565.
22. Uang, Y.M. and Chou, T., *Biosens. Bioelectron.* 2003, vol. 19, pp. 141–147.
23. Fortier, G., Brassard, E., and Belanger, D., *Biosens. Bioelectron.*, 1990, vol. 5, pp. 473–490.
24. Shin, M.C. and Kim, H.S., *Biosens. Bioelectron.*, 1996, vol. 11, pp. 161–169.
25. Wang, J.J., Myung, N.V., Yun, M.H., and Monbouquette, H.G., *J. Electroanal. Chem.*, 2005, vol. 575, pp. 139–146.
26. Chen, C., Jiang, Y., and Kan, J., *Biosens. Bioelectron.*, 2006, vol. 22, pp. 639–643.
27. Saidman, S.B., *Electrochim. Acta*, 2003, vol. 48, pp. 1719–1726.
28. Yu, E.H. and Sundmacher, K., *Process Saf. Environ.*, 2007, vol. 85, pp. 489–493.
29. Ren, X., Jiang, Y., Liang, X., Liu, J., and Zhang P., *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, The 2nd Int. Conference on 16–18 May, Shanghai, 2008, pp. 1617–1620.
30. Ma, M., Qu, L., and Shi, G., *J. Appl. Polym. Sci.*, 2005, vol. 98, pp. 2550–2554.
31. Mala Ekanayake, E.M.I., and Preethichandra, D.M.G., *IEEE Instrum. Meas.*, 2008, vol. 57, pp. 1621–1626.
32. Ozyilmaz, G. and Tukul, S.S., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2007, vol. 43, pp. 29–35.
33. Ozyilmaz, G. and Tukul, S.S., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, vol. 17, pp. 960–967.
34. Kleppe, K., *Biochemistry*, 1966, vol. 5, pp. 139–143.
35. Greenfield, P.F., Kittrell, J.R., and Laurence, R.L., *Anal. Biochem.* 1975, vol. 65, pp. 109–124.
36. Olea, D., Viratelle, O., and Faure, C., *Biosens. Bioelectron.*, 2008, vol. 23, pp. 788–794.

УДК 576.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КУЛЬТУР АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2011 г. С. В. Рогатых*, А. А. Докшукина**, Т. С. Хайнасова*, С. В. Мурадов*, И. А. Кофиади**

* Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский, 683002

** ЗАО “НПФ ДНК-Технология”, Москва, 115478

e-mail: kofiadi@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Проведена оценка эффективности нескольких методов очистки ДНК в отношении представителей накопительных культур сообщества ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из сульфидных руд месторождения Шануч (полуостров Камчатка). Протестированы методики очистки ДНК, использующие различные комбинации физических (нагревание до 65–98°C, перетираание с частицами SiO₂), ферментативных (обработка лизоцимом и протеиназой К) и химических (обработка GuSCN, СТАВ и КОН) воздействий на клетки. Оценку эффективности проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Наилучший результат был получен для комбинированной методики, основанной на лизирующей активности GuSCN (лизис при 65°C) с последующей очисткой фенолом и хлороформом.

Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы являются важным компонентом сообществ, выщелачивающих металлы из сульфидных медно-никелевых руд. Изучение структуры, экологии и филогении сообществ хемолитотрофных микроорганизмов позволяет по-новому взглянуть на некоторые фундаментальные и прикладные аспекты биогеохимии и биотехнологии. Одним из наиболее перспективных подходов к изучению микробиотических сообществ является анализ структуры ДНК микроорганизмов, входящих в их состав. Преимуществом технологий молекулярно-анализа перед классическими микробиологическими методами, основанными на культуральном анализе, является отсутствие искажений, обусловленных недостаточной разрешающей способностью последних [1].

Наиболее привлекательным с точки зрения практики является вопрос определения количественного соотношения различных микроорганизмов в сообществах, обладающих повышенной окислительной активностью. Решение этой задачи открывает новые возможности для создания максимально эффективных сообществ. Одним из наиболее перспективных методов количественного анализа микробиотических сообществ в настоящее время является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени [2]. Этот метод хорошо зарекомендовал себя в самых различных областях науки в качестве надежного инструмента для специфического количественного анализа нуклеиновых кислот [3].

Достоверность молекулярно-биологических методов, используемых при анализе структуры сообществ микроорганизмов, зависит от качества препарата ДНК и репрезентативности смеси нуклеи-

новых кислот, полученных в результате очистки. Некоторые методы выделения ДНК могут вносить искажение в результат количественного анализа за счет неэффективного лизиса клеток, сорбции ДНК на частичках грунта, наличия в препарате ферментативных и других ингибиторов, а также потери ДНК или нарушения ее структуры. Кроме того, качество препарата оказывает влияние на эффективность анализа, основанного на методах прямого определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) и клонирования, широко применяемых при изучении структуры сообществ [4].

Существует несколько способов физического воздействия на клетки с целью последующей очистки содержащихся в них нуклеиновых кислот. К самым распространенным из них относятся обработка ультразвуком, нагревание, перетираание и разрушение клеточной стенки методом замораживания/оттаивания [5–7]. Химические способы разрушения клеток основаны на лизирующей активности некоторых солей и детергентов [5]. И, наконец, к третьему распространенному способу воздействий относятся ферментативные подходы, использующие активность лизоцима и протеиназы К [5, 8]. Следует отметить, что наиболее распространенные методы выделения ДНК практически всегда представляют собой комплексный подход, включающий несколько этапов пробоподготовки [9].

Полученные в ходе очистки препараты ДНК не должны содержать примесей веществ, способных повлиять на эффективность и надежность анализа, основанного на секвенировании и клонировании фрагментов нуклеиновых кислот. Кроме того, получаемая смесь нуклеиновых кислот должна быть репрезентативной и, по возможности, сохранять количественное соотношение копий геномов каж-

дого вида, входящего в состав пробы. Выполнение последнего условия необходимо для проведения точного количественного анализа сообществ.

Цель работы – апробация нескольких способов выделения ДНК и выбор метода наиболее подходящего для анализа накопительных культур сообщества ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов.

МЕТОДИКА

Культуры. Для оценки эффективности полимеразной цепной реакции использовали серии десятикратных разведений чистых культур *Acidithiobacillus thiooxidans* [10], *Acidithiobacillus ferrooxidans* [10], *Sulfobacillus* sp. [11] и *Ferroplasma* sp. [12], любезно предоставленные сотрудниками лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов Института микробиологии им. Виноградского РАН.

Анализ эффективности выбранных методик очистки ДНК проводили с использованием накопительных культур автохтонных сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из сульфидных руд месторождения Шануч (полуостров Камчатка). Предположительно в выделенных автохтонных сообществах содержатся тионовые эубактерии (*Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *A. caldus*), железобактерии (*Leptospirillum ferrooxidans*, *L. thermoferrooxidans*, *L. ferriphilum*), *Alicyclobacillus disulfidooxidans*, *Sulfobacillus acidophilus*, *S. thermosulfidooxidans*, археи (*Ferroplasma acidiphilum*, “*F. acidarmanus*”, *F. cupricumulans*) [13]. Выделение микроорганизмов осуществляли классическими методами, выращивая железоокисляющие бактерии и археи на среде Сильвермана–Люндгрена 9 К [14], а серуокисляющие – на среде того же минерального состава, но с 1% (вес/об.) элементной серы. Накопительные культуры выращивали на среде Сильвермана–Люндгрена 9 К без железа [14]. В сравнении принимали участие 2 типа проб: содержащие микроорганизмы, прикрепленные к частицам грунта и содержащие преимущественно свободные клетки.

Методы выделения ДНК. Для оценки эффективности методов выделения ДНК из смешанных культур, а также для выбора наиболее удобной и универсальной методики, нами были отобраны несколько комбинированных протоколов очистки ДНК, основанных на различных типах воздействия на клетки эубактерий и архей (табл. 1). Были проанализированы методики, основанные на физическом (перетирание клеток с частицами SiO₂), ферментативном (обработка протеиназой К и лизоцимом) и химическом (обработка GuSCN и бромидом цетилтриметиламмония, СТАВ) воздействии на клетки. Кроме того, нами была разработана комбинированная методика, основанная на щелочном лизисе (KOH) в присутствии низкомолекулярного полимера полиэтиленгликоля (ПЭГ-200). ПЭГ добавляли для повышения pH раствора. В присутствии ПЭГ pH при неизменной концентрации KOH возрастает в 10 раз. Объяснить эф-

Таблица 1. Варианты воздействия на клеточную стенку микроорганизмов, используемые в комбинированных методах очистки ДНК

Вариант	Физическое воздействие	Ферментативное воздействие	Химическое воздействие
1	Частицы SiO ₂	–	+SDS
2	Температура	+	–
3	»	–	+GuSCN
4	»	–	+СТАВ
5	»	–	+KOH

фект можно особенностями механизмов взаимодействия ПЭГ и воды. Молекулы ПЭГ, несущие на своей поверхности отрицательный заряд, во-первых, усиливают диссоциацию молекул воды, а, во-вторых, обладают способностью связывать свободные ионы H⁺, увеличивая тем самым концентрацию свободных ионов OH[–] [15].

Ниже приведено описание использованных методик. Для выделения ДНК во всех случаях брали 500 мкл образца (в среднем 0.0015 мг сырой биомассы клеток). Перед этапом лизиса пробы промывали фосфатным буфером (pH 1.8) 2 раза. После каждой промывки клетки и частицы грунта осаждали центрифугированием при 13000 g в течение 10 мин.

1. **Перетирание с частицами SiO₂.** Осадок ресуспендировали в 200 мкл раствора, содержащего 20% ДДС (100 мМ NaCl, 500 мМ трис, pH 8.0, 20% ДДС). К раствору добавляли 20 мкл частиц SiO₂ (5 мг/мл) производства “Sigma-Aldrich” (США) в ТЕ-буфере и перемешивали на вортексе “BioSan” (Латвия) в течение 5–10 мин. После сорбции ДНК частицы осаждали центрифугированием, супернатант удаляли. ДНК элюировали в 100 мкл воды при 60°C [16].

2. **Обработка протеиназой К и лизоцимом.** Осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера А (100 мМ NaCl, 100 мМ трис, 1 мМ цитрата натрия, 5 мМ CaCl₂, 25 мМ ЭДТА, pH 8.0. К раствору добавляли 60 мкл лизоцима (100 мг/мл) “Fermentas” (Литва) и инкубировали при 37°C в течение 40 мин. Добавляли 10 мкл 20%-ного ДДС, 60 мкл протеиназы К (20 мг/мл) “Fermentas”, инкубировали при 50°C в течение 30 мин [17].

3. **Обработка GuSCN.** Осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (5.25 М GuSCN, 50 мМ трис, pH 6.4, 20 мМ ЭДТА, 1.3%-ный тритон), инкубировали в течение 30 мин при 65°C [18].

4. **Обработка СТАВ.** Осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (0.2 М трис-HCl pH 8.0, 0.05 М ЭДТА, 2 М NaCl, 2%-ный СТАВ) инкубировали в течение 30 мин при 65°C.

5. **Обработка KOH в присутствии ПЭГ.** Осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (10% ПЭГ-200, 20 мМ KOH), инкубировали 10 мин при 98°C.

После этапа лизиса проводили очистку от ингибиторов с помощью стандартной методики фенол-

хлороформной экстракции [19]. После преципитации ДНК растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСI рН 8.6, 1 мМ ЭДТА).

Создание универсальных праймеров. Важным условием настоящего исследования было получение препарата ДНК, содержащего фрагменты нуклеиновых кислот всех или, по крайней мере, основных представителей ацидофильных хемолитотрофных сообществ. Для этой цели нами были созданы пары универсальных праймеров, позволяющих с высокой эффективностью амплифицировать фрагменты гена 16S рРНК большинства эубактерий и архей. Для подбора универсальных праймеров использовали базу данных GenBank и алгоритм Blast сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). В общей сложности было проанализировано 5000 последовательностей. На основании анализа было отобрано несколько участков, обладающих высокой степенью сходства. В случае с единичными вырожденными нуклеотидами использовали эквимольную смесь праймеров полностью комплементарных каждому из вариантов последовательности. Ни один из праймеров не содержал более одного вырожденного нуклеотида. Последовательности 7 праймеров, дающих в парных комбинациях 8 ПЦР-продуктов различной длины (рис. 1) приведены в табл. 2.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Для оценки эффективности методов очистки ДНК использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени. На сегодняшний день это единственный метод, позволяющий осуществлять прямой количественный анализ нуклеиновых кислот. При проведении ПЦР использовали пары универсальных праймеров, позволяющих амплифицировать суммарную ДНК в пробе. ПЦР проводили по следующей программе: 94°C – 10 с, 70°C – 20 с, 72°C – 10 с в течение 40 циклов с измерением флуоресценции при 70°C на приборе ДТ-96 (ЗАО “НПФ ДНК-Технология”, Россия). Для контроля воспроизводимости результатов ПЦР все образцы тестировали дважды. Использовали полимеразу HS Taq (ЗАО “Евроген”, Россия). Визуализацию накопления продукта реакции осуществляли с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green (“Sigma-Aldrich”, США). Данная модификация метода обладает преимуществом перед методиками, использующими линейные зонды (типа taqman) или молекулярные маячки (molecular beacons) – она позволяет избежать отклонений в термодинамике реакции, вызванных вводом дополнительных олигонуклеотидов [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность ПЦР. Сохранение исходного соотношения копий геномов микроорганизмов разных видов (исходного соотношения нуклеиновых кислот разных типов), представляет собой наиболее сложную задачу. Нарушение этого соотношения может повлиять на результат дальнейших исследований. Прямых способов проведения

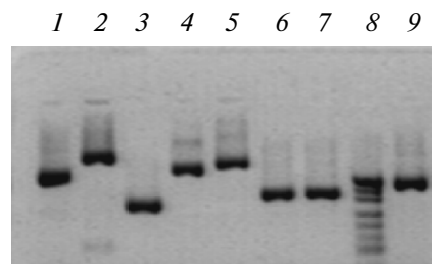


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при амплификации фрагмента гена 16S рРНК, с использованием парных комбинаций разработанных праймеров: 1 – upr1-d + upr2-r (562 п.н.), 2 – upr1-d + upr3-r (898 п.н.), 3 – bac2-d + upr2-r (293 п.н.), 4 – bac2-d + upr4-r (630 п.н.), 5 – bac2-d + 1427-r (724 п.н.), 6 – upr2-d + upr3-r (358 п.н.), 7 – upr2-d + upr4-r (363 п.н.), 9 – upr2-d + 1427-r (457 п.н.), 8 – маркер.

