

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	РАНЕВАЯ РЕПАРАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ (ОБЗОР) Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л.	253-258	0
<input type="checkbox"/>	ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ГРУПП β - ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА (PISUM SATIVUM L.) Ершова А.Н., Баркалова О.Н.	259-264	3
<input type="checkbox"/>	ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА И ТРИПСИНА ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ Ревина Т.А., Парфёнов И.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Валуева Т.А.	265-271	5
<input type="checkbox"/>	ОЧИСТКА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ BACILLUS SUBTILIS СКБ 256 БИОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ Раджабов У.Р., Давранов К.Д., Рахимов М.М.	272-276	0
<input type="checkbox"/>	PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ENDOXYLANASE FROM THE CULTURE BROTH OF BACILLUS CEREUS BSA1 Mandal A., Kar S., Das Mohapatra P.K., Maity C., Pati B.R., Mondal K.C.	277-282	0
<input type="checkbox"/>	RAPID DIFFERENTIATION OF BACTERIAL SPECIES BY HIGH RESOLUTION MELTING CURVE ANALYSIS Simenc J., Potocnik U.	283-290	0
<input type="checkbox"/>	ПЕРЕКРЕСТНАЯ АНТИСТРЕССОВАЯ ЗАЩИТА УФ-ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ УЧАСТИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Вустин М.М.	291-296	0
<input type="checkbox"/>	ПОЛУЧЕНИЕ 3,17-ДИКЕТОСТЕРОИДОВ ИЗ СОЕВЫХ СТЕРИНОВ С ПОМОЩЬЮ АКТИНОБАКТЕРИЙ MYCOBACTERIUM NEOAURUM, PIMELOBACTER SIMPLEX IRHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS Андрюшина В.А., Родина Н.В., Стыценко Т.С., Лью Дук Хи, Дружинина А.В., Ядерец В.В., Войшвилло Н.Е.	297-301	3
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ НА РАСТЕНИЯ ФИТОГОРМОНОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ Соколова М.Г., Акимова Г.П., Вайшла О.Б.	302-307	3
<input type="checkbox"/>	СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ГРИБА ASPERGILLUS AWAMORI Рожкова А.М., Середа А.С., Цурикова Н.В., Нуртаева А.К., Семёнова М.В., Римарева Л.В., Рубцова Е.А., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Сеницын А.П.	308-317	3
<input type="checkbox"/>	НОВЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РОДА RENICILLIUM, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ <input type="checkbox"/> ГР Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Козловский А.Г.	318-323	7
<input type="checkbox"/>	ДЕЙСТВИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ СВЕЯЩИХСЯ ГРИБОВ Выдрякова Г.А., Гусев А.А., Медведева С.Е.	324-329	2
<input type="checkbox"/>	МЕЛАНИН СТЕРИЛЬНОЙ ФОРМЫ LAETIPORUS SULPHUREUS Оленников Д.Н., Агафонова С.В., Столбикова А.В., Рохин А.В.	330-335	0
<input type="checkbox"/>	БИОИНЖЕНЕРИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ: СОЗДАНИЕ НОВЫХ АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОЗОВ С ПОМОЩЬЮ ЛЕКТИНОВ НА ПРИМЕРЕ ТАБАКА И РАПСА Вершинина З.Р., Баймиев А.Х., Благова Д.К., Князев А.В., Баймиев А.Х., Чемерис А.В.	336-342	3
<input type="checkbox"/>	БИОПОЛИМЕР АЛЬГИНАТНОЙ ПРИРОДЫ С ПРЕОБЛАДАНИЕМ L-ГУЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Мелентьев А.И., Логинов О.Н.	343-347	1
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ СЕМЯН СОИ НА ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ СВОЙСТВА ПШЕНИЧНОЙ МУКИ Пермякова М.Д., Труфанов В.А.	348-354	0
<input type="checkbox"/>	РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕПРЯМОГО КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОМИЦИНА В МОЛОКЕ Буркин М.А., Гальвидис И.А.	355-361	5

УДК 632.651+632.938+581.2:577.115.3

РАНЕВАЯ РЕПАРАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ (Обзор)

© 2011 г. Н. И. Васюкова, Г. И. Чаленко, Н. Г. Герасимова, О. Л. Озерецковская

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

e-mail: ozeretskovskaya@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 31.05.2010 г.

Проанализированы сигнальные системы, ответственные за процесс репарации растений и экспрессию защитных эффектов растительных тканей. Особое внимание уделено мобильному системному сигналу процесса репарации – жасмоновой кислоте, биосинтезу жасмонатов и транспорту сигнала в места индуцирования защитных ответов растения. Рассмотрены основные защитные ответы клубней картофеля, индуцированные поранением.

Исследование процессов репарации поранений крайне важно для познания механизмов фитоиммунитета и разработки методов его интенсификации с целью защиты от фитопатогенов и неблагоприятных условий среды. Еще в начале прошлого века [1] было отмечено, что на поверхности поранения клубня кольраби (*Brassica oleracea* L.) образуются некие вещества, стимулирующие процессы заживления. При промывании поверхности среза такие вещества удаляются и процесса заживления не происходит. Впоследствии [2] из пораненных бобов (*Vicia faba* L.) выделили соединение, стимулирующее клеточное деление и образование раневой перидермы, которое было названо травматической кислотой и идентифицировано как 2-Z-додецен-1,2-дикарбоновая кислота. Травматическая кислота была выделена из растительных экстрактов и получила название “раневого гормона”. Ее влияние на метаболизм растений оставалось недостаточно ясным, хотя предполагалось, что травматическая кислота способна изменять уровень фосфорилирования белков, вызывать деление и рост неповрежденных клеток растений, а также вызывать образование каллуса.

Показано, что травматическая кислота взаимодействует с рецепторами плазмалеммы растений и таким образом “включает” соответствующие сигнальные системы. Однако возможно и прямое действие травматической кислоты на протеинкиназы и протеинфосфатазы растительных тканей, что изменяет спектр фосфорилирования белков.

В конце девяностых годов прошлого столетия благодаря достижениям техники биохимического анализа стали появляться работы, позволяющие расшифровать последовательность событий, ответственных за процессы раневой репарации.

Наиболее существенный вклад в понимание процессов раневой репарации был внесен работами американского биохимика К. Райана с сотрудниками, которые показали, что механические поране-

ния листьев томатов и картофеля (*сем. Solanaceae*) системно экспрессировали гены ингибиторов протеиназ (ИП) [3]. Последние хотя и не синтезируются конститутивно, но накапливаются до высокого уровня локально и системно после поранения растительной ткани. С тех пор продуцирование ИП стало использоваться как модельная система в работах по исследованию раневой сигнализации, более того, ИП были признаны ее маркером. ИП функционируют как защитные белки, предохраняющие ткани растений от последствий механических поранений, а также повреждений, вызываемых насекомыми.

Почти все ИП растений представляют собой пептиды или небольшие белки, не содержащие углеводов. Предполагается, что ИП устойчивы к действию протеиназ, хотя имеются и исключения из этого правила. Как правило, рассматриваются три главные функции ИП: запасные белки растений, регуляторы ферментативных процессов, составная часть защитной системы растений.

Механизмы раневой репарации активируются как непосредственно в местах поранения, так и в тканях, удаленных от сайта локального воздействия, в результате чего индуцируются системные защитные ответы растения [4]. В индукции системной защиты участвует мобильный сигнал, передающий информацию о раневом стрессе по всему растению или его органу. В настоящее время установлено, что главными компонентами мобильного сигнала являются 18-аминопептид, названный системин, а также жасмоновая кислота (ЖАК), а возможно и некоторые оксипирины, возникающие в процессах липоксигеназного окисления.

Системин и ЖАК – основные компоненты сигнала раневой репарации растительных тканей. Системин является единственным пептидом, обладающим в растениях гормоноподобным действием. Этот аминокислотный пептид обнаружен в лаборатории Рай-

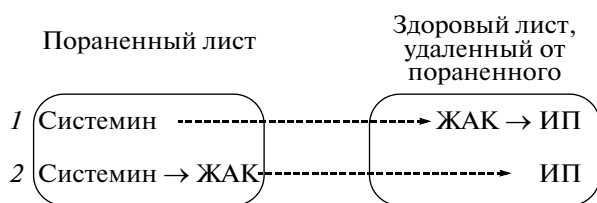


Рис. 1. Две модели (1, 2) взаимодействия системина и ЖАК в процессе индукции системной раневой сигнализации.

ана в 1992 г. как специфический индуктор образования ИП [5, 6].

Системин представляет собой обогащенный пролином полипептид, содержащий 18 аминокислотных остатков, способный индуцировать системную экспрессию ИП [7]. Установлено, что локальное поранение листьев томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill) приводило к образованию системина в результате протеолитического разрушения 200-аминокислотного предшественника – просистемина, который накапливался в паренхимных клетках флоремы томатов и картофеля (*Solanum tuberosum* L), подтверждая, что паренхима флоремы включается в системную раневую сигнализацию [4, 8]. Ферменты, с помощью которых происходит протеолитическое разрушение просистемина, пока еще не идентифицированы. Неясно также, как системин выделяется из паренхимы флоремы для связывания на мембране клетки с рецептором SR160, который представляет собой протеинкиназу, обогащенную остатками лейцина [9].

Предполагается [4], что участие системина в системной сигнализации томатов может осуществляться двумя путями: 1) системин образуется в местах поранения и далее транспортируется в отдаленные листья, где и участвует в активировании биосинтеза октадеканойдов и последующей экспрессии ИП; 2) системин образуется на сайте поранения, где он индуцирует образование ЖАК, которая далее функционирует, как мобильный сигнал для экспрессии ИП (рис. 1). Обе модели предполагают, что для функционирования раневого ЖАК-зависимого сигнального пути требуется участие обоих компонентов раневой сигнализации (системина и ЖАК), распознавание системного сигнала в удаленных тканях растений, а также присутствие ЖАК в местах индуцирования системных защитных ответов.