такой оценки не существует. Однако если используемые в реакции праймеры амплифицируют фрагменты ДНК различных видов с одинаковой эффективностью, можно говорить о том, что смесь нуклеиновых кислот, получаемая в ходе реакции, будет содержать фрагменты, специфичные для основных представителей анализируемого сообщества, и при этом исходное соотношение нуклеиновых кислот различных групп микроорганизмов будет сохраняться. Поэтому одной из наших задач стало создание универсальной пары праймеров, обеспечивающей одинаковую эффективность ПЦР при амплификации гена 16S рРНК бактерий и архей. Универсальность разработанных праймеров и эффективность ПЦР проверяли на чистых культурах основных представителей ацидофильных хемолитотрофных сообществ: *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Sulfobacillus* sp. и *Ferroplasma* sp. Эффективность определяли методом серийных десятикратных разведений [3]. Зная кратность разведений и пороговый цикл *Ct* (первый цикл, на котором сигнал накопления специфического продукта достоверно превышает уровень шумов) можно построить стандартную прямую (график зависимости порогового цикла от исходной концентрации матрицы), по углу наклона которой можно оценить эффективность ПЦР. Расчет эффективности ПЦР проводили с помощью программы ДТ-96 v. 7.3.

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных в работе

Праймер	Последовательность праймера
upr1-d	GTGCCAGCHGCCGCGGTA
upr2-d	TGCATGGCYGTCGTCAGCTCGT
upr2-r	ACGAGCTGACGACRCCATGCA
upr3-r	TGACGGGCGGTGTGTRCAAGG
upr4-r	TGGTTTGACGSGCGGTGTGT
bac2-d	ATTAGATACCCBGGTAGTCC
1427-r	TACCTTGTTACGACTTMACCC

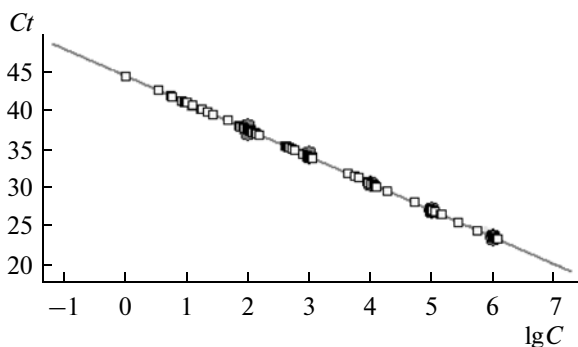


Рис. 2. Стандартная прямая, построенная по результатам ПЦР в реальном времени. Использована серия десятикратных разведений чистых культур *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Sulfobacillus* sp. и *Ferroplasma* sp. По оси ординат отложены значения пороговых циклов (C_t); по оси абсцисс логарифм ($\lg C$) концентрации ДНК (копий геномов на реакцию). Эффективность ПЦР – 93%, среднее квадратичное отклонение – $\sigma = 0.23$, достоверность аппроксимации $R^2 = 0.9978$.

(ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия). На рис. 2 приведен пример определения эффективности ПЦР путем построения стандартной прямой. В сравнении принимали участие 8 пар праймеров (табл. 2). Наилучший результат был получен для пары праймеров *urp2-d/urp3-g*. Они позволяют детектировать ДНК всех исследованных микроорганизмов с эффективностью $\geq 93\%$.

Анализ эффективности выбранных методов выделения ДНК. На сегодняшний день не существует общепринятой методологии очистки нуклеиновых кислот из смешанных культур микроорганизмов. Однако для решения задач, связанных с количественным анализом микробиотических сообществ, вопрос качества препарата нуклеиновых кислот является принципиальным. Так, например, недостаточная очистка от ингибиторов (гуминовых кислот или ионов железа, содержащихся в средах для выращивания железобактерий) оказывает влияние на эффективность работы Taq-полимеразы и приводит к искажению результатов количественной ПЦР [20, 21]. Кроме того, смешанные сообщества могут содержать микроорганизмы из различных таксономических групп, обладающих различной устойчивостью к механическому, химическому или ферментативному воздействию. Так, например, из-за особенностей строения клеточной стенки, грам– клетки разрушаются легче, чем грам+, что приводит к изменению исходного соотношения различных типов нуклеиновых кислот и, как следствие, к некорректным результатам количественного анализа. Выбранные нами методы продемонстрировали значительные отличия в эффективности выделения нуклеиновых кислот из накопительных культур. Это может объясняться и различной эффективностью очистки от ингибиторов и комплексным составом исследованных образцов. По данным микроскопического анализа к основным видам сообществ месторождения Шануч относятся как грам+ (*Sulfobacillus* sp.) так и грам– (*Acidithiobacillus* sp.) бактерии, а также археи (*Ferroplasma* sp.), лишенные клеточной стенки. Наилучший результат получен для методики, основанной на лизирующей активности GuSCN (рис. 3а). Специфический сигнал в отрицательном контроле ПЦР объясняется недостаточной очисткой препарата Taq-полимеразы от остатков нуклеиновых кислот *E. coli*, используемых при производстве фермента. Сходный по эффективности результат

получен для методики, основанной на лизирующей активности GuSCN (рис. 3а). Специфический сигнал в отрицательном контроле ПЦР объясняется недостаточной очисткой препарата Taq-полимеразы от остатков нуклеиновых кислот *E. coli*, используемых при производстве фермента. Сходный по эффективности результат

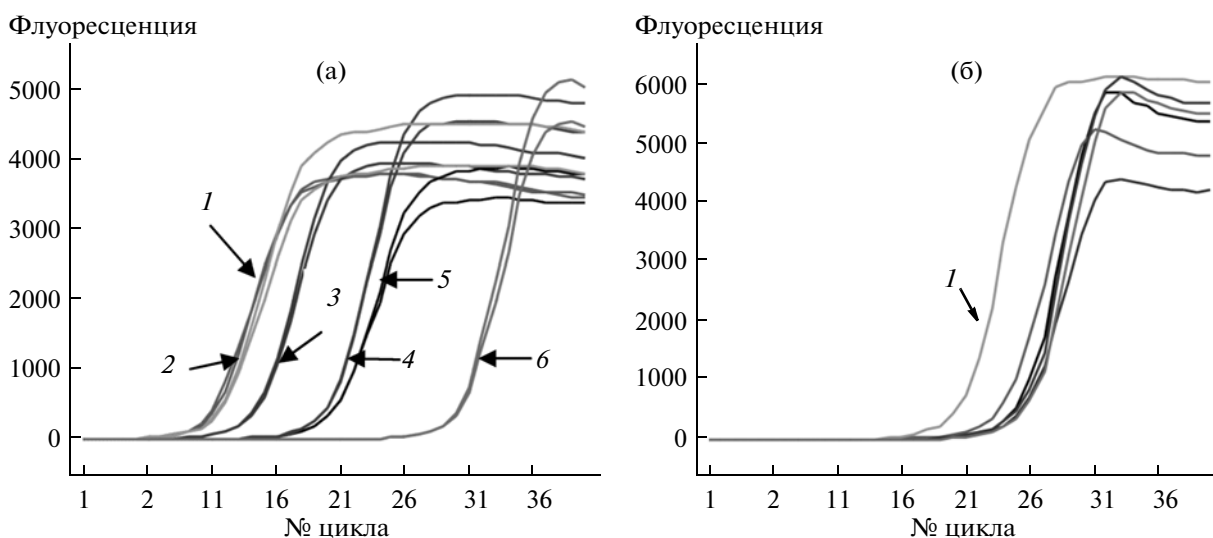


Рис. 3. Сравнение эффективности методик очистки ДНК по результатам ПЦР в реальном времени. а – сравнение всех методик: 1 – лизис GuSCN, 2 – ферментативный лизис, 3 – лизис КОН в присутствии ПЭГ-200, 4 – лизис СТАВ, 5 – перетирание с частицами SiO_2 , 6 – отрицательный контроль ПЦР. б – сравнение результатов ПЦР в реальном времени для контролей выделения всех методик и отрицательного контроля ПЦР; 1 – контроль выделения для методики с использованием протеиназы К и лизоцима (ферментативный лизис).

был получен для ферментативной методики, однако в данном случае на результат количественной ПЦР оказали влияние остатки бактериальных нуклеиновых кислот, содержащиеся в реагентах, использованных при выделении ДНК (рис. 3б). Недостаточная степень очистки ферментов от нуклеиновых кислот приводит к значительным искажениям результатов количественного анализа. Нами показана низкая эффективность методик основанных на лизирующей активности СТАВ и на физическом воздействии на клетки с помощью частиц SiO₂. Для методики, основанной на лизирующей активности КОН, в присутствии ПЭГ-200 получен средний результат, однако ее принципиальным недостатком является низкая степень очистки препарата ДНК от ингибиторов, в частности ионов железа, содержащихся в некоторых культуральных средах. В то же время этот метод показал лучший результат для проб, содержащих микроорганизмы, не окисляющие железо. Значимых отличий в эффективности лизиса между пробами, содержащими свободные и прикрепленные клетки, обнаружено не было.

Полученные результаты позволяют рекомендовать методику, основанную на лизирующей активности GuSCN (лизис при 65°C) с последующей очисткой фенолом и хлороформом, при проведении молекулярного анализа структуры сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ammann R., Ludwig W., Schleifer K.H. // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. P. 143–169.
2. Zammit C.M., Mutch L.A., Watling H.R., Watkin E.L.J. // Hydrometallurgy. 2008. V. 94. № 1–4. P. 185–189.
3. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. // ПЦР “в реальном времени”. М.: БИНОМ, 2009. 215 с.
4. Schneegurt M.A., Dore S.Y., Kulpa C.F.Jr. // Curr. Issues Mol. Biol. 2003. V. 5. № 1. P. 1–8.
5. Bruce K.D., Horns W.D., Hobman J.L., Osborn A.M., Strike P., Ritchie D.A. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 3413–3416.
6. Picard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme X., Simonet P. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 2717–2722.
7. Erb R.W., Wagner-Dubler I. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 4065–4073.
8. Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 316–322.
9. Miller D.N., Bryant J.E., Madsen E.L., Ghiorse W.C. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 4715–4724.
10. Kelly D.P., Wood A.P. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 511–516.
11. Головачева Р.С., Каравайко Г.И. // Микробиология. 1978. Т. 47. № 5. С. 815–822.
12. Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondratyeva T.F., Moore E.R., Abraham W.R., Lysndorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 997–1006.
13. Кузякина Т.И., Хайнасова Т.С., Левенец О.О. // Вестник КРАУНЦ. Науки о Земле. 2008. Т. 12. № 2. С. 76–86.
14. Каравайко Г.И., Росси Дж., Агапе А., Грудев С., Авакян З.А. // Биоготехнология металлов. Практическое руководство. М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. 376 с.
15. Chomczynski P., Rymaszewski M. // BioTechniques. 2006. V. 40. № 4. P. 454–458.
16. Boyle J.S., Lew A.M. // Trends in Genetics. 1995. V. 11. № 1. P. 8.
17. Liu C.-Q., Plumb J., Hendry P. // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 94. № 2. P. 330–336.
18. Патент РФ. 2001. № 2177035.
19. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 156–159.
20. Kermekchiev M.B., Kirilova L.I., Vail E.E., Barnes W.M. // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. № 5. P. 40.
21. Yue-li H., Dick W.A., Tuovinen O.H. // Biotechnol. Letters. 2002. V. 24. № 13. P. 1049–1053.

The Use of Real-time PCR Technology to Assess the Effectiveness of Methods of DNA Extraction from Cultures of Acidophilic Chemolithotrophic Microorganisms

S. V. Rogatykh^a, A. A. Dokshukina^b, T. S. Khainasova^a, S. V. Muradov^a, and I. A. Kofiadi^a

^a Research Geotechnological Center, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Petropavlovsk-Kamchatsky, 683002 Russia
e-mail: kofiadi@mail.ru

^b ZAO NPF DNA-Technology, Moscow, 115478 Russia

Received May 12, 2010

Abstract—Comparative evaluation of efficiency of several methods of DNA extraction from storage cultures of acidophilic chemolithotrophic microorganism communities isolated from sulfide ores of Shanuch ore deposit (Kamchatka peninsula) was conducted. DNA extraction methods in various combinations of physical (heating to 65–98°C, grinding with SiO₂ particles), enzymatic (treatment with lysozyme and proteinase K), and chemical (GuSCN, СТАВ and КОН) treatments were tested. The evaluation of efficiency was performed using Real-time PCR. The best result was obtained for the combined method based on GuSCN lysis activity (lysis at 65°C) followed by purification with phenol and chloroform.

УДК 577.113;578.7;579.61:616-078

МЕТОД АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ЕГО РЕАЛИЗАЦИЯ В МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЕ

© 2011 г. Д. Д. Мамаев, Д. А. Ходаков, Е. И. Дементьева, И. В. Филатов, Д. А. Юрасов,
А. И. Черепанов, В. А. Василюков, О. В. Смолдовская, Д. В. Зименков, Д. А. Грядунов,
В. М. Михайлович, А. С. Заседателев

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991

e-mail: grad@biochip.ru

Поступила в редакцию 5.06.2010 г.

Разработаны метод и устройство для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов. Метод включает разрушение бактериальных клеток и/или вирусных частиц (комбинированный ферментативный и химический лизис) и последующую экстракцию с очисткой нуклеиновых кислот на твердофазном сорбенте. Процедура осуществляется в автоматическом режиме внутри микрофлюидного модуля, изолированного от внешней среды, что сводит к минимуму контакт исследователя с потенциально инфекционным образцом и, как следствие, снижает риск заражения персонала. Модуль включает резервуары с лиофилизированными компонентами лизирующих и промывочного буферов; микроколону с твердофазным сорбентом; резервуары, содержащие воду, спирт и водно-спиртовые смеси для растворения сухих компонентов буферов, промывки микроколони и элюции нуклеиновых кислот; микроканалы и клапаны, необходимые для перемещения жидкостей внутри модуля. Модуль помещается в блок управления, осуществляющий подачу давления, нагрев, перемешивание реагентов и перемещение растворов в резервуарах модуля. Устройство способно выполнять эффективное выделение и очистку нуклеиновых кислот за 40 мин, а полученные препараты могут быть использованы непосредственно для проведения ПЦР и анализа с использованием биочипов.

Подавляющее большинство современных методов молекулярной диагностики основано на анализе специфических последовательностей нуклеиновых кислот (НК). Первой стадией молекулярно-генетических исследований является выделение нуклеиновых кислот (ДНК и/или РНК) из биологического материала: животных и растительных клеток, тканей, физиологических жидкостей (кровь, слюна и др.), а также из образцов почвы, воды, пищевых продуктов. В условиях интенсивного развития молекулярно-диагностических подходов изменились и современные требования к лабораторным методам выделения НК. Больше внимания стало уделяться возможности автоматизации процесса и применения универсальных методических протоколов выделения и очистки НК. К существенным требованиям относятся длительность и трудоемкость процедуры подготовки пробы для анализа, количество одновременно обрабатываемых проб, качество и количественный выход получаемых препаратов НК, а также безопасность выполнения процедуры персоналом исследовательских и медицинских лабораторий.

В настоящее время выделение и очистка НК из клинического материала в большинстве исследовательских лабораторий проводится вручную. К недостаткам такого подхода можно отнести трудоемкость, вероятность кросс-контаминации исследуемых образцов, а также высокий риск заражения персонала при работе с патогенными микроорганиз-

мами. По этой причине существует острая потребность в создании автоматизированных устройств для выделения и очистки нуклеиновых кислот, соответствующих современным требованиям.