Пока системин обнаружен только в надземных органах (но не в корнях) томатов и картофеля (сем. Solanaceae) и не обнаруживается у *Arabidopsis thaliana* L. (сем. Brassicaceae), который, очевидно, обладает иными регуляторами сигнального каскада, индуцированного поранением [9, 10].

В результате связывания системина с рецептором на мембране растительной клетки активирует-

ся октадеканойдный путь биосинтеза жасмонатов, которые образуются из α -линоленовой кислоты с помощью ферментов липоксигеназного окисления [11–13]. Линоленовая кислота высвобождается из фосфолипидов мембран [14] при участии фосфолипаз и окисляется 13-липоксигеназой до 13-гидроперокси-октадекатриеновой кислоты. Последняя дегидрирует с помощью алленоксидсинтазы с образованием нестабильного алленоксида с последующей циклизацией до 12-оксофитодиеновой кислоты (ОФДК) [15]. Вышеназванные реакции осуществляются в пластидах, тогда как дальнейшие финальные энзиматические превращения октадеканойдов происходят в пероксисомах, в которые перемещается ОФДК. В пероксисомах ЖАК высвобождается из КоА-эфира с помощью тиоэстеразы [16]. Все гены, кодирующие ферменты, вовлеченные в биосинтез ЖАК, экспрессируются в ответ на поранение. Образование ЖАК способны активировать абсцизовая кислота, этилен, пероксид водорода, УФ, олигогалактоуронины и аминоконъюгаты жирных кислот, в то время как салицилаты и оксид азота подавляют синтез ЖАК [11].

Наряду с ЖАК в тканях растений присутствуют ее производные, которые продуцируются в пероксисомах в процессах метилирования, гликозилирования, гидроксиглирования, сульфонирирования, декарбоксиирирования, конъюгации с аминокислотами. Производные ЖАК способны регулировать системные защитные раневые ответы. Помимо ЖАК, роль сигнальной молекулы в ЖАК-зависимом сигнальном пути способен выполнять ЖАК-изолейцин [17]. Другое производное ЖАК – метил-ЖАК участвует в защитных реакциях растений к абиотическим стрессам, а также в индукции устойчивости против фитопатогенов [18]. Метил-ЖАК способен действовать как диффузный межклеточный мессенджер или летучий сигнал для коммуникации между растениями, выполняя роль сигнала тревоги. Однако непосредственные данные о специфической роли метил-ЖАК в системной раневой сигнализации или других межклеточных сигналах пока еще ограничены. Предполагается, что системная экспрессия ИП, индуцированная поранением, медируется скорее сигналом, который транспортируется внутри растений, чем фактором, который диффундирует через атмосферу. Роль такого мобильного сигнала для экспрессии защитных генов при раневой репарации выполняет ЖАК. Установлено, что ЖАК может транспортироваться по флореме в отдаленные участки растения [4, 19, 20]. Система плазмодесм позволяет ЖАК достигать клетки-мишени, оповещая растение о стрессовой ситуации и включая экспрессию генов ИП (рис. 2).

Существует три линии доказательств того, что ЖАК является необходимым компонентом мобильного системного сигнала раневой репарации.

1. ЖАК или ее производные накапливаются в тканях растения в ответ на поранение, что сопровождается активированием ряда ключевых ферментов биосинтеза ЖАК. Раневой стресс приводит к двухфазному возрастанию содержания ЖАК: быстрое накопление эндогенной ЖАК в течение 30 мин после поранения и ее более медленное накопление через 1 сут после раневого воздействия. “Жасмонатный взрыв” сопровождается активированием активности липоксигеназы, которая, в свою очередь, повышает синтез ЖАК и способствует возникновению второго пика накопления ЖАК [21].

2. Экзогенная ЖАК индуцирует экспрессию тех же защитных генов, что и поранение, в том числе генов ИП [3, 12].

3. При инактивации генов биосинтеза ЖАК подавляется защитная реакция растений на поранение [11].

Большинство генов растений томатов, индуцированных ЖАК или поранением, экспрессируются *COI1*-зависимым способом [11]. При анализе мутанта *coi1* арабидопсиса был идентифицирован ген *COI1* (*coronatine-insensitive1*), который играет роль ключевого компонента ЖАК-сигнального пути. Он кодирует F-box-белок с м.м. 66 кДа, обогащенный участком многократно повторяющихся остатков лейцина [22]. F-box-белок является частью убиквитинлигазного комплекса, участвующего в деградации репрессорных белков – JAZ-белков (*Jasmonate-ZIM* = *JAS-Zink-finger inflorescence meristem*) с помощью убиквитина в 26S-протеосоме в ответ на поранение или обработку растений ЖАК. При поранении в клетках растений индуцируется синтез одного или более биоактивных жасмонатов (особенно существенным, кроме ЖАК, является ЖАК-изолейцин), повышенный уровень которых способствует связыванию JAZ-белков с *COI1*-белком и последующей их деградации, приводя к депрессии защитных генов. Корреляция между экспрессией генов и накоплением жасмонатов в пораненных листьях подтверждает функцию ЖАК как активного системного раневого сигнала, активирующего системные защитные ответы растений [22, 23]. Роль ЖАК как дистанционного раневого сигнала подтверждается также тем фактом, что C^{14} -меченая ЖАК, инъецированная локально, распространяется по флоэме к удаленным листьям в течение нескольких часов и вызывает экспрессию ИП [4]. Пептидный сигнал – системин в тканях томатов усиливает дистанционные защитные ответы с помощью усиления продуцирования ЖАК в тканях растения [8].

Из генетических исследований с томатами [11] были сделаны два важных заключения: 1) жасмонатный путь играет существенную роль в защитных ответах, индуцированных поранением и 2) поранение и системин активируют экспрессию ИП через

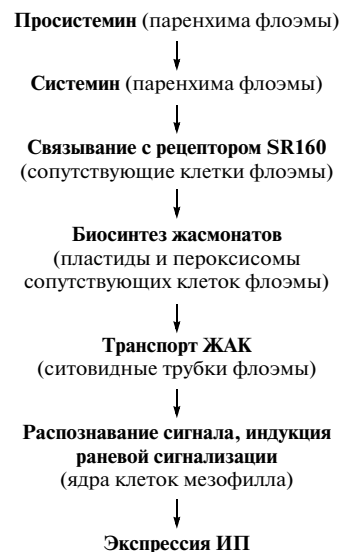


Рис. 2. Индукция раневой сигнализации в листьях томатов.

общий сигнальный путь, который требует наличие ЖАК. В настоящее время установлено, что ЖАК-зависимая сигнализация является частью широкой сети внутрисвязанных путей сигнализации, которые координируют ответ хозяина на различные биотические и абиотические стрессы [24].

Индукцированные защитные ответы растений. События, происходящие в раневой и прираневой зонах растений, имеют целью репрограммирование клеточного генома для реализации защитных эффектов растительной ткани. Представляло интерес проанализировать защитные ответы на примере пораненных клубней картофеля, которые являются классической моделью для исследования процессов раневой репарации.

Естественно предположить, что процессы раневой репарации связаны с энергетическими затратами, которые необходимы для формирования механических барьеров на пути проникающей инфекции, а также многочисленных процессов синтеза защитных соединений.

Определения показали [25], что в клетках прираневой зоны клубней картофеля исчезал крахмал и возрастало содержание моносахаров, которые, по-видимому, и используются в качестве субстрата для реализации энергетических затрат. В тканях механически пораненного клубня значительно возрастало содержание митохондриального белка. Возросшее количество митохондриального белка является системным: даже в нескольких сантиметрах от области поранения его содержание превышало контрольный вариант. Проведенные электронно-микроскопические исследования тканей, находящихся в зоне поранения клубней, показали, что возрастание содержания митохондриального



Рис. 3. Схема терпенового биогенеза в интактных и поврежденных клубнях картофеля. ФСТ – фитостерины, ГА – гликоалкалоиды. Цифры обозначают количество стероидов и ГА (мкг/г сырой ткани).

белка связано с увеличением количества митохондрий.

Вновь образованные митохондрии являются энергетически столь же активными, как и митохондрии неповрежденной ткани. Таким образом, дефицит энергии, возникающей в процессе поранения, удовлетворяется не за счет возрастания степени сопряжения дыхания с фосфорилированием у уже существующих митохондрий, а вследствие увеличения числа митохондрий, являющихся энергетическими центрами клеток.

К числу защитных ответов клубней картофеля на поранение относится образование раневой перидермы, состоящей из многих рядов плотно прилегающих друг к другу клеток, оболочки которых адкрустированы суберином. Прообразом раневой перидермы является естественная перидерма, покрывающая клубень снаружи [26]. В процессе образования перидермы паренхимные клетки клубня картофеля приобретали меристематическую активность. В них закладывалась вторичная меристема или пробковый камбий (феллоген), при делении которого и образуется раневая перидерма.

Образовавшаяся перидерма является не только механическим, но и токсическим барьером, препятствующим проникновению патогенов в ткани клубней. В составе перидермы присутствует высокое содержание токсических соединений – фенолов и стероидных гликоалкалоидов (α -соланин и α -чаконин). В паренхимной ткани интактных клубней картофеля количество фенолов в десятки раз меньше, чем в составе раневой перидермы, тогда как гликоалкалоиды (ГА) в паренхиме отсутствуют. ГА подавляют развитие фузариоза (*Fusarium culmorum* W.G.Sm.) на порядок сильнее, чем самые токсичные фенольные соединения. Весьма существенно также, что и фенолы, и особенно ГА залегают в прираневом слое клубня строго локаль-

но, что еще более увеличивает степень их токсичности для фитопатогенов [27].

Защитными ответами картофеля, возникающими в ответ на поранение, является образование ИП, о чем уже упоминалось выше. ИП выполняют важную роль в инактивировании протеаз фитопатогенов и насекомых, участвуют в защите растений от неблагоприятных факторов среды, а также регулируют ферментативные процессы, протекающие при прорастании клубней. Исследования показали, что ингибиторы сериновых протеиназ выделялись в диффузаты клубней картофеля сразу же после поранения. Через 1 сут активность ИП уменьшалась, а спустя 72 ч исчезала совсем [28].

К числу защитных эффектов процесса раневой репарации клубней картофеля относится модификация стероидного биогенеза в зоне поранения. Известно, что основным патогеном картофеля служит возбудитель фитофтороза оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Оказалось, что *P. infestans* является ауксотрофом в отношении образования стероидного ядра и в силу этого патоген вынужден заимствовать необходимые ему стероиды из тканей своего хозяина – картофеля. В отсутствие стероидов у фитофторы нарушается формирование цитоплазматической мембраны зооспор [29]. Добавление стероидов в культуральную среду для роста фитофторы способствовало половому и бесполому размножению паразита, а также повышало его патогенность. Успешное паразитирование оомицета на картофеле в значительной степени зависит от того, в какой мере патоген способен воспользоваться стероидами своего растения-хозяина. Оказалось, что содержание стероидов в раневой зоне уменьшалось более, чем на треть, причем особенно сильно сократилось количество наиболее благоприятного для размножения и паразитирования фитофторы β -ситостерина, который в па-

ренхимной ткани интактного клубня составляет примерно половину общей фракции стеринов.

В раневой ткани присутствуют предшественники синтеза стеринов: 24-метиллофенол и циклоартенол, что свидетельствует об активно протекающих процессах синтеза стероидного ядра, возможно связанного с образованием стероидных гликоалкалоидов [30]. Дело в том, что начальные этапы биогенеза являются общими как для стеринов, так и стероидных ГА. Возможно, поэтому предположить, что образование этих групп соединений в паренхиме интактной ткани и раневой перидерме являются взаимозависимыми процессами.

Присутствие механического барьера, состоящего из раневой перидермы, и наличие токсических гликоалкалоидов являются серьезным препятствием для раневых патогенов рода *Fusarium*. Наоборот, возбудитель фитофтороза, адаптированный в ходе сопряженной эволюции к картофелю, приобрел способность деградировать такие конститутивные антибиотики, как ГА, разлагая их до уровня агликона — соланидина, существенно менее токсичного, чем соответствующие гликозиды [31]. Поэтому наиболее вероятным препятствием для проникновения фитофторы в клубень картофеля является, с одной стороны, барьер из раневой перидермы, а с другой — недостаток стеринов, необходимых для процесса спороношения фитофторы.

Итогом вышесказанного является рис. 3, на котором сравнивается количество стеринов и ГА (мкг/г сырой ткани) в интактных и поврежденных тканях клубней картофеля.

Интересно отметить, что количественное содержание стеринов и ГА в тканях интактной паренхимы и паренхимы, пораженной совместимой расой фитофторы, практически не различается, хотя является следствием различных причин. Так, в интактной паренхиме ГА не образуются, тогда как в зараженной ткани ГА, если и образуются, то разлагаются оомицетом до менее токсических соединений.

Успешному процессу раневой репарации в клубнях картофеля способствует высокая влажность, температура 18–20°C и свободный доступ кислорода. Такие условия не всегда доступны в поле или условиях хранилища. Именно поэтому особенно существенным является возможность интенсифицировать заживление поврежденных участков картофельной ткани. Ускорить процессы раневой репарации удастся с помощью обработки элиситорами, в качестве которых могут быть использованы хитозан и арахидоновая кислота в соответствующих концентрациях. Эти элиситоры индуцируют не только локальную, но и системную пролонгированную защиту, распространяющуюся по всему растению картофеля [32]. При грамотном использовании элиситоров защищенность расти-

тельных тканей может сохраняться целый год до нового урожая клубней картофеля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haberlandt G.* // Biol. Zentralbl. 1922. В. 42. № 1. S. 145.
2. *English J., Bonner J., Haagen-Smith A.J.* // J. Amer. Chem. Soc. 1939. V. 61. № 12. P. 3434–3436.
3. *Green T.R., Ryan C.A.* // Science. 1972. V. 175. № 4023. P. 776–777.
4. *Schilmiller A.L., Howe G.A.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. № 2. P. 369–377.
5. *Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C.A.* // Science. 1991. V. 199. № 4. P. 995–998.
6. *Farmer E.E., Johnson R.R., Ryan C.A.* // Plant Physiol. 1992. V. 98. № 3. P. 995–1002.
7. *Ryan C.A.* // Plant Mol. Biol. 1992. V. 19. № 1. P. 123–133.
8. *Narvaez-Vasquez J., Ryan C.A.* // Planta. 2004. V. 218. № 3. P. 360–369.
9. *Scheer J.M., Ryan C.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 4. P. 9585–9590.
10. *Ryan C.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1477. № 1. P. 112–121.
11. *Feussner I., Wasternack C.* // Annu. Rev. Plant Biol. 2002. V. 53. P. 275–280.
12. *Rozahl S., Feussner I.* // Plant Lipid / Ed. D.J. Murphy. Oxford: Blackwell, 2004. V. 53. P. 329–454.
13. *Wasternack C., Stenzel I., Hause B., Hause G., Kutter C., Maucher H., Neumerkel J., Feussner I., Miersch O.* // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. № 2. P. 297–306.
14. *Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I.* // Plant Cell. 2002. V. 13. № 12. P. 2191–2209.
15. *Гречкин А.Н., Тарчевский И.А.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 1. С. 132–142.
16. *Li C., Schilmiller A.L., Liu G.I., Jayanty S., Sagaman C., Vrebalov J., Glovannoni J.J., Yagi K., Kobayashi Y.* // Plant Cell. 2005. V. 17. № 6. P. 971–986.
17. *Halitschke R., Baldwin I.T.* // J. Plant Growth Regul. 2004. V. 23. № 2. P. 238–245.
18. *Тарчевский И.А.* // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 2. С. 321–331.
19. *Hause B., Stenzel I., Miersch O., Maucher H., Kramell R., Ziegler J.* // Plant J. 2000. V. 24. № 1. P. 113–126.
20. *Li C., Liu G., Xu C., Lee G.I., Bauer P., Ling H.Q., Ganal M.W., Howe G.A.* // Plant Cell. 2003. V. 15. № 10. P. 1646–1661.
21. *Lee G.I., Howe G.A.* // Plant J. 2003. V. 33. № 3. P. 567–576.
22. *Katsir L., Chung H.S., Koo A.J.K., Howe G.A.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2008. V. 11. № 3. P. 428–435.
23. *Chung H.S., Koo A.J.K., Gao X., Jayanty S., Thines B., Jones A.D., Howe G.A.* // Plant Physiol. 2008. V. 146. № 3. P. 952–964.
24. *Lorenzo O., Solano R.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. № 4. P. 532–540.

25. Платонова Т.А., Акеньшина Г.В., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 1. С. 120–123.
26. Озерецковская О.Л., Чаленко Г.И. // Биохимия иммунитета и покоя растений. М.: ВИНТИ, 1969. С. 70–82.
27. Озерецковская О.Л., Давыдова М.А., Васюкова Н.И., Метлицкий Л.В. // Биохимия иммунитета и покоя растений. М.: ВИНТИ, 1969. С. 22–32.
28. Валуева Т.А., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Ильинская Л.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 5. С. 601–606.
29. Васюкова Н.И., Давыдова М.А., Озерецковская О.Л., Метлицкий Л.В., Сегаль Г.М. // Микология и фитопатология. 1977. Т. 11. № 6. С. 480–487.
30. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И. // Успехи современной биологии. 1980. Т. 89. № 1. С. 28–40.
31. Озерецковская О.Л., Давыдова М.А., Васюкова Н.И., Метлицкий Л.В. // Докл. АН СССР. 1971. Т. 196. № 6. С. 1470–1473.
32. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Ревина Т.А., Валуева Т.А. // Докл. РАН. 2008. Т. 423. № 1. С. 129–132.

Wound Repair in Plant Tissues (Review)

N. I. Vasyukova, G. I. Chalenko, N. G. Gerasimova, and O. L. Ozeretskovskaya

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia

e-mail: ozeretskovskaya@inbi.ras.ru

Received May 31, 2010

Abstract—Signaling systems responsible for repair processes in plants and manifestation of defensive effects in plant tissues were analyzed. Special attention was given to jasmonic acid, a mobile systemic repair signal, as well as to jasmonate biosynthesis and signal transport to the areas where protective responses of plants are induced. The main defense responses of potato tubers induced by wounding were considered.

УДК 577.152.321

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ГРУПП β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.)

© 2011 г. А. Н. Ершова, О. Н. Баркалова

Воронежский государственный педагогический университет, Воронеж, 394043

e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Поступила в редакцию 15.04.2010 г.

Идентифицированы функциональные группы цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха, предварительно очищенной до электрофоретически гомогенного состояния. По кривой зависимости активности фермента от рН, рассчитанным величинам теплот ионизации, фотоинактивации фермента в присутствии метиленового синего, а также инактивации фермента диэтилпирикарбонатом установлено, что в каталитическом центре β -глюкозидазы присутствуют карбоксильная группа глутаминовой или аспарагиновой кислот и имидазольная группа гистидина.

Фермент β -глюкозидаза (β -D-глюкозидглюкогидролаза, КФ 3.2.1.21) избирательно катализирует гидролитическое расщепление β -глюкозидной связи между остатками глюкозы, а также между глюкозой и арил- или алкил-агликоном. Имеется достаточно много данных о свойствах и функциях β -глюкозидаз, выделенных из дрожжей, грибов, бактерий [1–3]. Растительные β -глюкозидазы исследованы в меньшей степени. Установлено, что они обычно проявляют максимальную активность при слабокислых значениях рН (4.0–6.0) и в более узком, чем для бактерий, интервале температур (30–50°C) [4–9]. Считают, что механизм действия различных гликозидаз сходен. В процессе катализа участвуют две карбоксильные группы белка-фермента с различной величиной pK_a [4].

В проростках гороха была обнаружена β -глюкозидаза [8], расщепляющая специфический изосукцинимид- β -гликозид, предшественником агликона которого является циклическое производное γ -аминомасляной кислоты. Установлено наличие нескольких молекулярных форм этого фермента, которые различались по ряду свойств [10]. Молекулярная масса цитоплазматической β -глюкозидазы составляет 63 кДа. Фермент был достаточно устойчив в интервале рН 4.6–7.0 и интервале температур 20–45°C. Однако сведения о механизме действия β -глюкозидазы растений гороха так же, как и других растительных β -глюкозидаз, отсутствуют.