Классические лабораторные методы выделения ДНК и РНК описаны, например, в [1–3]. Обработка образца для выделения нуклеиновых кислот включает разрушение клеток (мембран, клеточных стенок или вирусного капсида), денатурацию нуклеопротеиновых комплексов, удаление белков и иных примесных соединений. Наиболее широкое распространение получили методы с использованием твердофазных сорбентов, к которым относятся ионообменные смолы, кремниевые матрицы, силикагели, кварцевые и стеклянные частицы и волокна, диатомит, цеолиты и др. [5]. Твердофазные носители позволяют осуществить полную или частичную автоматизацию процедуры выделения и очистки, например, частицы стекла или кварца, система золь–гель [5, 6], а также носители в виде пористых монолитных матриц на основе кремния и различных полимеров с большой площадью поверхности и контролируемым размером пор [7, 8].

В последние годы наиболее популярным методом выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов становится способ с использованием магнитных частиц — магнитных микросфер, на поверхности которых иммобилизованы ли-

ганды для связывания биологических молекул [9–12]. Магнитные частицы с адсорбированными на них нуклеиновыми кислотами осаждаются под действием магнитного поля. Магнитные частицы получают на основе оксида железа, циркония, различных полимеров, пористых стекол и др. Увеличение сорбционной емкости частиц достигается путем модификации их поверхности.

Все большее распространение в мире получают миниатюрные устройства, которые включают все необходимое для проведения достаточно сложных биохимических анализов. Это так называемые аналитические микросистемы (micro total analysis systems, μ TAS), микрофлюидные устройства различного формата: кассеты, микрочипы, мини-диски и др., и “лаборатории-на-чипе и CD-дисках” [13–16]. Микрофлюидные системы содержат сеть микроканалов диаметром 100 мкм и менее, через которые пропускаются биологические образцы и растворы реагентов, а также резервуары, в которых проводится разделение компонентов, очистка, концентрирование и другие процедуры. В состав микрофлюидных систем входят также перемешивающие устройства, микродозаторы, микронасосы, фильтры и др. Описаны экспериментальные микрофлюидные устройства, в которых проводится выделение ДНК и ее амплификация, а в некоторых аппаратах также и последующая детекция [17–19].

Рядом крупных зарубежных компаний разработаны и выпущены в продажу сложные роботизированные системы, выполняющие выделение и очистку НК из биологических образцов в автоматическом режиме, например, приборы KingFisher (“Thermo Electron”, США), MagNA Pure LC и Cobas (“Roche Diagnostics”, Германия), BioRobot и QIASymphony (“Qiagen”, Германия), Maxwell System (“Promega”, США), Quickgene (“FujiFilm”, Япония). В большинстве устройств используется принцип сорбции нуклеиновых кислот на магнитных микросферах и, как правило, все устройства воспроизводят протокол “ручного” выделения ДНК и РНК, включая последовательное перемещение пробирок и многоканальное дозирование реагентов с использованием роботов [20]. Стоимость таких приборов составляет несколько миллионов рублей, себестоимость подготовки образца для последующего анализа остается достаточно высокой.

Несмотря на то, что в России рынок молекулярной диагностики быстро развивается, отечественные аналоги автоматизированных систем для выделения НК в настоящее время полностью отсутствуют.

Цель работы – создание унифицированной процедуры, позволяющей автоматизировать выделение и очистку НК из клеток, бактерий и вирусных частиц, а также устройства на основе оригинальных микрофлюидных модулей, которое бы выгодно отличалось от существующих аналогов простотой и безопасностью проведения анализа, высоким выходом продукта и невысокой стоимостью.

МЕТОДИКА

Реагенты и ферменты. В работе использовали лизоцим, гуанидингидрохлорид, гуанидинтиоцианат, *N*-лаурилсаркозинат натрия, тритон X-100, ЭДТА, буферы TE, воду, не содержащую нуклеаз (“Sigma”, США), протеиназу К (“Ambion”, США), молекулярные маркеры ДНК “GeneRuler™ High Range DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва) и PUC 19/MSP I “Силекс”, Россия), наборы для выделения РНК “RNeasy Mini” (“Qiagen”, Германия) и “Genomic DNA Purification Kit” (“Fermentas”, Литва), “ToTALLY RNA” (“Ambion”, США), стекловолокнистые фильтры серии GF: GF/B, GF/C, GF/D (“Whatman”, Германия), силикагель G-60 (“Merck”, Германия), термостабильную “HotTaq” ДНК-полимеразу “Силекс”, Россия), набор для проведения обратной транскрипции, совмещенной с ПЦР “One-step RT-PCR kit” (“Qiagen”, Германия).

Олигонуклеотиды. Синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе ABI-394 DNA/RNA synthesizer (“Applied Biosystems”, США) с использованием стандартного фосфорамидитного метода и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (комплекс “Gilson”, Франция). Олигонуклеотиды для иммобилизации в гелевых элементах биочипа содержали спейсер со свободной аминогруппой, введенной в процессе синтеза с использованием 5'-Amino-Modifier C6 (“Glen Research”, США).

Гидрогелевые биочипы. Биочипы изготавливали согласно ранее опубликованному протоколу [21]. Полимеризационную смесь, содержащую гелеобразующие мономеры и олигонуклеотидные зонды, наносили на пластиковую поверхность с помощью робота, с целью получения ячеек полусферической формы диаметром 600 мкм, отстоящих друг от друга на расстояние 300 мкм.

Выбор твердофазного носителя и условий экстракции нуклеиновых кислот. Для отработки процедуры выделения и очистки НК изготавливали микроколонки, в которые помещали твердофазные носители: водную суспензию силикагеля G60 (5 мкл) помещали в полипропиленовый цилиндр высотой 8 мм, диаметром 1.5 мм, либо два слоя стекловолокнистых фильтров GF (диаметром 7 мм) помещали в полипропиленовые цилиндры диаметром 8 мм. К лизату биологического образца (100–500 мкл) добавляли этанол и полученную смесь наносили на колонку с сорбентом. Колонку промывали смесью этанола (50 об. %) с 0.15 М трис-НСl буфером, рН 8.0, содержащим 0.05 М ЭДТА, 3 М гуанидингидрохлорида, и затем 80%-ным этанолом, высушивали в токе воздуха, и элюировали нуклеиновые кислоты водой или TE-буфером (10 мМ трис-НСl, рН 7.5; 1 мМ ЭДТА, рН 8.0).

Сменные микрофлюидные модули для выделения и очистки нуклеиновых кислот (рис. 1, 2). Основную рабочую платформу и верхнюю и нижнюю крышки модулей изготавливали методом литья из химически инертных полимерных материалов, не сорбирующих нуклеиновые кислоты, например, полипропи-

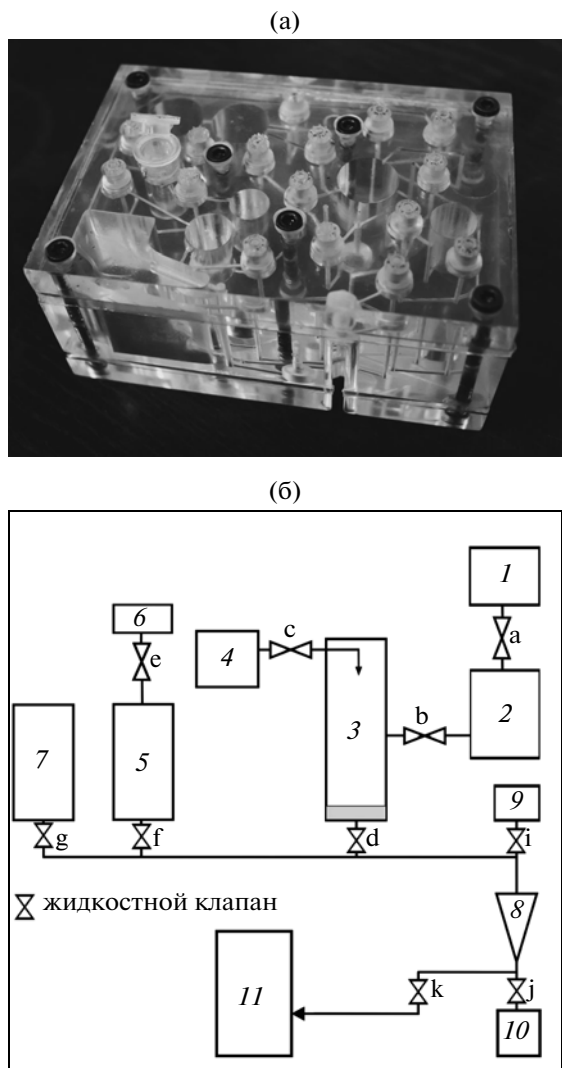


Рис. 1. Внешний вид (а) и принципиальная схема (б) сменного микрофлюидного модуля для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот: 1 – приемная камера для образца, 2 – резервуар с лиофилизованной реакционной смесью 1-го лизирующего буфера, 3 – резервуар с лиофилизованной реакционной смесью 2-го лизирующего буфера, 4 – резервуар, содержащий 96%-ный этанол для добавления к лизату биологического образца, 5 – резервуар с лиофилизованной смесью промывочного буфера, 6 – резервуар со смесью этанол–вода (1 : 1, об.) для растворения лиофилизованной смеси промывочного буфера, 7 – резервуар, содержащий 80%-ный этанол для промывки микроколони с твердофазным сорбентом, 8 – микроколонка с твердофазным сорбентом, 9 – резервуар с раствором для элюции нуклеиновых кислот с микроколони, 10 – резервуар для сбора очищенного продукта, 11 – резервуар для сбора отходов, а–к – клапаны, регулирующие перемещение жидкостных реакционных смесей и реагентов в резервуарах и каналах модуля.

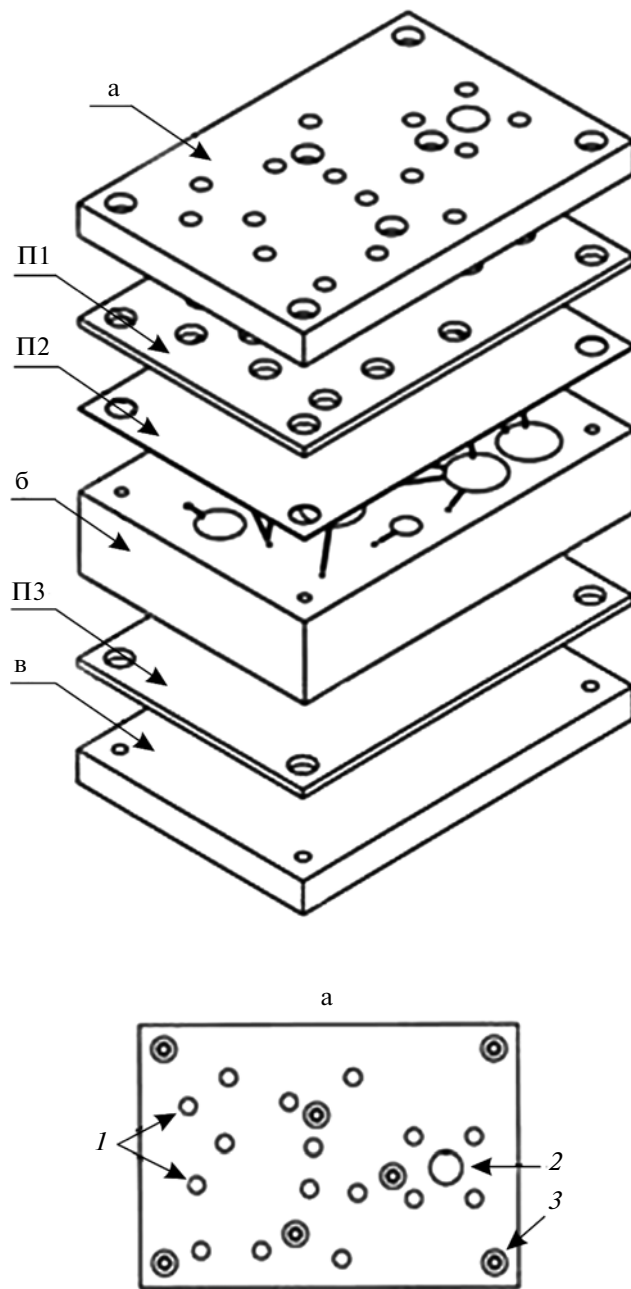


Рис. 2. Конструктивные элементы сменного микрофлюидного модуля (а, б, в): а – верхняя панель (крышка, вид сверху), полипропилен, 2 мм. На верхней панели расположены: 1 – отверстия для штоков соленоидов (16 шт.); 2 – отверстие для приемной камеры образца; 3 – отверстие для фиксирующих винтов; П1, П3 – прокладки, силикон, 2 мм; П2 – прокладка, полиэтилен, 50 мкм; б – основная рабочая платформа, полипропилен, 20 мм; в – нижняя панель (крышка), полипропилен, 7 мм.