Цель работы – выявление функциональных групп β -глюкозидазы растений гороха, которые участвуют в акте катализа, установление зависимости активности фермента от величины рН, расчет величины pK ионогенных групп и теплоты их ионизации, а также определение скорости фотоинактивации фермента.

МЕТОДИКА

Использовали высокоочищенные препараты цитоплазматической β -глюкозидазы, которые получали из листьев 10-суточных проростков гороха (сорт Рамонский 77), выращенного на свету методом гидропоники. Навеску листьев растирали со средой выделения (1 : 4), включающей 0.05 М фосфатно-цитратный буфер, рН 7.0, 0.4 М сахарозу и 0.01 М фосфат калия. Гомогенат отжимали через капроновую ткань и центрифугировали 30 мин при 3500 g для отделения неразрушенных клеток и их крупных фрагментов. Белки осаждали сернокислым аммонием (60–90%). Полученную после высаливания фракцию для удаления низкомолекулярных примесей пропускали через колонку с сефадексом G-25 (1.0 × 30 см), уравновешенную фосфатно-цитратным буфером, рН 5.6, со скоростью 20 мл/ч. Обессоленную белковую фракцию пропускали через колонку с сефадексом G-100 (1.5 × 40 см), предварительно уравновешенную тем же буфером. Скорость элюции составляла 8 мл/ч. Все операции по выделению и очистке фермента проводили при 4°C.

Активность β -глюкозидазы определяли с п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозидом (**п-НФГ**) по количеству отщепившегося п-нитрофенола [5]. Инкубационная смесь содержала 0.2 мл 10 мМ раствора п-НФГ в 50 мМ фосфатно-цитратном буфере, рН 5.6 и 0.1 мл фермента. После инкубации в течение 30 мин при 37°C реакцию останавливали добавлением 0.2 М раствора Na_2CO_3 . Интенсивность окраски измеряли при 440 нм. В контроле фермент отсутствовал. Количество п-нитрофенола рассчитывали, используя коэффициент поглощения $\epsilon_{440} = 2.41 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$. За единицу активности (Е) β -глюкозидазы принимали количество фермента, катализирующего расщепление 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 37°C. Удельную

Таблица 1. Стадии очистки β -глюкозидазы проростков гороха

Стадия очистки	Количество белка, мг	Активность, Е	Удельная активность, Е мг ⁻¹	Выход, %	Степень очистки, раз
Гомогенат	167.8	2610	15.6	100	1
Высаливание сульфатом аммония, 60–90%	87.4	2230	25.5	85.5	1.6
Гель-хроматография на сефадексе G-25	24.9	1600	64.1	61.1	4.1
Гель-хроматография на сефадексе G-100	0.27	400	1480	16.2	80.7

активность выражали в Е/мг белка. Белок определяли по Лоури и спектрофотометрически на СФ-56 (Россия) при 260 нм. Гомогенность выделенной фракции фермента устанавливали в 7.5%-ном ПААГ [11]. Электродным буфером служил 0.5 М Трис-глициновый буфер, рН 8.3. Напряжение электрического тока подбиралось из расчета 2 мА на 1 кармашек. Идентификацию белка проводили нитратом серебра.

Фотоокисление β -глюкозидазы осуществляли при значениях рН 3.0–8.0 и 25°C в присутствии 5×10^{-6} М раствора метиленовой сини [12]. В качестве источника света использовали лампу накаливания мощностью 200 Вт с красным светофильтром на расстоянии 10 см от поверхности освещаемого раствора.

Модификацию фермента диэтилпиноксикарбонатом (ДЭПК) проводили, рассчитывая так, чтобы в реакционной смеси концентрация спирта составляла не более 1.25% (такая концентрация этанола не изменяла активность фермента) [12]. К раствору фермента добавляли ДЭПК в концентрации 6×10^{-4} М, которая была подобрана в

предварительных опытах. Исследования осуществляли при 25°C, рН 5.6 и концентрации субстрата 10 мМ.

В работе использовали сефадексы G-25 и G-100 фирмы "Pharmacia" (Швеция), реагенты для электрофореза, диэтилпиноксикарбонат, п-НФГ фирмы "Sigma" (США), остальные реактивы марок х.ч. и ч.д.а. — отечественные.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение высокоочищенного препарата β -глюкозидазы. В результате проведенной работы по выделению и очистке цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха (табл. 1) был получен препарат со степенью очистки 80.7 раз и удельной активностью 1480 Е/мг белка. Электрофорез в системе Девис и Лэммли [12] показал, что полученный препарат фермента был гомогенен (рис. 1), давая четко выраженную полосу с $R_f = 0.39$. Это близко к полученным ранее величинам R_f фермента растений гороха [8].

Определение каталитически активных групп β -глюкозидазы. Одним из методов обнаружения каталитически активных групп является анализ зависимости активности фермента от величины рН среды, $v = f(\text{pH})$ (рис. 2) [13]. Данная зависимость позволяет определить значения рК ионных групп белка, участвующих в акте катализа. Как видно на рис. 2, профиль кривой зависимости $\lg v = f(\text{pH})$ имел колоколообразную форму с оптимумом при рН 5.6. Восходящие и нисходящие ветви кривой свидетельствуют об участии в элементарном акте разрыва гликозидных связей субстрата двух функциональных групп.

Логарифмическая зависимость $\lg v = f(\text{pH})$ позволяет определить величины рК функциональных групп β -глюкозидазы, они соответствуют рК 4.3 и 6.4 (рис. 2). Первое значение рК близко карбоксильной группе (рК 3.0–4.7), второе — рК имидазола гистидина (рК 5.6–7.0) [13]. Полученные результаты совпадают с данными других авторов [4], показав-

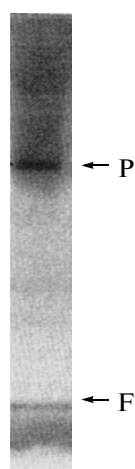


Рис. 1. Электрофореграмма цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха (F — фронт красителя бромфенолового синего, P — β -глюкозидаза).

ших, что в составе активного центра растительных β -глюкозидаз присутствуют карбоксильные группы.

Однако совпадение величины pK , определяемой по кривой $\lg v = f(pH)$, с pK известной химической группы, не является достаточным основанием для однозначной идентификации группы. Считается [14], что из-за свернутости молекулы фермента в глобулы на каталитически активные группы могут оказывать индуктивное воздействие соседние группы, в связи с чем величины констант диссоциации могут колебаться в широких пределах. Поэтому величина pK может служить лишь характеристикой для предварительного заключения об участии определенной группы в акте катализа исследуемого фермента.

Определение теплот ионизации каталитически активных групп β -глюкозидазы. Дополнительным подтверждением наличия в активном центре фермента каталитически активных групп является определение величин их теплот ионизации, ΔH [13]. Определение величины теплоты ионизации функциональных групп β -глюкозидазы растений гороха проводили по уравнению Вант-Гоффа:

$$\Delta H = 2.303R(pK_2 - pK_1) \frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1}, \quad (1)$$

где ΔH – теплота ионизации каталитически активной группы, R – газовая постоянная (8.31 кДж моль⁻¹); pK_1 и pK_2 – константы ионизации функциональной группы при абсолютных температурах T_1 и T_2 .

Величины pK_1 и pK_2 определяли по сдвигу ветвей кривых $\lg v = f(pH)$, полученных при 10 и 40°C, при которых β -глюкозидаза проростков гороха достаточно стабильна. Результаты исследования представлены в табл. 2. В эксперименте при многократном повторении сдвиг pK_1 было трудно определить, так как значения ΔpK колебались в пределах ошибок опыта (≈ 0.1). Однако это обстоятельство говорило о том, что профиль восходящей ветви кривой $\lg v = f(pH)$ определяется константой диссоциации именно карбоксильной группы. По проведенным расчетам величина ΔH оказалась равной 5.6 кДж моль⁻¹, что вполне соответствовало теплоте ионизации карбоксильной группы. Сдвиг pK_2 (ΔpK 0.6) для нисходящих ветвей кривых соответствовал теплоте ионизации имидазольной группы (ΔH 33.9 кДж моль⁻¹). Следует отметить, что величина ΔH является важным критерием идентификации функциональных групп ферментов [14].

Фотоокисление β -глюкозидазы в присутствии метиленовой сини. Для доказательства участия в акте катализа β -глюкозидазы проростков гороха имидазольной группы гистидина было необходимо проведение фотоинактивации фермента в присутствии метиленового синего, которое при-

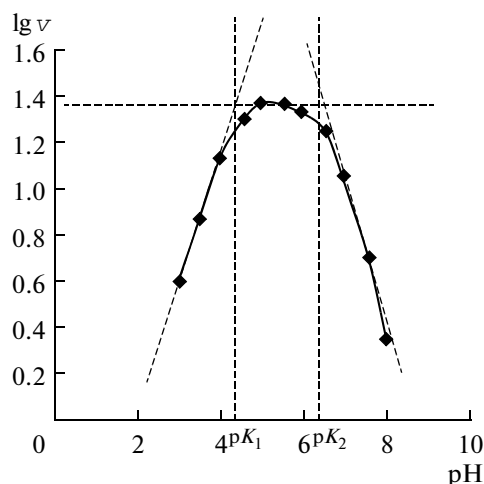


Рис. 2. Влияние pH на активность β -глюкозидазы проростков гороха при 40°C; v – скорость реакции; pK_1 и pK_2 – константы ионизации активных групп каталитического центра фермента для восходящей и нисходящей ветвей кривой соответственно.

водит к разрыву гетероцикла имидазола. Как видно на рис. 3а, β -глюкозидаза подвергалась интенсивной инактивации (кривая 1), в то время как в контрольных опытах с метиленовым синим в темноте (кривая 2) и без него на свету (кривая 3) активность фермента оставалась на постоянном уровне. Полученная зависимость $\lg(E_0/E) = f(t)$ являлась линейной (рис. 3б) и описывалась уравнением реакции первого порядка:

$$k = \frac{2.303}{t} \lg(E_0/E), \quad (2)$$

где k – константа скорости фотоинактивации (ч⁻¹), E_0 и E – активность β -глюкозидазы исходная и в момент времени t соответственно.

Как известно [15], фотоокислению подвергается не только имидазольная группа гистидина, но и фенольная группа тирозина и индольная группа триптофана. Однако, в отличие от последних, скорость фотоокисления имидазольной группы зависит от pH среды [16]. В связи с этим опыты по фотоокислению β -глюкозидазы растений гороха нами проводились в интервале pH 3.0–8.0 при 25°C в течение 4 ч. Как видно на

Таблица 2. Величины pK и ΔH каталитически активных групп β -глюкозидазы растений гороха

Ветвь кривой	pK		ΔpK	ΔH , кДж/моль
	10°C	40°C		
Восходящая	4.4	4.3	0.1	5.6
Нисходящая	6.8	6.2	0.6	33.9

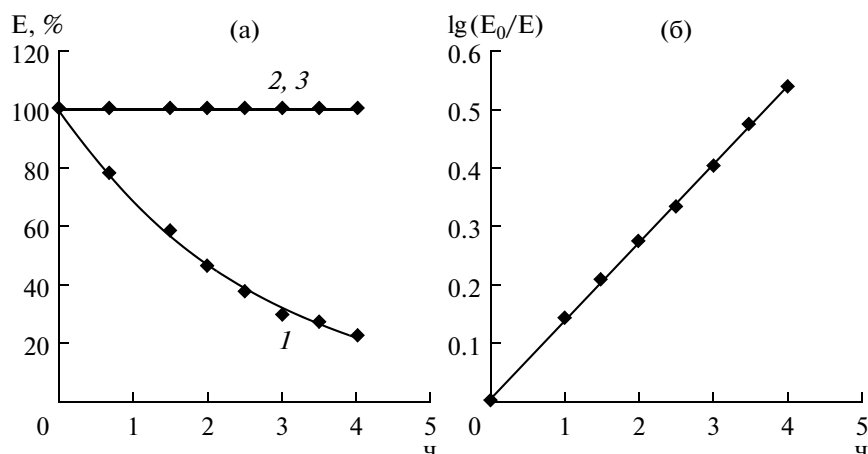


Рис. 3. Инактивация β -глюкозидазы фотоокислением метиленовым синим на свету (а) при рН 5.6 и 25°C (1), без метиленового синего на свету (2), с метиленовым синим в темноте (3); б – зависимость $\lg(E_0/E) = f(t)$. E_0 и E – активность фермента, исходная и в момент времени t соответственно (%), t – время инкубации, ч.

рис. 4, в контрольных опытах активность фермента практически не изменялась. С увеличением рН среды интенсивность фотоинактивации β -глюкозидазы возрастала. Известно [14], что при высокой концентрации H^+ -ионов имидазольная группа протонируется и становится препятствием для отдачи электронов под действием квантов света. С увеличением рН среды по мере депротонирования имидазольной группы интенсивность фотоокисления возрастала. Таким свойством не обладают ни фенольная группа тирозина, ни индольная группа триптофана. Исходя из вышеизложенного, скорость фотоинактивации β -глюкозидазы можно описать следующим уравнением:

$$k = k_0 / (1 + [H^+] / K_2), \quad (3)$$

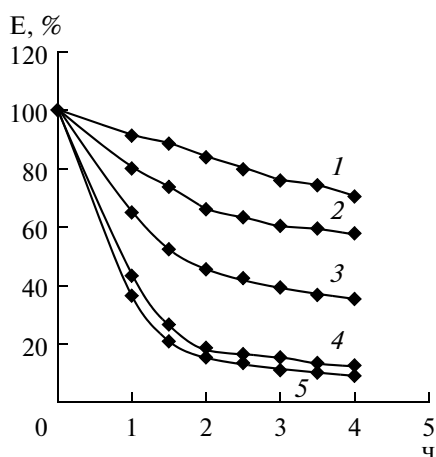


Рис. 4. Фотоинактивация β -глюкозидазы проростков гороха в присутствии метиленового синего при различных рН: 1 – 3.0; 2 – 4.0; 3 – 5.0; 4 – 6.0; 5 – 7.0.

где k – константа скорости фотоинактивации ($ч^{-1}$) при соответствующей величине рН, k_0 – максимальная константа скорости фотоокисления.

На рис. 5 представлена зависимость $k = f(pH)$. Эта кривая имеет S-образную форму, характерную для кривых титрования ионных групп. При рН 6.8 и выше кривая выходит на плато, соответствующее k_0 . Как видно на рис. 3, прямая, проведенная параллельно оси абсцисс на расстоянии от нее, равной $k_0/2$, дает точку пересечения с кривой, соответствующую величине $pK_2 = 6.25$, что характерно для имидазольной группы гистидина.

Модификация β -глюкозидазы диэтилпирикарбонатом. О важной роли имидазольной группы гистидина в действии β -глюкозидазы свидетельствуют и

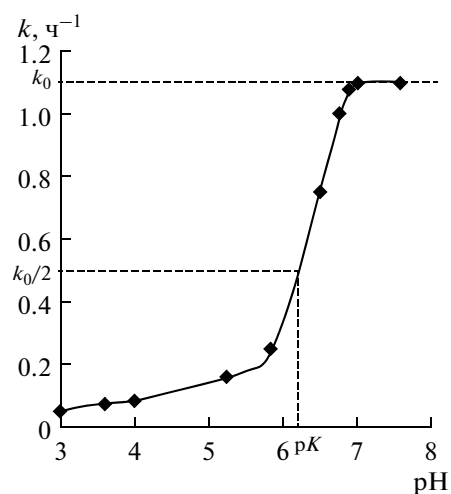


Рис. 5. Зависимость $k = f(pH)$ при фотоокислении β -глюкозидазы проростков гороха при 25°C в течение 4 ч, k – константа скорости инактивации, $ч^{-1}$.

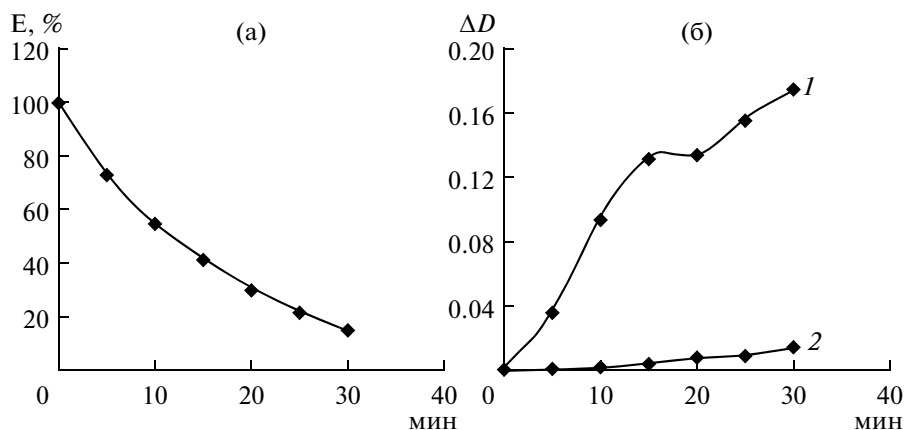


Рис. 6. Инактивации β -глюкозидазы проростков гороха ДЭПК при 25°C (а); динамика изменения оптической плотности при внесении ДЭПК в среду определения активности фермента (ΔD) при 240 (1) и 270 нм (2) (б).

исследования с ДЭПК, специфическим реагентом на эту группу [17]. При внесении в среду ДЭПК между имидазольной группой β -глюкозидазы и реагентом развивается реакция, ведущая к образованию N-этоксиформилимидазола. На рис. 6 представлены результаты проведенных нами опытов по влиянию ДЭПК на активность β -глюкозидазы гороха при 25°C. Как видно, этоксикарбонилирование имидазольной группы гистидина ДЭПК приводит к инактивации β -глюкозидазы, развивающейся по экспоненциальному закону (рис. 6а). Отмечается существенное повышение поглощения света раствором фермента с ДЭПК при 240 нм с увеличением экспозиции до 30 мин и незначительное его изменение при 270 нм (рис. 6б), что является важной особенностью для монокарбэтоксипроизводного гистидина, а не тирозина (рис. 6б). Это также подтверждают полученные нами результаты об участии в акте катализа β -глюкозидазы имидазольной группы гистидина.

Таким образом, проведенные нами исследования по выявлению каталитически активных групп в активном центре цитоплазматической β -глюкозидазы растений гороха с помощью расчетов величин pK и теплот ионизации (ΔH) ионогенных групп позволяют говорить о том, что в разрыве глюкозидной связи субстратов принимают участие карбоксильная группа глутаминовой или аспарагиновой кислот и имидазольная группа гистидина, находящиеся в активном центре данного фермента. Исследования по фотоинактивации β -глюкозидазы в присутствии фотосенсибилизатора и инактивации под действием ДЭПК подтвердили наличие имидазольной группы гистидина в активном центре β -глюкозидазы растений гороха.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seidle H.F., McKenzie K., Marten I. // Arch. Biochem. Biophys. 2005. V. 444. № 1. P. 66–75.
2. Туран Ю., Женг М. // Биохимия. 2005. Т. 70. № 12. С. 1656–1663.
3. Туран Ю. // Биохимия. 2008. Т. 73. № 8. С. 1131–1140.
4. Пасешниченко В.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 1989. Т. 25. № 4. С. 435–449.
5. Захарова Н.С., Петрова Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 4. С. 458–461.
6. Gerardi C., Blando F., Santino A. // Plant Science. 2001. V. 160. № 5. P. 795–805.
7. Sue M., Yamazaki K. // Plant Physiology. 2006. V. 141. № 4. P. 1237–1247.
8. Ershova A.N. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. № 1. P. 250–251.
9. Takashi A., Hanae K., Naoto S. // Phytochemistry. 1998. V. 48. № 1. P. 49–54.
10. Еришова А.Н., Гущина Н.А. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2003. Т. 3. № 6. С. 758–766.
11. Davies B.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. V. 121. № 4. P. 404–427.
12. Ковалева С.В., Дорожко А.И., Каган З.С. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 8. С. 1253–1261.
13. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 2. 234 с.
14. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Тертычная Т.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 35. № 2. С. 123–132.
15. Лосева Л.П., Бендианишвили М.В. // Биохимия. 1986. Т. 51. № 5. С. 840–849.
16. Кочетов Г.А. Тиминовые ферменты. М.: Наука, 1978. 74 с.
17. Буник В.И., Гомазкова В.С. // Биохимия. 1987. Т. 52. № 8. С. 1235–1247.