лен, полистирол, полиметилметакрилат (оргстекло). Прокладки изготавливали из эластичных материалов, таких как силикон и полиэтилен. В работе ис-

пользовали микрофлюидные модули из полипропилена: основная рабочая платформа толщиной 20 мм, верхняя и нижняя панели (крышки) толщиной 7 мм

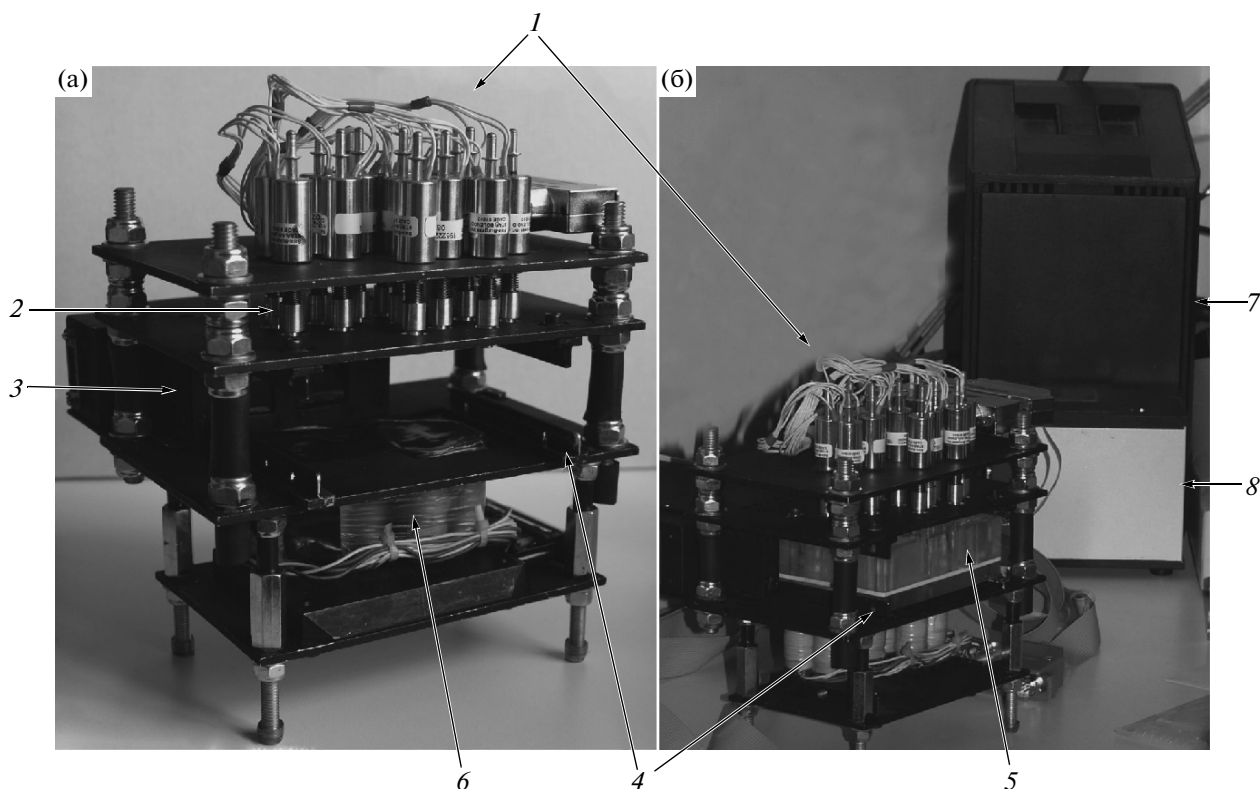


Рис. 3. Блок управления установки для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот (а – без микрофлюидного модуля, б – готовая к работе установка с помещенным в нее микрофлюидным модулем): 1 – блок соленоидов для управления клапанами микрофлюидного модуля, 2 – штоки соленоидов, 3 – блок нагревателей, 4 – направляющие салазки для помещения микрофлюидного модуля в блок управления, 5 – микрофлюидный модуль, 6 – блок электромагнитных мешалок, 7 – компрессор, 8 – блок электронного управления.

с прокладками из силикона “Пентэлэст Т4” (ООО “Пента-Юниор”, Россия) толщиной 2 мм и полиэтиленовой пленки универсальной толщиной 50 мкм. Элементы модуля были скреплены между собой с помощью винтов.

Подготовка микрофлюидного модуля к работе. В резервуар 2 микрофлюидного модуля объемом 1.0 мл (рис. 1б) помещали лиофилизованную смесь реагентов для приготовления 1-го лизирующего буфера, в резервуар 3 объемом 1.5 мл – лиофилизованную смесь реагентов для 2-го лизирующего буфера, в резервуар 5 объемом 1.0 мл – лиофилизованную смесь реагентов для промывочного буфера, содержащую хаотропный агент. В микроколонку помещали 5 мкл водной суспензии силикагеля G60 (твердофазный сорбент для связывания НК), колонку устанавливали в соответствующий резервуар 8. Резервуар 4 объемом 0.5 мл заполняли 96%-ным этанолом, резервуар 6 объемом 0.5 мл – смесью этанола и воды (1 : 1, об.), и резервуар 7 объемом 1.0 мл – 80%-ным этанолом, резервуар 9 объемом 0.2 мл – водой (или низкосолевым буфером, например, TE). Объем резервуара для сбора отходов составлял 5.0 мл.

При растворении лиофилизованных компонентов буферных растворов достигались следующие концентрации реагентов: 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 50 мг/мл лизоцима, pH 8.0 (1-ый лизирую-

щий буфер), 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 4.5 М гуанидингидрохлорида, 1 мг/мл протеиназы К, 0.5% *N*-лаурилсаркозината натрия, pH 6.5 (2-ой лизирующий буфер), 0.15 М трис-НСl, 0.05 М ЭДТА, 3 М гуанидингидрохлорида, pH 8.0 (промывочный буфер).

Для осуществления перемешивания растворов и реакционных смесей в процессе обработки образца в резервуары 2, 3 и 5 помещали магнитные мешалки – стальные стержни в тефлоновой оболочке.

Устройство для выделения и очистки нуклеиновых кислот. Устройство состояло из микрофлюидного модуля, блока управления и компьютера с соответствующим программным обеспечением для управления процедурой выделения и очистки НК (рис. 3). Микрофлюидный модуль, содержащий необходимые реагенты и компоненты для обработки биологических образцов, помещали в блок управления. В состав блока управления входил блок соленоидов для управления клапанами модуля, штоки соленоидов, блок нагревателей, блок электромагнитных мешалок, компрессор и блок электронного управления.

Для подачи давления использовали мембранный либо плунжерный насос, способный создавать избыточное давление до 2 атм. В качестве электромагнитов, управляющих работой клапанов, использовали линейные соленоиды xEPM (“Saia Burgess”, Гонконг). Скорость регулировки потоков осуществ-

ляли регуляторами жидкостных потоков FR-DR150 с быстроразъемными соединениями либо FC-DR200...500 (встраиваемые) фирмы "Atoll" (США). В качестве нагревательных элементов применяли однокаскадные модули Пельтье (ЗАО "СКТБ "НОРД", Россия) размером 15 × 15 мм. Контроллер температуры представлял собой схему на основе датчика ТРК-02 (ООО "ТСФ", Россия).

Выделение и очистку нуклеиновых кислот проводили из культур грамположительных клеток *Bacillus thuringiensis* sp. Sotto TO 4001, грамотрицательных клеток *Escherichia coli* K12 и клеток *E. coli* K12, инфицированных бактериофагами MS2 или λ . Клетки (0.1–0.5 мл) помещали в приемную камеру сменного модуля, модуль устанавливали в блок управления, запускали программное обеспечение и проводили выделение нуклеиновых кислот в автоматическом режиме. Общее время выполнения процедуры составляло не более 40 мин.

В качестве метода сравнения использовали стандартную процедуру выделения и очистки ДНК, включающую лизис, экстракцию смесью фенол–хлороформ, переосаждение ДНК этанолом (центрифугирование при 18000 g). НК выделяли также по протоколам коммерческих производителей с использованием наборов "Genomic DNA Purification Kit" ("Fermentas", Литва), "ToTALLY RNA" ("Ambion", США) или "RNeasy Mini" ("Qiagen", Германия).

Эффективность выделения нуклеиновых кислот проверяли с помощью электрофоретического анализа в 1 или 2%-ном агарозном геле путем визуального сравнения интенсивности полос в дорожках, содержащих нуклеиновые кислоты, выделенные стандартным методом (в "ручном" режиме) и в автоматическом режиме с использованием сменного микрофлюидного модуля. Концентрацию выделенной ДНК измеряли по поглощению в УФ-диапазоне длин волн 220–320 нм с использованием спектрофотометра "Genesys 10 uv" ("Thermo Scientific", США).

Количественную оценку эффективности выделения НК проводили с использованием ПЦР с детекцией в режиме реального времени на приборе "iCycler iQ5" ("Bio-Rad", США) с праймерами, специфичными к геномам указанных выше бактерий и фагов. Реакционная смесь для проведения ПЦР (20 мкл) включала 5 ед. "HotTaq" ДНК-полимеразы ("Силекс", Россия), однократный ПЦР-буфер (70 мМ трис-HCl, pH 8.3, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2.5 мМ MgCl₂), 200 мкМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ), 2 мкл однократного раствора SYBR-Green I ("Invitrogen", США) и 100 нМ каждого праймера.

ПЦР на биочипах. Реакцию проводили, как было описано ранее [22]. Биочип (рис. 4а) содержал 8 иммобилизованных праймеров, позволяющих проводить идентификацию *E. coli*, *B. thuringiensis*, *Salmonella typhimurium*, фагов λ и MS2. Для определения микроорганизмов использовали праймеры, комплементарные последовательностям видоспецифич-

ного полиморфизма генов 16S рРНК. Дополнительно, для повышения специфичности процедуры были сконструированы праймеры, специфичные к последовательности гена 23S рРНК *E. coli* и *B. thuringiensis*, а также к гену фимбриальной субъединицы *fimA* *S. typhimurium*. Последовательности праймеров для идентификации фагов λ и MS2 были комплементарны последовательностям участков гена терминазы и белка оболочки CP, соответственно. Биочип включал также 6 ячеек геля, не содержащих иммобилизованных праймеров (отрицательный контроль "NC", рис. 4а), используемых для вычисления фонового флуоресцентного сигнала I_{ref} . По окончании амплификации сигнал в ячейке считали достоверным, если он превышал I_{ref} не менее, чем в 2.0 раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка унифицированной процедуры для выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов в автоматическом режиме. При разработке процедуры выделения и очистки НК принималось во внимание то, что она должна удовлетворять следующим требованиям:

- все стадии обработки образца и выделения НК должны проводиться в автоматическом режиме внутри микрофлюидного модуля;
- выделение ДНК и/или РНК должно производиться из биологических образцов различного типа, включая бактериальные клетки и вирусные частицы;
- выделение ДНК и РНК должно осуществляться с высоким выходом из образцов, содержащих 10⁴ и более клеток и/или вирусных частиц;
- микрофлюидные модули, содержащие реагенты для обработки образца, должны храниться в течение длительного времени (год и более).

Первой стадией обработки биологического образца является разрушение (лизис) клеточных стенок бактерий и оболочек вирусов с высвобождением НК. Для проведения ферментативного лизиса обычно используют такие ферменты, как лизоцим, субтилизин, протеиназа К. При химическом лизисе применяют солибилизирующие и дестабилизирующие агенты: поверхностно-активные вещества (ДДС, тритон X-100, N-лаурилсаркозинат натрия) и хаотропные агенты, например, гуанидинтиоцианат (гидрохлорид) или перхлорат натрия в концентрации 3–6 М [1–3].

Поскольку выделение ДНК и РНК должно производиться из биологических образцов, имеющих различное строение (бактериальные клетки и вирусные частицы), нами был выбран комбинированный двухстадийный ферментативный и химический лизис. Первая стадия лизиса заключалась в обработке образца лизоцимом в концентрации 50 мг/мл, который гидролизует компоненты бактериальных клеточных стенок (пептидогликаны). Вторую стадию лизиса проводили в растворе, содержащем протеиназу К, хаотропный агент и детергент. Протеиназа К

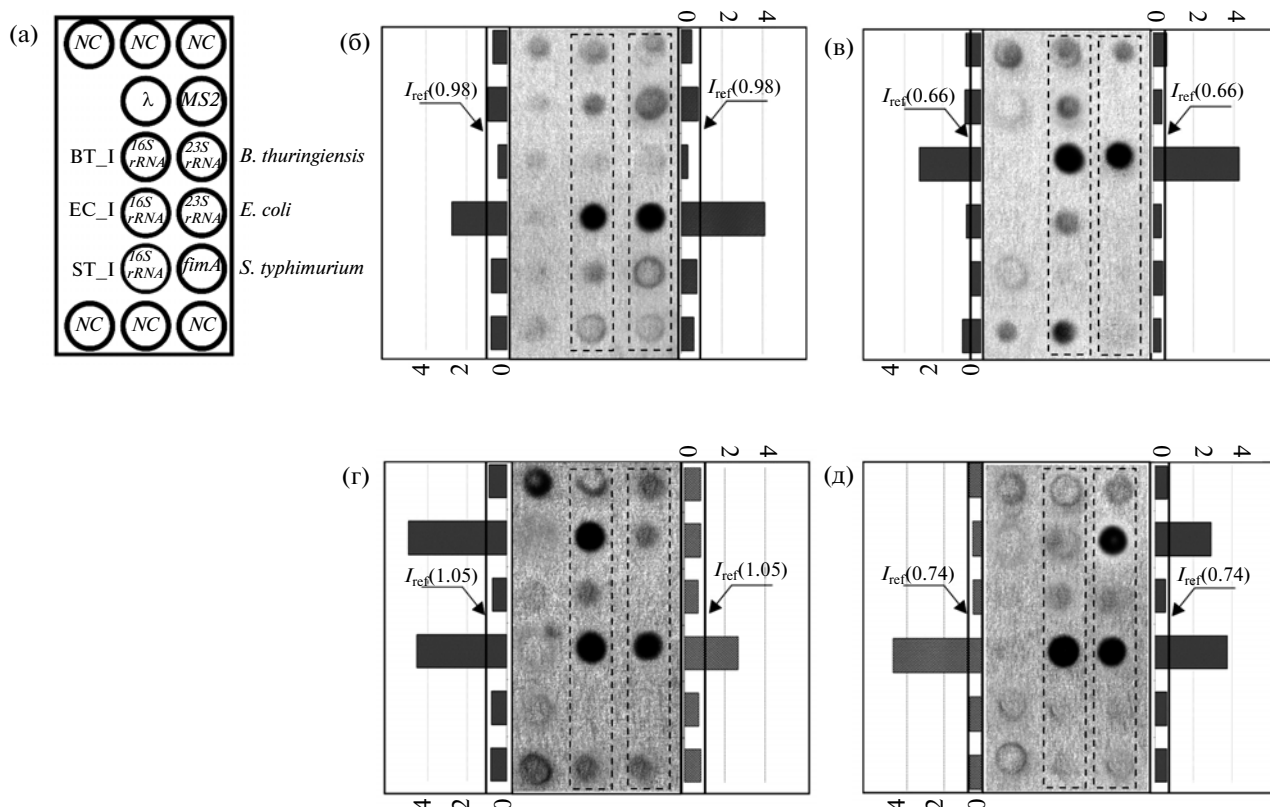


Рис. 4. Результаты проведения мультиплексной ПЦР на биочипе с использованием бактериальных и фаговых нуклеиновых кислот, выделенных в микрофлюидных модулях (а) и схема биочипа для проведения ПЦР (б–д). Флуоресцентные картины биочипов и гистограммы нормированных сигналов правого и левого столбцов ячеек (обведены пунктирной линией), содержащих иммобилизованные праймеры, после проведения ПЦР с НК из клеток *E. coli* (б); *B. thuringiensis* (в); *E. coli*, инфицированных фагом λ (г); *E. coli*, инфицированных фагом MS2 (д). Фоновое значение сигнала I_{ref} показано на гистограммах сплошной линией.

гидролизует белки, расщепляя пептидные связи, быстро инактивирует экзонуклеазы, а хаотропный агент способствует разрушению мембран и капсидных оболочек, в основном, за счет разрушения водородных связей и ослабления гидрофобных взаимодействий (солубилизации водонерастворимых молекул). Кроме того, присутствие хаотропного агента в высокой концентрации является необходимым условием сорбции НК на силикагелевых носителях на последующем этапе выделения и очистки.