Identification of Catalytically Active Groups of Pea (*Pisum sativum* L.) β -Glucosidase

A. N. Ershova and O. N. Barkalova

Voronezh State Pedagogical University, Voronezh, 394043 Russia

e-mail: aershova@vspu.ac.ru

Received April 15, 2010

Abstract—Functional groups of cytoplasmic pea β -glucosidase pretreated to an electrophoretically homogeneous state were identified. Data on the pH dependence of the enzyme activity, calculated heat of ionization, photoinactivation of the enzyme in the presence of methylene blue, and inactivation of the enzyme with diethyl pyrocarbonate suggest that the catalytic site of β -glucosidase contains the carboxyl group of glutamic or aspartic acids and the imidazole group of histidine.

УДК 577.152.3

ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА И ТРИПСИНА ИЗ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 г. Т. А. Ревина, И. А. Парфёнов, Е. Л. Гвоздева, Н. Г. Герасимова, Т. А. Валуева

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

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 31.05.2010 г.

Из клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) выделен и очищен до гомогенного состояния белок, обозначенный как РКСИ-23 (potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor). Очистку белка проводили с помощью методов гель-хроматографии на сефадексе G-75 и ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе CL-6В. Белок РКСИ-23 с одинаковой степенью эффективности подавлял активность химотрипсина и трипсина, образуя с ферментами эквимоллярные комплексы. Значительно слабее он действовал на субтилизин Карлсберг. Определена N-концевая 20-членная аминокислотная последовательность белка РКСИ-23. Показано, что ингибитор РКСИ-23 в различной степени угнетает рост и развитие патогенных микроорганизмов *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. и *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, поражающих картофель.

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) относится к числу ведущих и наиболее ценных продовольственных культур в большинстве стран мира, занимающая одно из важнейших мест среди продуктов питания, так как достаточно дешев и обладает относительно высокой питательной ценностью [1]. В настоящее время в связи с необходимостью повышения качества питания, включающее снижение калорийности пищи и увеличение содержания полноценного белка, вносятся серьезные коррективы и в селекцию картофеля, направленные на создание сортов с пониженным содержанием крахмала [2].

Ранее из клубней картофеля сорта Истринский, характеризующийся высоким содержанием крахмала (до 20%), нами были выделены несколько белков, один из которых (PSPI-21) подавлял активность ряда сериновых протеиназ клана химотрипсина (эластазы из лейкоцитов человека (HLE), трипсина и химотрипсина) [3], другой (PKSI) — специфически действовал на субтилизин [4], а третий (PKTI-22) — на трипсин [5]. Белки были отнесены к подсемейству картофельных ингибиторов протеиназ типа Кунитца (PKPI, potato Kunitz-type proteinase inhibitors) и локализованы в различных структурных группах, на которые белки PKPI были разделены на основании особенностей их N-концевых аминокислотных последовательностей [6]. Так, белки PSPI-21 и PKTI-22 принадлежали к группе PKPI-B, белок PKSI — к группе PKPI-C. Было показано, что все три белка подавляют рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растение картофеля

[3–5], а некоторые из них накапливаются в инфицированных клубнях [7]. Таким образом, можно с большой степенью вероятности заключить, что изученные белки-ингибиторы играют важную роль в защите растения от атаки патогенными микроорганизмами.

Новый сорт картофеля Юбилей Жукова, в настоящее время районированный и возделываемый в Московской области, является сортом столового назначения. Для него характерно невысокое содержание крахмала (до 14%). Кроме того, растения картофеля этого сорта обладают повышенной устойчивостью к вирусным заболеваниям и поражению фитопатогенными микроорганизмами [2]. В связи с этим определенный интерес представляет изучение белковых ингибиторов, присутствующих в клубнях данного сорта картофеля, и их роли как в повышении его питательной ценности, так и в защитных процессах растения.

Цель работы — выделение из клубней картофеля сорта Юбилей Жукова белка, действующего как ингибитор химотрипсина, изучение его свойств и определение N-концевой аминокислотной последовательности.

МЕТОДИКА

В работе использовали клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова), которые хранили в течение 2–4 мес в темноте при 4°C, а также трипсин (КФ 3.4.21.4, “Spofa”, Чехия), дополнительно перекристаллизованный из сульфата магния, α-химотрипсин (КФ 3.4.21.1, “Serva”, Гер-

мания), субтилизин Карлсберг (КФ 3.4.21.14, “Sigma” США), папаин (КФ 3.4.22.1, “Calbiochem”, США) и в качестве субстратов – казеин (НПО “Биолар”, Латвия) и *n*-нитроанилиды: *N*-сукцинил-L-глицил-L-глицил-L-фенилаланина (СукГГФПА), *N*α-бензоил-L-аргинина (БАПА), *N*-карбобензоксид-L-аланил-L-аланил-L-лейцина (КбзААЛПА) и L-пироглутамил-L-фенилаланил-L-лейцина (ПгФЛПА) (“Calbiochem”, США). В работе использовали сефадексы G-75 и G-25, КМ-сефарозу CL-6В и низкомолекулярные белки-маркеры фирмы “Pharmacia” (Швеция).

Белки из сока клубней картофеля осаждали (NH₄)₂SO₄. Осадок растворяли в 0.05 М бикарбонате аммония, pH 7.8 и подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-75, как описано ранее [4]. Фракции, содержащие белки с молекулярной массой 20–25 кДа, объединяли и лиофильно высушивали.

Белки с молекулярной массой 20–25 кДа (35 мг) растворяли в 2.5 мл 0.04 М ацетатного буфера, pH 4.3 и наносили на колонку (0.5 × 15 см) с КМ-сефарозой CL-6В, уравновешенную тем же буфером. Сорбент промывали стартовым буфером до полного удаления материала, поглощающего при 280 нм. Связавшийся с ионообменником белок элюировали линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 0.5 М в стартовом буфере. Во фракциях элюента определяли активности ингибиторов химотрипсина, трипсина и субтилизина Карлсберг. Фракции, содержащие материал с максимальной активностью ингибитора химотрипсина, объединяли, обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали.

Диск-электрофорез в 20%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na и β-меркаптоэтанола проводили по Лэммли [8]. Гели окрашивали 0.1%-ным раствором кумасси R-250 в 25%-ном растворе этанола, содержащем 5% формальдегида.

Молекулярные массы ингибитора и его комплексов с ферментами определяли методом высокоэффективной гель-хроматографии (ВЭГХ) на жидкостном хроматографе Стайер (“Аквилон”, Россия), используя колонку Bio Sep-Sec-S-200 (300 × 7.8 мм, “Phenomenex”, США). Гель уравновешивали 0.02 М KH₂PO₄-буфером, pH 7.0, содержащим 0.1 М NaCl. Белок (0.7 мг/мл) растворяли в стартовом буфере, наносили на колонку Bio Sep-Sec-S-200 и элюировали тем же буфером. Для получения комплексов белок (0.7 мг/мл) инкубировали с трипсином или химотрипсином (0.5 мг/мл) в течение 10 мин при комнатной температуре. Для определения тройного комплекса использовали

смесь, содержащую равные количества (0.5 мг/мл) белка, трипсина и химотрипсина.

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Брэдфорд [9] с использованием в качестве стандарта БСА.

Секвенирование белков осуществляли на секвенаторе 470А (“Applied Biosystems”, США) по стандартной программе 02 RPTH [10]. Для идентификации фенилтиогидантоиновых производных аминокислот использовали ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке с сорбентом C18 (“Applied Biosystems”) в 20%-ном ацетонитриле. Детекцию производных аминокислот осуществляли на проточном абсорбциометре 757 (“Cratos”, США).

Активность ингибитора оценивали по степени подавления активности соответствующих ферментов. Активность ферментов определяли по скорости гидролиза казеина [11] и хромогенных субстратов: для химотрипсина использовали СукГГФПА, трипсина – БАПА, субтилизина – КбзААЛПА и для папаина – ПгФЛПА [12–15]. Амидолитическую активность сериновых протеиназ измеряли в 0.05 М трис-НСl-буфере, pH 8.0, при 37°C, используя 1.0 мМ соответствующего хромогенного субстрата (*n*-нитроанилида пептида) в 1.0 мл конечного объема пробы. Концентрация ферментов в пробе составляла для химотрипсина, трипсина и субтилизина 1.0, 1.5 и 2.0 нМ соответственно. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 30%-ной уксусной кислоты и определяли оптическую плотность раствора при 405 нм. Концентрацию активных центров химотрипсина определяли титрованием *N*-транс-циннамоилимидазолом [16], трипсина *n*-нитрофенил-*n*'-гуанидинобензоатом [17]. Для определения концентрации активного ингибитора и равновесных констант ингибирования (*K_i*) химотрипсин (1.0 нМ) или трипсин (1.5 нМ) инкубировали с возрастающими концентрациями ингибитора в 0.2 мл того же буфера при 37°C в течение 5 мин. Остаточную активность фермента оценивали, как описано выше. Кажущуюся *K_i* определяли с использованием компьютерной программы Enzfitter [18], принимая при этом, что взаимодействие ингибитора с ферментом протекает по механизму медленного компактного связывания.

Для определения pH-стабильности раствор белка (0.15 мг/мл) инкубировали в течение 20 ч при 4°C и различных значениях pH: 2.0; 4.0; 6.0; 10.0 и 12.0 (универсальный буфер Джонсона–Линдсея). По окончании инкубации пробы разводили 0.1 М трис-НСl-буфером, pH 8.0, (до концентрации белка 0.03 мг/мл) и определяли активность ингибитора по отношению к химотрипсину, используя в качестве субстрата СукГГФПА.

Термостабильность белка изучали при значениях pH 2.0 и 6.0. Раствор белка (0.15 мг/мл) инкубировали в течение 10 мин на водяной бане при различных значениях температур: 50, 60, 70, 80 и 90°C. Затем пробы быстро охлаждали на льду, разводили 0.1 М трис-НСI-буфером, pH 8.0, (до концентрации белка 0.03 мг/мл) и оценивали активность ингибитора по отношению к химотрипсину, как описано выше.

Влияние белка на рост и развитие макроконидий гриба *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. и зооспор оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary изучали с помощью метода, описанного в работе [19]. Количество растущих и лизированных макроконидий и зооспор и длину образующихся гиф определяли с помощью микроскопа "Laboval" (Германия). В качестве контроля использовали суспензии макроконидий и зооспор без добавления белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Белки с молекулярной массой 20–25 кДа выделяли из сока клубней картофеля сорта Юбилей Жукова, используя солевое осаждение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и гель-хроматографию на колонке с сефадексом G-75, как описано в работе [4]. Эти белки разделяли с помощью ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе CL-6В при pH 4.3, используя линейный градиент концентрации NaCl от 0 до 0.5 М (рис. 1). Видно, что связавшиеся с сорбентом белки разделялись на три основных компонента, обозначенных I, II и III. Все три белковых компонента обладали активностью ингибиторов протеиназ. Они эффективно подавляли активности химотрипсина и трипсина, в то же время значительно слабее действовали на субтилизин Карлсберг и практически не угнетали активность цистеновой протеиназы – папаина.

Электрофоретическое исследование полученных компонентов в ДДС-Na-ПААГ в присутствии восстановителя показало, что только компонент III, элюировавшийся при концентрации NaCl, равной 0.38 М, содержал единственный белок с молекулярной массой 23 ± 1 кДа (рис. 2). Таким образом, можно сделать заключение, что в составе компонента III присутствовал в основном белок, обозначенный как РКСИ-23 (potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor), молекула которого состоит из одной полипептидной цепи.

Гомогенность белка РКСИ-23 была подтверждена результатами определения N-концевой аминокислотной последовательности. Были осуществлены 20 стадий автоматической деградации по Эдману, позволившие идентифицировать его первые

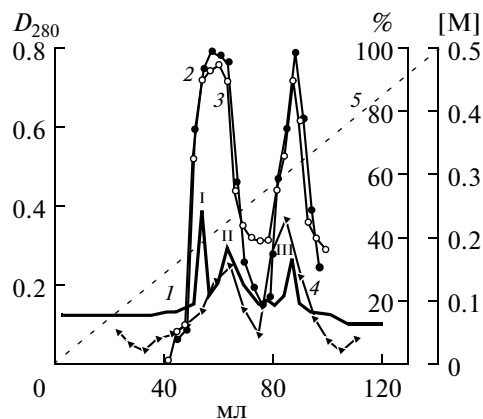


Рис. 1. Ионообменная хроматография на КМ-сефарозе CL-6В белков с молекулярной массой 20–25 кДа из клубней картофеля, I–III — белковые компоненты; 1 — D_{280} ; 2–4 — степень ингибирования трипсина, химотрипсина и субтилизина соответственно (%); 5 — концентрация NaCl (М). Для определения активности ферментов использовали в качестве субстрата казеин.

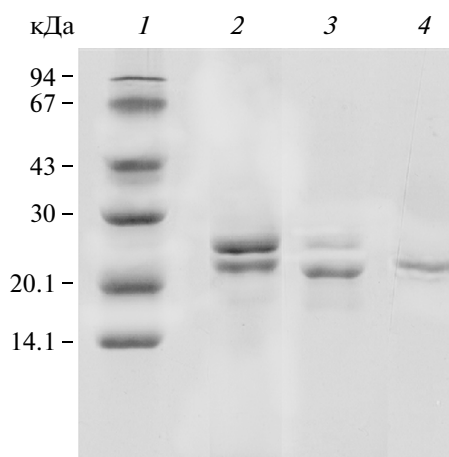


Рис. 2. ДДС-Na-ПААГ-электрофорез компонентов, полученных после ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе CL-6В; 1 — белки-маркеры (кДа): фосфоорилаза b (94), БСА (67), яичный альбумин (43), карбоангидраза (30), соевый ингибитор трипсина Кунитца (20.1), лактальбумин (14.4), 2–4 — компоненты I–III соответственно.

20 аминокислотных остатков. На рис. 3 приведено сравнение установленной N-концевой последовательности белка РКСИ-23 с последовательностями трех белков PSPI-21-6.3, PKTI-22 и PKSI, выделенных нами ранее из клубней картофеля сорта Истринский [3–5]. Видно, что последовательности белков РКСИ-23, PSPI-21-6.3 и PKTI-22 значи-

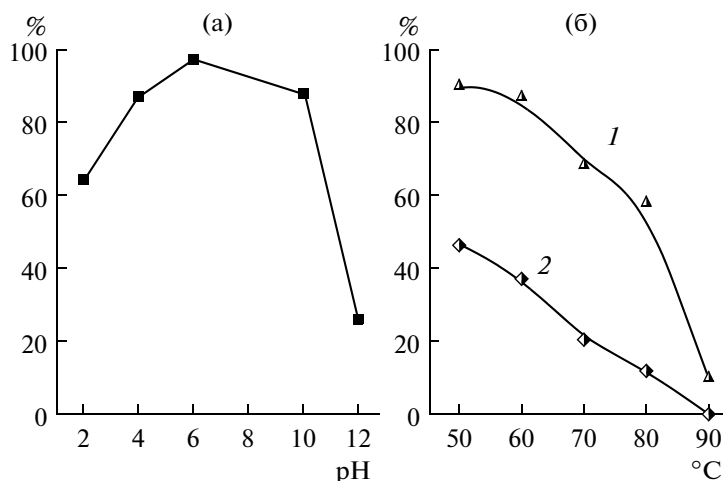


Рис. 5. Зависимость активности белка РКСИ-23 по отношению к химотрипсину от pH (а) и температуры (б). Инкубация при pH 6.0 (1) и pH 2.0 (2). В качестве субстрата использовали СукГГФПА. Измеряли степень ингибирования фермента (%).

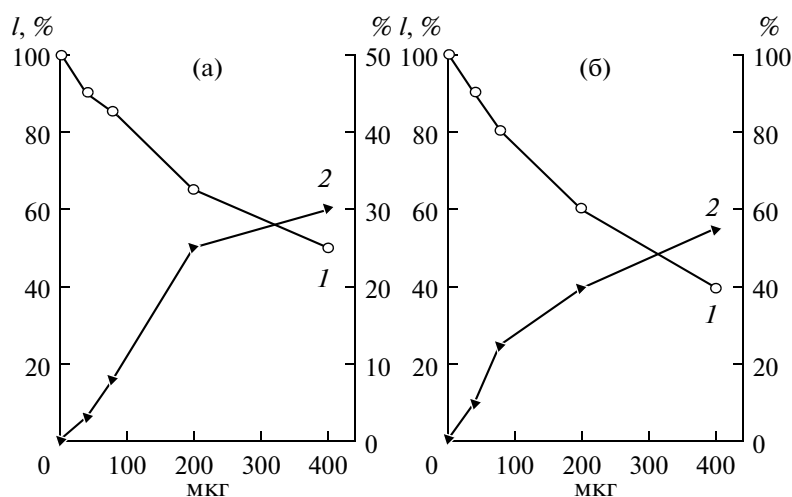


Рис. 6. Влияние белка РКСИ-23 на рост гиф и повреждение макроконидий гриба *F. culmorum* (а) и зооспор оомицета *P. infestans* (б): 1 – длина гиф (левая шкала, l, % от контроля); 2 – количество лизированных макроконидий или зооспор (правая шкала, % от контроля). Приведены средние значения трех независимых экспериментов со стандартной ошибкой от 2 до 10%.

“двуглавым” и содержит два независимых реактивных центра, ответственных за связывание каждой из этих протеиназ.

Известно, что многие ингибиторы сериновых протеиназ обладают высокой устойчивостью к воздействию различных денатурирующих факторов [20]. В связи с этим представляло определенный интерес изучение pH- и термостабильности белка РКСИ-23, результаты которого представлены на рис. 5. Видно, что при 20 ч инкубации белка при различных значениях pH наблюдалось определен-

ное снижение его активности по отношению к химотрипсину, наиболее выраженное при pH 2.0 и 12.0 (рис. 5а), где ее потеря составила 30 и 70% соответственно. Нагревание белка РКСИ-23 от 50 до 90°C в течение 10 мин приводило к значительному снижению активности ингибитора по отношению к химотрипсину как при pH 6.0, так и при pH 2.0. При этом при 90°C ингибитор практически полностью терял свою активность. Таким образом, имелись все основания предположить, что при кислых и щелочных значениях pH, а также при высоких

температурах среды белок РКСИ-23 теряет конформацию нативной молекулы.

Ранее мы наблюдали накопление некоторых белков-ингибиторов РКРІ при инфицировании клубней картофеля сорта Истринский оомицетом *P. infestans* [7]. Было показано, что эти белки не только *in vitro* подавляют активность экзопроотеиназ, секретируемых патогенными микроорганизмами [21, 22], но и угнетают рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов [5]. В связи с этим представлялось интересным исследовать действие на рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов белка РКСИ-23, выделенного из картофеля сорта Юбилей Жукова, который обладает к ним повышенной устойчивостью. На рис. 6 представлены результаты изучения влияния белка РКСИ-23 на рост гиф и развитие макроконидий гриба *F. culmorum* и зооспор оомицета *P. infestans* (Mond.) de Vary. Гриб *F. culmorum* вызывает у растения картофеля фузариозное увядание, а оомицет *P. infestans* — фитофтороз. Оказалось, что при добавлении 400 мкг белка РКСИ-23 длина растущих гиф гриба уменьшалась на 40% по сравнению с контролем (рис. 6а, кривая 1). При этом более чем 50% макроконидий подвергались повреждению (рис. 6а, кривая 2). В то же время при той же концентрации белка РКСИ-23 длина гиф оомицета уменьшалась только на 20% (рис. 6б, кривая 1) и разрушению подвергались всего 30% его зооспор (рис. 6б, кривая 2). Эти свидетельства о том, что белок РКСИ-23 слабее действовал на рост и развитие оомицета, чем гриба.