Условия проведения двухстадийного лизиса были отработаны при проведении экспериментов с клетками *E. coli* и *B. thuringiensis*, а также с клетками *E. coli*, инфицированными бактериофагами MS2 или λ . Первую стадию лизиса проводили при 37°C – температуре, оптимальной для действия лизоцима, на второй стадии температуру повышали до 60°, чтобы избежать выпадения кристаллов гуанидингидрохлорида из раствора. Таким образом, быстрое и эффективное разрушение клеточных мембран и оболочек вирусов достигалось при проведении лизиса в следующих условиях:

– первая стадия – инкубация образца в 10 мМ трис-НСl буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА и 50 мг/мл лизоцима, pH 8.0, в течение 10 мин при 37°C и перемешивании;

– вторая стадия – инкубация образца в 10 мМ трис-НСl буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, 4.5 М гуанидингидрохлорида, 1 мг/мл протеиназы К, 0.5% N-лаурилсаркозината натрия, pH 6.5, в течение 10 мин при 60°C и перемешивании.

Для получения высокоочищенного препарата НК был выбран метод экстракции НК на твердофазном сорбенте. Твердофазная экстракция НК является предпочтительным методом, так как, помимо простоты и скорости выполнения, данная процедура легко адаптируется в формат микрофлюидной системы. Для проведения сорбции нами были испытаны стекловолоконистые фильтры серии GF и силикагель G-60 (данные не представлены). В экспериментах использовали лизаты бактериальных клеток и/или фаговых частиц, полученные после описанной выше процедуры двухстадийного лизиса.

Эффективная экстракция как ДНК, так и РНК на твердофазном носителе достигалась только в присутствии этанола в сорбционном буферном растворе. В отсутствие этанола происходила сорбция и последующая элюция только ДНК (но не РНК). Концентрация этанола 30 об. % оказалась оптимальной для эффективного выделения и очистки ДНК и РНК из лизата на данных носителях.

Из всех исследуемых сорбентов наиболее подходящим оказался силикагель G-60, позволяющий количественно сорбировать и десорбировать с микроколоники 10^3 и более геном-эквивалентов ДНК и РНК. Для удаления соединений, неспецифически связавшихся с сорбентом, колонку с силикагелем и сорбированными на нем НК последовательно промывали смесью буфера, содержащего 0.15 М трис-НСl, 0.05 М ЭДТА, 3 М гуанидингидрохлорид, рН 8.0, с этанолом (до 50%) и далее — 80%-ным этанолом. При такой промывке нерастворимые в этаноле нуклеиновые кислоты оставались связанными с сорбентом. Элюцию нуклеиновых кислот проводили низкосолевым буфером (ТЕ-буфер) или водой. Процедура селективной экстракции НК в колонке с силикагелем занимала не более 10 мин.

Таким образом, для выделения и очистки НК бактериальных клеток и/или фаговых (вирусных) частиц была разработана унифицированная процедура, включающая двухстадийный лизис с последующей твердофазной сорбцией—десорбцией НК на колонке, содержащей силикагель.

Хранение реагентов для выделения и очистки нуклеиновых кислот внутри микрофлюидного модуля. Общей проблемой для всех разработчиков микрофлюидных систем, в которых происходят химические и биохимические реакции и растворение реагентов и реакционных смесей, является хранение реагентов внутри устройств [23, 24]. Данная проблема была решена нами следующим образом. Необходимые для обработки образца растворы, которые помещают в резервуары модуля, содержат ферменты для проведения лизиса (лизоцим и протеиназа К), буферы для лизиса и промывки с высокой концентрацией хаотропного агента (гуанидингидрохлорид в концентрации 3 М и выше). Для того, чтобы избежать потери активности ферментов, готовые к работе модули с реагентами должны храниться при температуре не выше 10°C , однако при этих условиях происходит кристаллизация хаотропного агента. Чтобы исключить инактивацию ферментов и кристаллизацию солей нами предложено хранить реагенты для приготовления лизирующих буферов и промывочного буфера в виде лиофилизованных смесей. Таким образом, в одних резервуарах микрофлюидного модуля содержатся сухие реагенты, а в других — их растворители — водно-спиртовые смеси, которые также можно хранить в течение длительного времени. Растворение сухих смесей происходит в ходе процедуры выделения и очистки. Растворение лиофилизованных компонентов 1-го лизирующего буфера, содержащего лизоцим, происходит при введении жидкого биологического образца в соответствующий резервуар, а растворителем компонентов 2-го лизирующего буфера, содержащего гуанидингидрохлорид, протеиназу К и *N*-лаурилсаркозинат натрия, является реакционная смесь после прохождения первой стадии лизиса. Использование буферов в виде сухих реакционных смесей в составе микрофлюидного модуля позволяет осуществлять его хранение при температуре от $+4$ до $+8^{\circ}\text{C}$ в течение

не менее 6 мес без снижения активности какого-либо реакционного компонента.

Сменный микрофлюидный модуль для выделения и очистки нуклеиновых кислот из биологических образцов. Принципиальная схема и фотография модуля, который содержит резервуары со всеми необходимыми реагентами для лизиса клеток, микроорганизмов и вирусных частиц, очистки и элюции нуклеиновых кислот, микроканалы и клапаны, приведены на рис. 1.

Микрофлюидный модуль состоит из нескольких конструктивных элементов (рис. 2). Резервуары для хранения реакционных смесей и растворителей, обработки образца, микроколоники и каналы сформированы внутри основной рабочей платформы. Модуль закрывается верхней и нижней крышками (панелями) через эластичные прокладки. На верхней панели расположены 16 отверстий для штоков солевого насоса, отверстие для приемной камеры образца, семь отверстий для фиксирующих винтов (рис. 2). Линейные размеры модуля (длина \times ширина \times высота) составляли $94 \times 64 \times 40$ мм.

Перемещение реакционных смесей и реагентов в резервуарах модуля осуществлялось подачей давления в соответствующие резервуары с помощью компрессора по системе каналов и клапанов (клапаны а–к на рис. 1б), выполненных с использованием эластичных прокладок модуля. Необходимое избыточное давление составляло 1.5–2.0 атм. Открытие и закрытие клапанов, регулирующих перемещение реакционных смесей и реагентов в каналах и резервуарах модуля, подача давления в резервуары модуля, нагревание и перемешивание реакционных смесей происходило с помощью устройств, входящих в состав блока управления.

Модуль рассчитан на обработку 100–500 мкл биологического образца. Процедура выделения и очистки нуклеиновых кислот внутри микрофлюидного модуля состояла из следующих этапов:

Первая стадия лизиса. Биологический образец помещали в приемную камеру 1 с помощью пипетки или любого дозирующего устройства. При открытии клапана (остальные клапаны закрыты) образец поступал в резервуар 2, содержащий лиофилизованные компоненты 1 лизирующего буфера. В резервуаре 2 одновременно происходило растворение компонентов реакционной смеси 1-го лизирующего буфера и первая стадия лизиса, причем растворителем для сухой смеси буфера являлся сам жидкий биологический образец. Первая стадия лизиса проводилась при интенсивном перемешивании и нагревании до 37°C в течение 10 мин.

Вторая стадия лизиса. Через открытый клапан б (остальные клапаны закрыты) реакционная смесь после первой стадии лизиса поступала в резервуар 3, содержащий лиофилизованную смесь 2-го лизирующего буфера. Растворение сухой смеси 2-го лизирующего буфера и вторая стадия лизиса происходили одновременно, а растворителем для сухой смеси являлась реакционная смесь после первой стадии лизиса. Вторая стадия лизиса проводилась также

при интенсивном перемешивании и нагревании до 60°C в течение 10 мин.

Подготовка промывочного буфера. Одновременно с проведением второй стадии лизиса водно-спиртовая смесь из резервуара 6 поступала в резервуар 5, содержащий сухую реакционную смесь буфера для промывки твердофазного сорбента (клапан e открыт, клапан f закрыт). Растворение сухой смеси буфера проводилось при интенсивном перемешивании.

Создание оптимальных условий связывания нуклеиновых кислот с твердофазным сорбентом. В резервуар 3 с лизатом биологического образца после второй стадии лизиса добавляли этанол из резервуара 4 до концентрации 30 об. % (клапан c открыт, остальные клапаны закрыты).

Сорбция нуклеиновых кислот на твердофазном сорбенте. Реакционная смесь из резервуара 3 поступала на микроколону 8 с силикагелем G-60. Нуклеиновые кислоты сорбировались на силикагеле, а вещества, не связавшиеся с сорбентом, удалялись в резервуар для сбора отходов II (клапаны d и k открыты, остальные закрыты).

Отмывка твердофазного сорбента. На микроколону 8 подавался промывочный буфер из резервуара 5 и затем 80%-ный этанол из резервуара 7. Растворы после промывки поступали в резервуар для сбора отходов II (открывались клапаны f, k и клапаны g, k соответственно).

Элюция нуклеиновых кислот с микроколонки. Нуклеиновые кислоты элюировали с твердофазного сорбента пропуская раствор для элюции (вода или низкосолевого ТЕ-буфер) из резервуара 9 (клапаны i, j открыты, остальные закрыты). Очищенный препарат поступал в резервуар для сбора продукта 10. Выходной порт модуля совместим со стандартной микропробиркой объемом 0.2 мл, которую можно использовать для проведения ПЦР. Весь процесс выделения и очистки с момента введения образца занимал не более 40 мин.

Устройство для автоматизированного выделения и очистки нуклеиновых кислот. Устройство для выделения и очистки нуклеиновых кислот в автоматическом режиме включает микрофлюидный модуль и блок управления (рис. 3). Микрофлюидный модуль содержит только резервуары с реагентами и клапаны для коммутации газожидкостных потоков, в то время как все необходимые управляющие устройства, осуществляющие подачу давления, перемещение реакционных смесей и реагентов в резервуарах модуля, нагрев и перемешивание, размещены в блоке управления. Для перемешивания растворов в резервуарах модуля, где это необходимо, в основании резервуаров имеются ниши для магнитных мешалочков (стальные стержни в тефлоновой оболочке).

Готовый к работе модуль устанавливают в блок управления. Биологический образец помещают в приемную камеру модуля и далее все стадии лизиса клеток, микроорганизмов и вирусных частиц, очистки и элюции нуклеиновых кислот осуществляются последовательно в резервуарах модуля, изолированных от внешней среды. Процесс обработки

биологического образца с использованием данного устройства управляется компьютером с соответствующим программным обеспечением.

Ввод сменного микрофлюидного модуля в блок управления происходит вдоль верхних и нижних направляющих салазок (рис. 3), которые обеспечивают его точное позиционирование. Коммутация воздушных и жидкостных потоков в модуле осуществляется 16 клапанами с электрическим управлением. После помещения модуля в блок управления и срабатывания запорного механизма модуль занимает положение, при котором штоки всех 16 соленоидов оказываются точно над соответствующими запорными головками клапанов модуля.

В качестве компрессора используется мембранный насос, способный создавать необходимое избыточное давление воздуха (1.5–2.0 атм). Нагревание резервуаров модуля, в которых происходит лизис и растворение сухих реакционных смесей буферов, осуществляется элементами Пельтье, расположенными под гнездом установки сменного модуля в блоке управления; там же установлены магнитные устройства для перемешивания растворов и реакционных смесей. Для общего управления элементами Пельтье, клапанами, перемешивающими устройствами и др. разработан единый микропроцессорный блок.

Выделение и очистка нуклеиновых кислот в автоматическом режиме с использованием микрофлюидного модуля. Разработанное устройство на основе микрофлюидных модулей позволяет проводить в автоматическом режиме эффективное выделение как ДНК, так и РНК из бактерий и/или вирусных (фаговых) частиц (рис. 5). Количественную оценку автоматизированного выделения НК из разведений культур клеток в сравнении со стандартными методами проводили с использованием метода ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты амплификации фрагмента генома фага λ с ДНК фага в качестве матрицы, выделенной из различных разведений клеток *E. coli*, инфицированных фагом (10^8 – 10^2 в 1 мл исходного образца) представлены на рис. 6. Концентрации препаратов ДНК, выделенных автоматизированным и стандартным методом из культур, содержащих 10^4 – 10^8 КОЕ/мл, отличались не более чем на 20%.

Воспроизводимость разработанной процедуры оценивали посредством внесения 0.1 мл культуры клеток *E. coli* (10^8 КОЕ/мл) в приемную камеру модуля и проведением выделения НК в автоматическом режиме. Концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрически. Выделение проводили последовательно с использованием 20 модулей из одного образца ночной культуры *E. coli*. Как свидетельствуют результаты, приведенные в таблице, разница в выходе и концентрации ДНК при выделении в микрофлюидном модуле не превысила 15%.

Препараты бактериальных и фаговых НК, выделенные с использованием разработанного устройства, были использованы в качестве матриц в мульт-

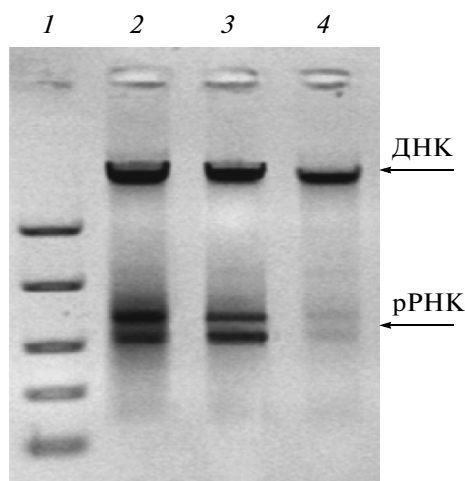


Рис. 5. Результаты выделения НК с использованием микрофлюидного модуля и стандартных методов выделения: 1 – молекулярный маркер “FastRuler Medium Range”; 2 – выделение НК из культуры *B. thuringiensis* ($\sim 10^8$ КОЕ/мл) с использованием микрофлюидного модуля; 3 – выделение НК из культуры *B. thuringiensis* ($\sim 10^8$ КОЕ/мл) стандартным методом лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией и переосаждением НК этанолом, 4 – выделение НК из культуры *B. thuringiensis* ($\sim 10^8$ КОЕ/мл) с помощью набора реагентов для выделения геномной ДНК “Genomic DNA Purification Kit”.

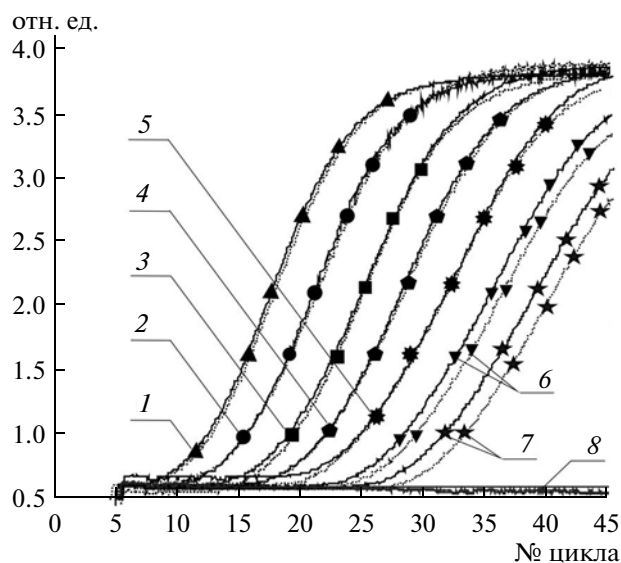


Рис. 6. Результаты проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени с ДНК фага λ в качестве матрицы, выделенной из различных разведений клеток *E. coli*, инфицированных фагом (10^8 – 10^2 в 1 мл исходного образца), с использованием стандартного метода выделения (сплошная линия) и микрофлюидных модулей (прерывистая точечная линия). Кривые получены при различных разведениях клеток: 1 – 10^8 , 2 – 10^7 , 3 – 10^6 , 4 – 10^5 , 5 – 10^4 , 6 – 10^3 , 7 – 10^2 кл./мл, 8 – отрицательный контроль реакции.

типлексной ПЦР на специализированном биочипе (рис. 4б–4д). Положительный сигнал амплификации в ячейке микрочипа, обусловленный формированием совершенных гибридных дуплексов между вновь образованным в результате амплификации продуктом, фланкированным свободным праймером из раствора, и дотроенным специфичным иммобилизованным праймером, регистрировали за счет флуоресценции красителя SYBR Green I, связывающегося с двуцепочечной ДНК. Интенсивность флуоресцентного сигнала в ячейках с иммобилизованными праймерами, неспецифичными к последовательности анализируемой ДНК, во всех проведенных экспериментах превышала среднее фоновое значение I_{ref} не более, чем на 20%. В то же время в ячейках, содержащих специфические и, следовательно, дотроенные праймеры, во всех экспериментах регистрировали достоверные, т.е. превышающие I_{ref} не менее, чем в 2.0 раза, сигналы, что позволило однозначно идентифицировать все анализируемые микроорганизмы и фаги.

Сконструированное устройство на основе микрофлюидного модуля позволяет проводить быстрое (до 40 мин) выделение нуклеиновых кислот из клеток микроорганизмов и/или вирусов в автоматическом режиме с низкими потерями. Процедура выделения и очистки осуществляется внутри картриджа, изолированного от внешней среды, что сводит к минимуму риск заражения персонала. Полученные препараты НК могут быть использованы в ампли-

фикации или гибридизации на биочипах для непосредственной идентификации инфекционного агента в исследуемом образце или для проведения дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

Объединение в микрофлюидном модуле методик автоматизированного выделения НК и амплификации на гидрогелевых биочипах с детекцией в режиме реального времени приведет к созданию диагностического комплекса в формате “лаборатория-на-чипе”, в котором в единой целостной процедуре реализованы все стадии обработки биологического образца и многопараметрического генетического анализа с целью идентификации, количественного определения, обнаружения лекарственной устойчи-

Результаты автоматизированного выделения ДНК *E. coli* (10^8 КОЕ/мл, исходный объем образца – 0.1 мл) в микрофлюидных модулях (всего – 20 модулей)

Параметр	Выход ДНК, мкг	Объем элюирующего буфера, мкл	Концентрация, нг/мкл	$D_{260/280}$
Максимальное значение	5.5	97	77	1.85
Минимальное значение	4.9	81	65	1.78
Среднее значение	5.2	86	69	1.82
Стандартное отклонение	0.4	5	4	0.01

ности, оценки вирулентности различных биологических объектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта с Министерством образования и науки РФ № 02.522.11.2019 и Программы Министерства энергетики США (IPP Grant Assistance Program), проект № RUS2-11036-МО-04.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Protocol Online: DNA Extraction & Purification: http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/DNA/DNA_Extraction_Purification/index.html.
2. Sambrook J., Russel D.W. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. V. 1. Ch. 1, 2, 6, 7.
3. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. // *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th Ed. Chichester: Wiley and Sons, 2002. 1512 p.
4. Tan S.C., Yiap B.C. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2009. 2009: 574398.
5. Wolfe K.A., Breadmore M.C., Ferrance J.P., Power M.E., Conroy J.F., Norris P.M., Landers J.P. // *Electrophoresis*. 2002. V. 23. P. 727–733.
6. Wu Q., Bienvenue J.M., Hassan B.J., Kwok Y.C., Giordano B.C., Norris P.M., Landers J.P., Ferrance J.P. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 5704–5710.
7. Bencina M., Podgornik A., Strancar A. // *J. Sep. Sci.* 2004. V. 27. P. 801–810.
8. Wen J., Legendre L.A., Bienvenue J.M., Landers J.P. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 6472–6479.
9. Berensmeier S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 73. P. 495–504.
10. Siddiqui H., Nederbragt A.J., Jakobsen K.S. // *Clin. Biochem.* 2009. V. 42. P. 1128–1135.
11. Gijis M.A., Lacharme F., Lehmann U. // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 1518–1563.
12. Huska D., Hubalek J., Adam V., Vajtr D., Horna A., Trnkova L., Havel L., Kizek R. // *Talanta*. 2009. V. 79. P. 402–411.
13. Whitesides G.M. // *Nature*. 2006. V. 442. P. 368–373.
14. Haeberle S., Zengerle R. // *Lab. Chip*. 2007. V. 7. P. 1094–1110.
15. Mark D., Haeberle S., Roth G., von Stetten F., Zengerle R. // *Chem. Soc. Rev.* 2010. V. 39. P. 1153–1182.
16. Madou M., Zoval J., Jia G., Kido H., Kim J., Kim N. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006. V. 8. P. 601–628.
17. Mahalanabis M., Do J., Al-Muayad H., Zhang J.Y., Klapperich C.M. // *Biomed. Microdevices*. 2010. V. 12. P. 353–359.
18. Lee J.G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.W., Ko C. // *Lab. Chip*. 2006. V. 6. P. 886–895.
19. Helb D., Jones M., Story E., Boehme C., Wallace E., Ho K., Kop J., Owens M.R., Rodgers R., Banada P., Safi H., Blakemore R., Lan N.T., Jones-Lopez E.C., Levi M., Burday M., Ayakaka I., Mugerwa R.D., McMillan B., Winn-Deen E., Christel L., Dailey P., Perkins M.D., Persing D.H., Alland D. // *J. Clin. Microbiol.* 2010. V. 48. P. 229–237.
20. Dundas N., Leos N.K., Mitui M., Revell P., Rogers B.B. // *J. Mol. Diagn.* 2008. V. 10. P. 311–316.
21. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. P. 92–106.
22. Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M. // *Biotechniques*. 2008. V. 44. P. 241–248.
23. Yobas L., Cheow L.F., Tang K.C., Yong S.E., Ong E.K., Wong L., Teo W.C., Ji H., Rafeah S., Yu C. // *Biomed. Microdevices*. 2009. V. 11. P. 1279–1288.
24. Hoffmann J., Mark D., Lutz S., Zengerle R., von Stetten F. // *Lab. Chip*. 2010. V. 10. P. 1480–1484.

Method for Automated Extraction and Purification of Nucleic Acids and Its Implementation in Microfluidic System

D. D. Mamaev, D. A. Khodakov, E. I. Dement'eva, I. V. Filatov, D. A. Yurasov,
A. I. Cherepanov, V. A. Vasiliskov, O. V. Smoldovskaya, D. V. Zimenkov,
D. A. Gryadunov, V. M. Mikhailovich, and A. S. Zasedatelev

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

e-mail: grad@biochip.ru

Received June 5, 2010

Abstract—A method and a microfluidic device for automated extraction and purification of nucleic acids from biological samples have been developed. The method involves disruption of bacterial cells and/or viral particles by combining enzymatic and chemical lysis procedures followed by solid-phase sorbent extraction and purification of nucleic acids. The procedure is carried out in an automated mode in a microfluidic module isolated from the outside environment, which minimizes contact of the researcher with potentially infectious samples and, consequently, decreases the risk of laboratory-acquired infections. The module includes reservoirs with lyophilized components for lysis and washing buffers; a microcolumn with a solid-phase sorbent; reservoirs containing water, ethanol, and water-ethanol buffer solutions for dissolving freeze-dried buffer components, rinsing the microcolumn, and eluting of nucleic acids; and microchannels and valves needed for directing fluids inside the module. The microfluidic module is placed into the control unit that delivers pressure, heats, mixes reagents, and flows solutions within the microfluidic module. The microfluidic system performs extraction and purification of nucleic acids with high efficiency in 40 min, and nucleic acids extracted can be directly used in PCR reaction and microarray assays.

УДК 543.42;543.94;543.545;57.08

МИКРОЧИПОВАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В МИКРОРЕАКТОРАХ РЕАКТИВАМИ

© 2011 г. Д. В. Наволоцкий*, **, А. В. Перчик*, И. А. Маркьянов**,
А. А. Ганеев*, **, М. Н. Сляднев*, **

*Группа компаний “Люмэкс”, Санкт-Петербург, Россия, 192029

**Научно-исследовательский институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Россия, 192029

e-mail: perec@lumex.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Разработана и оптимизирована микрочиповая аналитическая система, использующая кремниевый чип с иммобилизованными в микрореакторах тест-системами для мультиплексного анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Предложена методика иммобилизации ПЦР-компонентов тест-системы, выбран стабилизатор и проведена оптимизация состава реакционной смеси для достижения долговременной стабильности микрочипа. Проведена оптимизация подготовки проб с использованием магнитного сорбента и показано, что при содержании целевой ДНК в пробе 2.6×10^4 копий/мл для получения положительной идентификации требуется 60 мин, включая время, затраченное на пробоподготовку модельных проб. Продемонстрированы возможности созданной системы на примере анализа в микрочипе проб с различным содержанием ДНК, достигнуты низкие абсолютные пределы обнаружения (20 копий ДНК в микрореакторе) и высокая воспроизводимость анализа.

При разработке современных методов биоаналитической химии и медицинской диагностики постоянно ставятся задачи анализа новых объектов и определения новых соединений. Одновременно растут требования к производительности, чувствительности, селективности и быстрдействию аналитических систем. В настоящее время внимание исследователей обращено на разработку и применение микрочиповых технологий, которые позволяют создавать миниатюрные и портативные анализаторы, реализовать экспрессный и полностью автоматизированный анализ [1–3].

Существующие методы анализа нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) являются длительными из-за низких скоростей нагрева и охлаждения при термоциклировании, дорогостоящими из-за высокой стоимости реактивов и сложными из-за большого числа операций, которые нужно осуществлять при проведении анализа и пробоподготовки [4]. Микрочиповые системы анализа методом ПЦР лишены этих недостатков, т.к. позволяют достичь высоких скоростей термоциклирования, увеличить быстрдействие анализа и снизить потребление реактивов [1–3].

Практически важной задачей является снижение количества операций при проведении анализа и требований к условиям хранения реактивов. Одним из вариантов решения этих задач является иммобили-

зация компонентов реакции на поверхности микрореакторов. Иммобилизация праймеров позволяет унифицировать приготовление реакционной смеси, если требуется проводить анализ одной пробы на наличие нескольких генов. В работе [4] в микрореакторах чипа были иммобилизованы различные праймеры для ПЦР, стабилизированные полиэтиленгликолем. Использование технологии лиофилизации позволяет иммобилизовать в микрореакторе полимеразу, наиболее требовательный к условиям хранения реактив. Таким образом, становится возможным хранение и транспортировка микрочипов с лиофилизированным ферментом при комнатной температуре (18–25°C) [5]. Для стабилизации ДНК-полимеразы и смеси четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов применяют желатин, бычий сывороточный альбумин, сульфат аммония или неионные детергенты (Тритон X-100, Твин 20) [5, 6]. Для сохранения активности ДНК-полимеразы предпочтительными являются полиолы, т.к. они являются не только стабилизаторами, но и седиментирующими агентами [6].

Таким образом, создание микрочиповой аналитической системы с иммобилизованными олигонуклеотидами и ферментами позволит объединить такие значимые преимущества, как высокая скорость анализа, свойственная микрочиповым системам, а также надежность и простота работы, свойственная классическим методикам.

Цель работы – разработка микрочиповой аналитической системы для проведения мультиплексного анализа ДНК (проведение нескольких реакций в одном микрореакторе) методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием микрочипа, содержащего иммобилизованные в микрореакторах компоненты реакционной смеси.

МЕТОДИКА

Экспериментальные установки и топология микрочипа. Использовали микрочип, изготовленный из пластин кремния толщиной 600 мкм и содержащий 16 микрореакторов размером $2 \times 2 \times 0.4$ мм с объемом 2 мкл. Микрочип был изготовлен аналогично технологии, описанной в работах [7, 8], микрореакторы были изготовлены по технологии жидкостного анизотропного травления [9] с последующим нанесением слоя оксида кремния толщиной 150 ± 20 нм.

Экспериментальная установка, состоящая из системы термоциклирования на основе элемента Пельтье и системы флуоресцентного детектирования на основе ПЗС-матрицы, аналогична ранее описанной [8] с несколькими дополнениями. Для оценки температуры внутри микрореакторов использовали ARX-модель [10], которая позволяет повысить точность управления температурой в микрореакторах. Система флуоресцентного детектирования позволяет регистрировать красители в двух спектральных диапазонах: канал 1 – 5(6)-карбокси-флуоресцеин (FAM), канал 2 – 6-карбокси-2',4,4',5',7,7'-гексахлорфлуоресцеин (HEX).

Обработку результатов ПЦР-РВ проводили при помощи программного обеспечения, разработанного нами для управления установкой и проведения расчетов. Количественную оценку порогового цикла C_t из полученных кривых ПЦР-РВ проводили по алгоритму определения максимума второй производной [11, 12].

В экспериментальной установке для лиофилизации реагентов осуществляли замораживание реактивов с помощью двухстадийного элемента Пельтье (“Криотерм”, Россия) и их высушивание при пониженном давлении. Корпус установки был выполнен из стеклянной воронки, присоединенной к вакуумному насосу SD-40 (“Varian”, Франция), с помощью которого создавали пониженное давление в системе, контролируемое по показаниям вакуумметра (МЗМ, Россия). Температуру при лиофилизации измеряли при помощи универсального измерителя TP530 (ООО “Измерительные технологии СПб”, Россия) с платиновым термодатчиком, закрепленным на элементе Пельтье.

Альтернативным лиофилизации методом иммобилизации реактивов является высушивание при нормальных климатических условиях в эксикаторе, заполненном безводным хлоридом кальция.

Смесь реактивов для иммобилизации объемом 2 мкл вводилась в микрореакторы микрочипа, который, в зависимости от вида высушивания, помещался либо в экспериментальную установку для лиофильной сушки, либо в эксикатор.

Реактивы. Для оптимизации состава иммобилизуемых реактивов использовали тест-систему 35S (ЗАО “Синтол”, Россия), в которой контрольным образцом являлась плазида pUC-18 со вставкой целевого фрагмента длиной 130 пар нуклеотидов. Приготовление реакционной смеси производили в ламинарном ПЦР-боксе (ЗАО “Ламинарные системы”, Россия) по протоколу, рекомендуемому производителем. Общий объем приготавливаемой реакционной смеси составлял 50 мкл и содержал: 28 мкл деионизованной воды, 5 мкл $10 \times$ ПЦР-буфера Б, 5 мкл $MgCl_2$ (25 мМ), 5 мкл дНТФ (2.5 мМ), 2 мкл смеси двух праймеров 35S (6.5 пкмоль/мкл каждого), 1 мкл зонда 35S (5 пкмоль/мкл), 1 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл), 3 мкл образца ДНК. Объем реакционной смеси, вносимый в каждый микрореактор, составлял 2 мкл.

При проведении оптимизации состава иммобилизованных реактивов использовали режим амплификации, рекомендуемый производителем тест-системы: прогрев 300 с при $95^\circ C$, а затем 45 циклов: $95^\circ C - 15$ с, $61^\circ C - 30$ с.

В качестве мультиплексной ПЦР тест-системы при анализе реальных объектов был использован набор реактивов “Фланк-ген” (НПФ “ДНК-Технология”, Россия) в составе и объемах, рекомендованных производителем, с измененным режимом амплификации: прогрев 90 с при $94^\circ C$, а затем 45 циклов: $94^\circ C - 1$ с, $64^\circ C - 15$ с.

Для лиофилизации реактивов в микрочипе в качестве стабилизатора использовались: глюкоза, сорбит, сахароза, маннит, гидроксиэтилцеллюлоза (“Fluka Bio Chemika”, Швейцария) и инулин (“Sigma”, США). Исходный раствор стабилизатора с концентрацией 172.4 мМ готовили растворением навески полиола в дистиллированной воде. Растворы хранили при $+4^\circ C$. Для проведения экспериментов использовали растворы с концентрацией 25, 35, 50, 75, 100 мМ, которые готовили разбавлением исходного раствора дистиллированной водой.

Лиофилизация реактивов проводилась в экспериментальной установке при $35^\circ C$ и давлении 1.33×10^{-2} Па. При лиофилизации использовали реактивы тест-системы 35S, с добавлением раствора стабилизатора. Далее микрочип помещали в экспериментальную установку и инкубировали 1.5 ч. Для проведения ПЦР в каждый микрореактор с иммобилизованными реактивами добавляли по 2 мкл образца ДНК.

Выделение и очистку ДНК из зерен кукурузы проводили на основе набора реагентов для выделения ДНК “Magnetic DNA Prep 100” (“Компания Биоком”, Россия). В состав лизирующего раствора

было добавлено 5 мл 10%-ного раствора поливинилпирролидона ("Acros organic", США). Кроме того, в качестве дополнительного отмывочного раствора был введен ацетон ("НеваРеактив", Россия), а раствор ЭкстраГен™Е был заменен на элюирующий раствор (TE-буфер), содержащий 1 мМ трис-HCl и 0.1 мМ динатриевой соли ЭДТА ("Компания Хеликон", Россия), pH 8.0.

Методика выделения ДНК была оптимизирована по времени проведения отдельных стадий и скорректирована для расширения круга анализируемых объектов. Навеску пробы (размолотые кукурузные зерна) массой 25 мг вносили в лизирующий раствор и выдерживали при 80°C 5 мин. После нагрева пробу центрифугировали при 2500 g 30 с и супернатант добавляли в суспензию сорбента. Проводили сорбцию ДНК на магнитном сорбенте, супернатант удаляли и сорбент дважды промывали 1 мл раствора солевого буфера, а затем ацетоном. После удаления супернатанта осадок высушивали при комнатной температуре в течение 3 мин. Затем к высушенному осадку добавляли 50 мкл элюирующего раствора, инкубировали 10 мин при 80°C, периодически встряхивая. Далее супернатант переносили в микропробирку для последующего анализа методом ПЦР.

Для высушивания пробы в микрореакторах микрочипа 2 мкл пробы помещали в каждый микрореактор. Далее микрочип выдерживали при 80°C 3 мин до полного испарения жидкости в микрореакторах. При проведении ПЦР в каждый микрореактор с высушенной пробой добавляли реакционную смесь ПЦР-РВ однократной концентрации в объеме 2 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация состава реактивов для иммобилизованной тест-системы. При выборе оптимального стабилизатора на первом этапе критерием оценки являлся внешний вид иммобилизованной в микрореакторе смеси с содержанием различных стабилизаторов концентрацией 35 мМ. Высушенная смесь должна надежно удерживаться в микрореакторе и не должна образовывать кристаллический осадок. По окончании лиофилизации смесь, содержащая гидроксипропилцеллюлозу, образовывала белую рыхлую массу; содержащая инулин — плотную кристаллическую; а содержащая сахарозу — кристаллическую пористую. Смеси с остальными стабилизаторами образовывали прозрачные стекловидные массы. Внешний вид реактивов, высушенных на воздухе, был аналогичен лиофилизированным.

Сохранение свойств иммобилизованных реактивов определялось на основе сопоставления величин пороговых циклов (C_t), полученных при проведении ПЦР с растворами этих реактивов. Результаты ПЦР-анализа раствора, содержащего 10^6 копий ДНК/мкл, для иммобилизованных тест-систем с рядом полиолов воспроизводимы (при лиофильной

сушке: маннитол — 23.9 ± 0.6 ; трегалоза — 23.4 ± 0.5 ; сорбитол — 22.8 ± 0.9 ; глюкоза — 23.8 ± 0.1 ; при сушке на воздухе: маннитол — 24.8 ± 0.2 ; трегалоза — 24.0 ± 0.4 ; сорбитол — 24.9 ± 0.8 ; глюкоза — 24.0 ± 0.5) и согласуются с C_t растворов без стабилизаторов 23.8 ± 0.4 . Отметим, что значения пороговых циклов для ПЦР-кривых от лиофильно высушенных реактивов (23.7 ± 0.3) были меньше, чем для высушенных на воздухе (24.4 ± 0.2).

В дальнейших экспериментах использовали смеси, в состав которых входили сорбит, глюкоза, маннит и трегалоза, т.к. для них была получена наибольшая эффективность ПЦР, и, кроме того, при высушивании они образовывали стекловидную массу, которая прочно удерживалась на поверхности микрореактора.

При хранении микрочипов с иммобилизованными реактивами, содержащими все компоненты реакционной смеси, при 25°C наблюдалась полная потеря реакционной способности для всех использованных стабилизаторов уже через 21 сут, что может быть связано с деградацией ДНК-полимеразы. Присутствующие в высушиваемой смеси ионы Mg^{2+} и компоненты буфера могли приводить к протеканию неспецифических реакций в процессе высушивания или хранения [5, 6].

Для оптимизации состава иммобилизуемых реактивов проводили ряд экспериментов с использованием для иммобилизации смеси, из состава которых убрали а) хлорид магния, б) ДНК-полимеразу, в) буферный раствор и хлорид магния. Недостающие компоненты затем добавлялись вместе с раствором пробы. Потеря реакционной активности наблюдалась во всех иммобилизуемых смесях, в состав которых входили и буферный раствор и полимеразы. Иммобилизованные смеси, не содержащие в своем составе полимеразу, во время хранения при комнатной температуре сохраняли свои свойства в течение 36 сут при использовании в качестве стабилизатора глюкозы и трегалозы. Смеси, не содержащие в своем составе ионов магния и буферного раствора, сохраняли реакционную способность в течение 36 сут при использовании в качестве стабилизатора сорбита, трегалозы и маннита. При этом наблюдалось снижение реакционной способности иммобилизованных компонентов смеси, содержащих в качестве стабилизатора глюкозу.

Таким образом, в результате экспериментов был определен состав иммобилизованных реактивов и выбраны стабилизаторы. Иммобилизация праймеров привела к унификации приготовления растворов при определении нескольких генов, что позволило значительно снизить вероятность ошибки оператора, а иммобилизация полимеразы позволила избежать особых условий хранения.

Оценка длительности хранения иммобилизованных реактивов. Оценка длительности хранения микрочипа с иммобилизованными реактивами прово-

Таблица 1. Величины пороговых циклов (Ct) в зависимости от времени хранения микрочипа с иммобилизованными реактивами и вида стабилизатора*

Стабилизатор, 100 мМ	Вид сушки	Пороговые циклы при времени хранения, ч			
		0	24	88	170
Глюкоза	воздушная	23.9	—	—	—
	лиофильная	23.9	—	—	—
Маннит	воздушная	23.2	24.0	28.1	28.5
	лиофильная	23.8	23.7	23.8	24.3
Сорбит	воздушная	24.1	24.0	24.2	23.6
	лиофильная	23.8	23.4	23.6	23.8
Трегалоза	воздушная	23.7	24.4	24.1	23.8
	лиофильная	23.4	23.9	25.0	23.6

* Знак “—” указывает на полную потерю реакционной активности иммобилизованных реактивов.

Таблица 2. Величины пороговых циклов (Ct) и коэффициента b в зависимости от концентрации стабилизатора*

Стабилизатор	Концентрация стабилизатора, мМ	Высушено лиофильно		Высушено на воздухе	
		Ct , ед.	b	Ct , ед.	b
Сорбит	25	24.7	7.05	—	—
	50	24.5	8.06	30.9	7.76
	75	24.8	8.17	29.8	7.51
	100	24.2	9.68	26.0	9.93
Трегалоза	25	24.2	8.74	24.7	7.54
	50	23.8	9.37	24.3	8.07
	75	24.1	9.89	24.5	7.61
	100	24.2	10.04	24.8	9.75

* Знак “—” указывает на потерю реакционной активности иммобилизованных реактивов.

дидась на основе данных по искусственному старению. Микрочип с иммобилизованными в микрореакторах реактивами выдерживали при 50°C в течение 24, 88 и 170 ч, что соответствует 4 мес хранения при 20°C [13].

Полученные данные представлены в табл. 1. Компоненты иммобилизованной смеси, где в качестве стабилизатора выступала глюкоза, теряли реакционную активность уже после 24 ч. Иммобилизованные смеси, содержащие маннит, сохраняли реакционную активность только при их лиофилизации, тогда как при высушивании на воздухе наблюдалась потеря активности после 88 ч. Наилучшими показателями обладали смеси, содержащие в качестве стабилизатора сорбит и трегалозу.

Оптимизация концентрации стабилизаторов. Для оптимизации концентрации стабилизатора в экспериментах использовали растворы полиолов с концентрацией 25, 50, 75, 100 мМ. Перед проведением ПЦР-РВ все микрочипы с иммобилизованными реактивами выдерживали при 50°C в течение 170 ч.

Полученные данные представлены в табл. 2. При использовании в качестве стабилизатора сорбита наблюдалось увеличение значений Ct по сравнению с жидкой реакционной смесью без стабилизатора. Значения Ct иммобилизованных смесей, содержащих трегалозу, при исследуемых концентрациях сравнимы с жидкой реакционной смесью без стабилизатора, при этом наибольшая эффективность ПЦР наблюдалась при концентрации трегалозы 50–100 мМ.

Все реактивы, высушенные на воздухе, достигали порогового цикла несколько позже, чем лиофилизированные смеси, что согласуется с данными, полученными в предыдущих экспериментах. Угол наклона ПЦР-кривых в экспоненциальной фазе реакции (значения b , табл. 2), полученных при анализе высушенных на воздухе реактивов, меньше по сравнению с лиофилизированными. Угол наклона ПЦР-кривых был оценен методом наименьших квадратов при приближении четырехпараметрической логистической функцией [12]. Увеличение угла наклона

свидетельствовало о большей эффективности амплификации [14].

Отметим, что лиофилизация требует использования специализированного оборудования, что снижает технологичность изготовления микрочипов с иммобилизованными реактивами, в то время как высушивание на воздухе позволяет упростить процесс производства микрочипов.

Для оценки аналитических характеристик микрочипа с иммобилизованными реактивами использовали высушенный на воздухе микрочип с оптимизированной тест-системой, содержащей все компоненты реакционной смеси, кроме ионов магния, и буферного раствора с концентрацией стабилизатора трегалозы 100 мМ. На рис. 1 представлена градуировочная зависимость, полученная при использовании изготовленного таким образом микрочипа.

Полученное значение эффективности реакции E составило 92%, что обеспечивает низкую относительную погрешность при определении ДНК, которая не превышала 12% по серии измерений проб с концентрацией ДНК в диапазоне 4×10^2 – 4×10^5 копий/мкл.

Оптимизация методики пробоподготовки. Существует ряд методик выделения и очистки нуклеиновых кислот из различных образцов [11, 15–17]. Однако большинство существующих методов требует длительных стадий центрифугирования и громоздкой аппаратуры. Нами был выбран метод магнитной сепарации сорбента, основанный на использовании в качестве сорбента магнитных частиц, содержащих наночастицы оксида железа и обладающих суперпарамагнитными свойствами [18]. Метод привлекателен простотой исполнения и технологичностью, по сравнению с центрифугированием магнитная сепарация быстра и легка в применении, не требует сложного и дорогостоящего оборудования, а также, может быть эффективно автоматизирована [19].

В методику пробоподготовки, рекомендованную производителем, были внесены некоторые изменения. Из-за высокого отношения объема вводимой пробы к общему объему реакционной смеси возрастают требования к чистоте выделяемой ДНК. Для устранения влияния гуминовых кислот, содержащихся в почве и зерне, потребовалось добавление 5 мг поливинилпирролидона [20, 21]. Более качественное выделение и очистка ДНК позволяют расширить область применения данной методики для выделения ДНК микроорганизмов из объектов окружающей среды [22, 23]. Введение ацетона позволило сохранить дисперсность сорбента после стадий отмывок и тем самым увеличить эффективность элюции ДНК.

Эффективность выделения ДНК была оценена путем сравнения значений C_t раствора положительного контроля, соответствующего концентрации 10 копий ДНК/мкл, и такого же раствора, прошедшего пробоподготовку. Так как при пробоподготов-

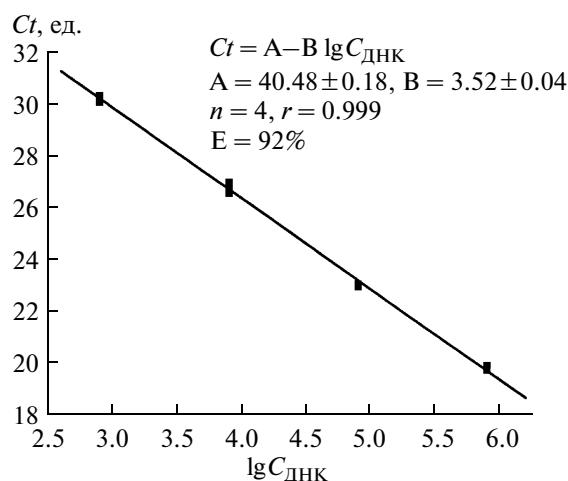


Рис. 1. Градуировочная зависимость, полученная при проведении ПЦР в микрочипе с высушенной оптимизированной тест-системой.

ке происходит 20-кратное уменьшение объема раствора пробы, то при 100%-ной эффективности выделения ДНК это привело бы к различию пороговых циклов ПЦР-кривых от этих проб на 4.3 цикла. Однако на практике разница значений составила 3.5 цикла, что говорит о достижении не менее 56% выделения ДНК. Подобная полнота выделения для низких содержаний ДНК может быть оценена как достаточная для большинства практических приложений при анализе генетически модифицированных организмов (ГМО) [24].

Предложенная методика пробоподготовки позволила провести выделение ДНК и очистку нескольких проб от примесей за 40 мин, что сопоставимо с временем проведения ПЦР-РВ в микрочиповой аналитической системе и не лимитирует постановку анализа в лаборатории в течение дня. При использовании ускоренного режима амплификации в микрочиповой аналитической системе на проведение 45 циклов затрачивается 20 мин. Таким образом, общее время, затраченное на пробоподготовку и ПЦР-анализ полученных проб при использовании иммобилизованных в микрореакторах реактивов, не превышало 60 мин, что хорошо коррелирует со временем анализа для подобных микрочиповых систем с объемом микрореактора 2–4 мкл [25, 26], и значительно быстрее, чем при использовании коммерческих ПЦР-анализаторов.

В связи с непрактичностью приготовления реакционных смесей объемом 2 мкл нами предложено два варианта проведения анализа. При использовании микрочипов с иммобилизованными реактивами в анализируемую пробу добавляли недостающие компоненты, буферный раствор и раствор хлорида магния. Далее эта проба вводилась в микрореактор. Если необходимо проводить определение в пробе содержания нескольких генов, то проба вводится в

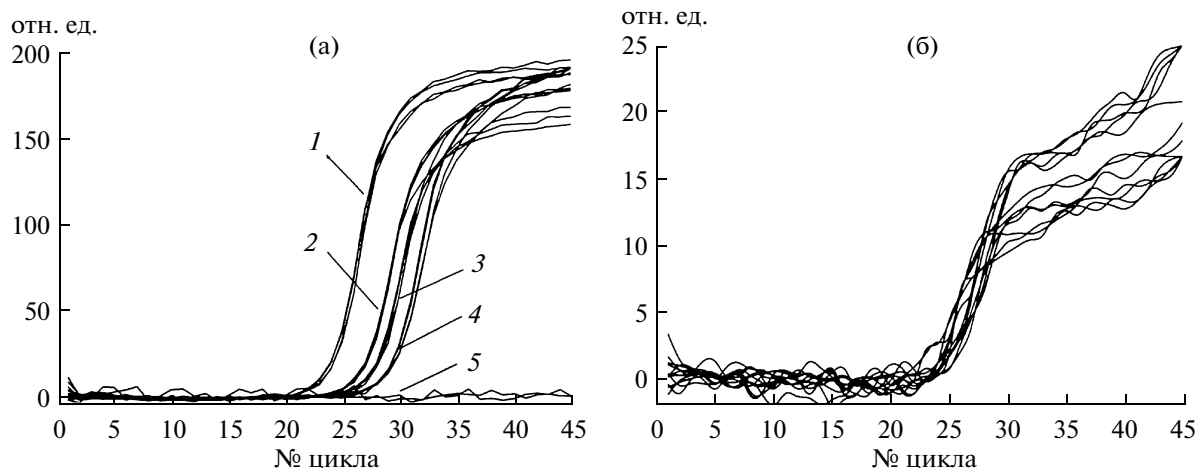


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции (отн. ед.) номера цикла в каналах FAM (а), HEX (б). ПЦР-анализ растворов после пробоподготовки с положительным контрольным образцом тест-системы “Фланк-ген” с концентрацией: 1 – 10^6 ; 2 – 1.6×10^5 ; 3 – 6.4×10^4 ; 4 – 2.6×10^4 копий ДНК в 1 мл; 5 – отрицательный контроль.

несколько микрореакторов, в которых иммобилизованы соответствующие праймеры. Если же число анализируемых проб больше, чем число интересующих генов, то нами рекомендуется использовать микрочипы без иммобилизованных реактивов. В этом случае анализируемые пробы после пробоподготовки высушивают в микрореакторе при 80°C , а затем в микрореактор добавляют все компоненты реакционной смеси. Таким образом, при анализе можно использовать заранее приготовленные реакционные смеси на интересующий ген и расходовать их по мере необходимости.

Для оценки аналитических характеристик оптимизированной методики пробоподготовки и микрочиповой аналитической системы ПЦР-РВ готовили серию последовательных разбавлений до получения

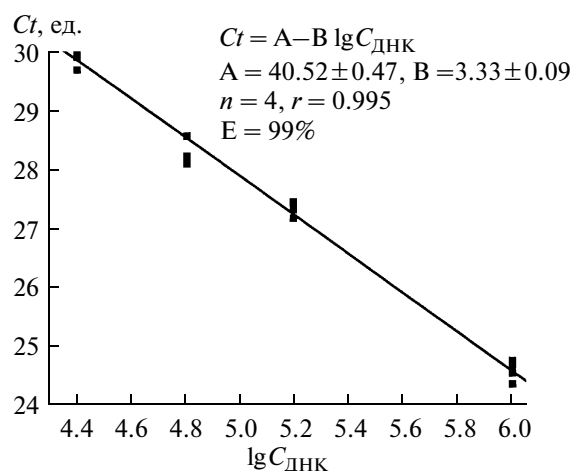


Рис. 3. Градуировочная зависимость, полученная при проведении ПЦР в микрочипе после пробоподготовки с серией последовательных разбавлений.

растворов с концентрациями 1×10^6 , 1.6×10^5 , 6.4×10^4 , 2.6×10^4 копий ДНК/мл, которые проходили пробоподготовку и ПЦР-анализ. Концентрацию растворов выбирали, исходя из того, что в 25 мг кукурузных зерен содержится 2.755 мкг ДНК [24], что соответствует 10^6 копий геномной ДНК [27]. При условии наличия в зернах 0.9% компонентов ГМО (предел содержания ГМО, выше которого необходима маркировка товаров) содержание ДНК в микрореакторах микрочипа будет составлять 180 копий ДНК, что достаточно для проведения ПЦР.

Полученные результаты приведены на рис. 2. На канале регистрации FAM наблюдался рост интенсивности флуоресценции красителя, соответствующего специфичному зонду для всех кривых, кроме отрицательного контрольного образца. На канале регистрации HEX наблюдался рост флуоресценции красителя зонда внутреннего контрольного образца, что свидетельствует об отсутствии ингибирования ПЦР в данных пробах и позволяет интерпретировать отрицательный результат на канале FAM как достоверный.

На рис. 3 представлена градуировочная зависимость, полученная при проведении ПЦР-РВ анализа проб с различной концентрацией ДНК. Эффективность ПЦР близка к теоретическому пределу ($E = 99\%$), что свидетельствовало об отсутствии ингибирования в растворе пробы после проведения пробоподготовки, о высокой точности поддержания температуры в микрореакторах чипа системой термодетектирования, о качестве модификации поверхности микрореакторов и стабильности системы детектирования [28]. По оценке из градуировочной зависимости диапазон определяемых концентраций ДНК, содержащей искомый фрагмент гена ГМО, составил 3 порядка, а минимальное содержание ДНК в исходной пробе, приводящее к положитель-

ному детектированию, составило 10^3 копий ДНК в 1 мл, что соответствует 20 копиям ДНК в микрореакторе. Отметим, что высокая чувствительность и эффективность ПЦР получены при проведении мультиплексной ПЦР-РВ в условиях быстрого режима термоциклирования, т.е. при сокращении времени удержания на заданной температуре, что является демонстрацией преимуществ микрочиповой системы перед традиционным оборудованием.

В настоящей работе оптимизирована реакционная смесь для иммобилизации в микрореакторы микрочипа. Оптимальным составом обладает смесь, содержащая дНТФ, праймеры и ДНК-полимеразу в растворе стабилизатора. В результате было найдено, что для долговременного хранения при комнатной температуре можно использовать сорбит в концентрации 100 мМ при лиофилизации смеси или трегалозу в концентрации 25–100 мМ при лиофильной сушке и трегалозу в концентрации 100 мМ при сушке на воздухе.

Отметим, что сушка на воздухе экономически более выгодна и привлекательна для широкомасштабного производства микрочипов, т.к. не требует громоздкого оборудования для лиофилизации и больших энергетических затрат при высушивании. При анализе созданных иммобилизованных реактивов получена высокая эффективность ПЦР ($E = 92\%$).

Полученные аналитические характеристики метода при использовании иммобилизованных в микрореакторах тест-систем сравнимы с таковыми при использовании жидких реактивов ($E = 99\%$), что позволяет применять иммобилизованную тест-систему вместе с предлагаемой модификацией методики пробоподготовки и достичь высокой аналитической чувствительности обнаружения ДНК в исходных пробах. Кроме того, проведенная оптимизация методики пробоподготовки и высокое быстроедействие микрочиповой аналитической системы позволили сократить время полного ПЦР-анализа до 60 мин, что в среднем на 70 мин быстрее, чем для стандартного оборудования и методик. При использовании иммобилизованных в микрореакторах тест-систем достигнуто существенное (в 16 раз) сокращение расхода реактивов и снижение количества операций при приготовлении растворов.

Таким образом, разработанная микрочиповая аналитическая система мультиплексного ПЦР-анализа с иммобилизованными реактивами позволяет значительно сократить трудозатраты оператора и стоимость расходных материалов, а также увеличить скорость за счет использования микрочипа и надежность анализа за счет одновременного определения в каждом микрореакторе искомого участка ДНК и внутреннего контрольного образца (ВКО). Дальнейшие работы по развитию созданной микрочиповой системы должны быть сфокусированы на разработке микрочипов, содержащих иммобилизованные реактивы для нескольких целевых генов,

содержащихся в ГМО, и на их приложении к качественному и количественному анализу реальных образцов с высоким быстродействием и производительностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weigl B.H., Bardell R.L., Cabrera C.R. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2003. V. 55. P. 349–377.
2. Dittrich P.S., Tachikawa K., Manz A. // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 3887.
3. Zhang C., Xing D. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 4223–4237.
4. Morrison T., Hurley J., Garcia J., Yoder K., Katz A., Roberts D., Cho J., Kanigan T., Ilyin S.E., Horowitz D., Dixon J.M., Brennan C.J.H. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. № 18. P. 123.
5. Патент РФ. 2004. № 2259401 С1.
6. Патент США. 2000. № 6,153,412.
7. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Казаков В.А., Ганеев А.А. // *Журнал аналитической химии.* 2008. Т. 63. № 2. С. 210–217.
8. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Ганеев А.А. // *Научное приборостроение.* 2007. Т. 17. № 3. С. 16–24.
9. Paul C.H.L. *Microfluidic Lab-on-a-Chip for Chemical and Biological Analysis and Discovery.* Chromatographic Science Series. V. 94. Boca Raton: CRC Press, 2006. 504 p.
10. Ljung L., Glad T. *Modeling of Dynamic Systems.* N.-Y.: PTR Prentice Hall, 1994. 361 p.
11. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР “в реальном времени”. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 215 с.
12. Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Michael W. Pfaffl // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. № 20. P. 122.
13. Seydack M. // *Springer Ser. Fluoresc.* 2008. V. 6. P. 401–428.
14. Tichopad A., Dzidic A., Pfaffl M. // *Biotechnol. Lett.* 2002. V. 24. P. 2053–2056.
15. McPherson M.J., Mooler S.G. *PCR.* Oxford: BIOS Scientific Publ. 2000. p. 276.
16. Sachse K., Frey J. // *Methods in Mol. Biol.* V. 216. Totowa, N.-Y.: Humana Press Inc, 2002. 324 p.
17. Pelt-Verkuil E., Belkum A., Hays J.P. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification.* Netherlands: Springer Sci., 2008. 323 p.
18. Olsvik O., Popovic T., Skjerve E., Cudjoe K.S., Homes E., Ugelstad J., Uhlen M. // *Clinical Microbiol. Rev.* 1994. V. 7. № 1. P. 43–54.
19. Berensmeier S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 73. P. 495–504
20. Gray J.P., Herwig R.P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. № 11. P. 4049–4059.
21. LeBreton M., Morton P., Larade K., Harland B., Clair T., Campbell D. // *Hydrobiologia.* 2000. V. 438. № 1. P. 91–97.
22. Kuske C.R., Banton K.L., Adorada D.L., Stark P.C., Hill K.K., Jackson P.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. № 7. P. 2463–2472.

23. Saikaly P.E., Barlaz M.A., Francis L. de los Reyes III // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. № 20. P. 6557–6565.
24. Trapmann S., Catalani P., Conneely P., Contreras M., Corbisier P., Ganschberg D., Gloria S., Linsinger T., Zeleny R., Schimmel K. The Certification of Reference Materials of Dry-Mixed Maize Powder with different Mass Fractions of Bt-176 Maize. Luxembourg: Official Publ. Eur. Comm., 2004. 13 p.
25. Consolandi C., Severgnini M., Frosini A., Caramenti G., De Fazio M., Ferrara F., Zocco A., Fischetti A., Palmieri M., De Bellis G. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 353. № 2. P. 191–197.
26. Lee J.G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.W., Ko C. // *Lab Chip.* 2006. V. 6. P. 886–895.
27. Arumuganathan K., Earle E.D. // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1991. V. 9. P. 208–218.
28. Сляднев М.Н., Лаврова М.В., Еркин М.А., Наволоцкий Д.В., Крисько А.В., Ганеев А.А. // *Научное приборостроение.* 2007. Т. 17. № 3. С. 25–30.

Microarray Analytic System for Multiplex Analysis by Real-time Polymerase Chain Reaction with Reagents Immobilized in Microreactors

D. V. Navolotskii^{a, b}, A. V. Perchik^a, I. A. Mark'yanov^b, A. A. Ganeev^{a, b}, and M. N. Slyadnev^{a, b}

^a Lumex Group of Companies, St. Petersburg, Russia 192029

^b St. Petersburg State University Institute of Chemistry, St. Petersburg, Russia, 192029

e-mail: perez@lumex.ru

Received May 12, 2010

Abstract—A microarray analytic system that uses a silicon chip with immobilized in microreactor test-system for multiplex analysis of DNA by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed and optimized. We suggested the method of immobilization of PCR-components of a test-system, chose the stabilizer, and conducted the optimization of the composition of reaction mixture to achieve permanent stability of a microarray. We conducted optimization of preparation of samples using magnetic sorbent and indicated that, with 2.6×10^4 copies/ml, 60 min are necessary to obtain positive identification including time for preparation of model probes. The abilities of the the created system were demonstrated on the example of microarray analysis of samples with different content of DNA, low absolute limits of identification (20 DNA copies in microreactor), and high reproducibility of the analysis.

Сдано в набор 26.10.2010 г.	Подписано к печати 11.01.2011 г.	Формат бумаги 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 16.0	Уч.-изд. л. 16.0
	Тираж 137 экз.	Зак. 1130

Учредители: Российская академия наук,
Институт биохимии им. А.Н. Бахи РАН

Издатель: Российская академия наук. Издатель "Наука", 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
Оригинал-макет подготовлен МАИК "Наука/Интерпериодика"
Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099 Москва, Шубинский пер., 6