Таким образом, из клубней картофеля сорта Юбилей Жукова выделен высокоочищенный белок РКСИ-23, который действовал, как эффективный ингибитор химотрипсина и трипсина, а также подавлял рост и развитие двух фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растение картофеля. Можно предположить, что белок РКСИ-23 наряду с другими известными факторами включен в защитную систему картофеля. Поскольку белок РКСИ-23 утрачивал активность при инкубации в кислых и щелочных средах и при повышенных температурах, имеются все основания предполагать, что его присутствие в клубнях не снижает питательную ценность картофеля данного сорта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Симаков Е.А., Яшина И.М. // Картофелеводство. 2008. Т. 14. С. 304–315.
2. Королёв Д.Д. В кн. Картофель и топинамбур — продукты будущего / Ред. В.И. Старовойтов М.: ФГНУ “Росинформагротех”, 2007. 237 с.
3. Valueva T.A., Revina T.A., Mosolov V.V., Mentele R. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 2000. V. 381. № 12. P. 1215–1221.
4. Ревина Т.А., Сперанская А.С., Кладницкая Г.В., Шеллевец А.Б., Валюева Т.А. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1345–1352.
5. Ревина Т.А., Кладницкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валюева Т.А. Биохимия. 2010. Т. 75. № 1. С. 46–52.
6. Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K. // Plant Cell Physiol. 1994. V. 35. № 2. P. 303–312.
7. Валюева Т.А., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. // Биоорганическая химия. 2003. Т. 29. № 5. С. 499–504.
8. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
9. Appenroth K.J., Angsten H. // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1987. V. 182. № 1. P. 85–89.
10. Левина Н.Б., Слепак В.З., Киселёва О.Г., Шемякин В.В., Хохлачёв А.А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 1. С. 24–31.
11. Нортрон Д., Кунитц М., Херриотт Р. // Кристаллические ферменты / Ред. В.Н. Орехович М.: Иностранная литература, 1950. С. 303–306.
12. Kakade M.L., Simons N., Liener I.E. // Cereal Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518–526.
13. Bieth J., Wermuth C.G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 53. № 2. P. 383–390.
14. Люблинская Л.А., Якушева Л.Д., Степанов В.М. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 273–279.
15. Filippova I.Ju., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 203–297.
16. Shonbaum G.R., Lerner B., Bender M.Z. // Biol. Chem. 1961. V. 236. № 11. P. 2930–2935.
17. Chase T., Shaw E. // Meth. Enzymol. 1970. V. 19. P. 20–27.
18. Knigh C.G. // Proteinase Inhibitors / Eds. A.J. Barret, G.R. Salvesen Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 23–51.
19. Ревина Т.А., Герасимова Н.Г., Кладницкая Г.В., Чаленко Г.И., Валюева Т.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 1. С. 101–105.
20. Ohtsubo K. // Agric. Biol. Chem. 1989. V. 53. № 2. P. 333–339.
21. Иевлева Е.В., Ревина Т.А., Кудрявцева Н.Н., Софьин А.В., Валюева Т.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 338–344.
22. Гвоздева Е.Л., Волоцкая А.В., Софьин А.В., Кудрявцева Н.Н., Ревина Т.А., Валюева Т.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 572–579.

Chymotrypsin and Trypsin Inhibitor Isolated from Potato Tubers

T. A. Revina, I. A. Parfenov, E. L. Gvozdeva, N. G. Gerasimova, and T. A. Valueva

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

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Received May 31, 2010

Abstract—Potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor (PKCI-23) was isolated from potato tubers (*Solanum tuberosum* L., Zhukov's Jubilee breed) and purified to a homogenous state. The protein was purified by gel-filtration chromatography and ion-exchange chromatography using Sephadex G-75 and CM-Sepharose CL-6B, respectively. PKCI-23 protein has been shown to inhibit both chymotrypsin and trypsin with equal efficacy, forming equimolar complexes with these enzymes. However, much weaker inhibitory effect of PKCI-23 has been observed for *Carlsberg* subtilisin. The N-terminal 20 amino acid sequence of PKCI-23 has been sequenced. PKCI-23 has been shown to suppress, with different efficacy, the growth and development of pathogenic microorganisms *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary that infect potato.

УДК 577.15.07.543.544

ОЧИСТКА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ *Bacillus subtilis* СКБ 256 БИОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

© 2011 г. У. Р. Раджабов, К. Д. Давранов, М. М. Рахимов

Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека, Ташкент, 100095

e-mail: k_davranov@mail.ru

Поступила в редакцию 20.12.2009 г.

Разработан простой и эффективный метод очистки внеклеточных протеиназ из *Bacillus subtilis* В-1 (СКБ 256) до высокоочищенного состояния. Для этого синтезирован сорбент, представляющий собой сорсилен, пропитанный гемоглобином или цитохромом *c*. Выявлена существенная разница при использовании в качестве биоспецифического лиганда гемоглобина и цитохрома *c*. Выход фермента составил около 40.6 и 65.6% от адсорбированного на носителях фермента, соответственно. Показано, что протеиназы из этой культуры представлены двумя формами, которые различаются молекулярными массами, т.к. разделяются при гель-фильтрации на сефадексе G-50, но эти формы в денатурированном состоянии в 12.5%-ном ПААГе в присутствии 0.1% ДДС-На проявляются в виде одной полосы с ММ 27 кДа. Изучено влияние pH среды, ионной силы и этанола на сорбцию и десорбцию протеиназ на биоспецифическом сорбенте. Показано положительное влияние 20%-ного этанола на процесс десорбции протеиназ.

В настоящее время разработаны различные способы выделения и очистки протеиназ, включая методы биоспецифической хроматографии [1–5]. В качестве лигандов для биоспецифической хроматографии успешно используется как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные соединения, имеющие сродство к протеиназам [1–3]. Например, в качестве полимерных биоспецифических лигандов были использованы синтетический полилизин, грамицидин, белки — гемоглобин и овомукоид, нативная белковая часть деминерализованного хитина, иммобилизованные на различных носителях. Такие сорбенты оказались достаточно эффективными для аффинной хроматографии протеолитических ферментов из ряда источников [4–6]. Вместе с тем в большинстве случаев методы биоспецифической хроматографии на сорбентах с ковалентно связанными лигандами являются многостадийными, особенно при синтезе самих сорбентов с теми или иными лигандными группами, и характеризуются невысоким выходом очищенных ферментов.

Цель работы — изучение эффективности насыщенного гемоглобином и цитохромом *c* сорсилена для биоспецифической очистки протеиназ, секретруемых *Bacillus subtilis* СКБ 256.

МЕТОДИКА

Фермент получали из фильтрата культуральной жидкости *B. subtilis* СКБ 256. Штамм выделен сотрудниками кафедры микробиологии и биотехнологии Национального университета Узбекистана и хранится в музее кафедры, а также депонирован и хранится в музее типовых культур Института мик-

робиологии АН РУз под номером СКБ 256. Условия выращивания, состав питательной среды не отличались от ранее описанных [7]. Прирост биомассы измеряли нефелометрически при 590 нм. Продуктивность культуры определяли как отношение величины протеолитической активности в культуральной жидкости к величине биомассы и выражали в условных единицах.

Культуральную жидкость отделяли от клеток центрифугированием в течение 30 мин при 6000 g (4°C). Активность протеиназы измеряли по модифицированному методу [8] в 0.1 М универсальном буфере, pH 8.0, используя хромогенный субстрат *p*-нитроанилид бензилоксикарбонил-L-аланил-L-аланил-L-лейцин (Z-Ala-Ala-Leu-pNA), синтезированный по методу [9], а в качестве фермента — 1 мл раствора протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256, содержащего 0.02–0.03 ед. активности.

Биоспецифический сорбент для очистки протеиназ получали путем пропитывания сорсилена гемоглобином (“Reanal”, Венгрия) или цитохромом *c* (“Biomed”, Польша). Для создания эффективного сорбента в качестве лиганда были использованы белки с разными молекулярными массами и другими физико-химическими свойствами, а в качестве носителя — сорсилен (продукт Высшей технологической школы г. Праги, Чехия) с различным размером пор, способный связываться с белками с различными физико-химическими свойствами. Пропитывание носителя осуществляли следующим образом: 1 г сорсилена суспендировали в пятикратном объеме 1%-ного раствора гемоглобина или цитохрома *c* в 0.05 М универсальном буфере, pH 8.0.

Смесь перемешивали и выдерживали в течение 10–12 ч при 6–10°C. Осадок промывали тем же буфером, содержащим 20% этанола, до исчезновения следов белка в промывной жидкости (тест – определение оптической плотности при 280 и 260 нм). Содержание белков лигандов зависит от конкретных условий эксперимента и составляет от 0.05 до 1.0 мг/г носителя. Синтезированный сорбент проявляет специфичность к протеиназам, он стабилен в пределах pH от 4.5 до 9.5. Сорбционная емкость сорбента зависит от условий биоспецифической сорбции фермента и при подобранных условиях (pH 7.0–8.0, температура 26–28°C, ионная сила буфера 0.1 М) составляет в среднем 2.8–3.2 ед./г для гемоглобин–сорсилена и 1.6–1.8 ед./г для цитохром *c*–сорсилена. Наилучшие результаты по очистке внеклеточных протеиназ были получены в экспериментах с носителем, содержащим 1 мг гемоглобина и 0.7 мг цитохрома *c* на 1 г сорбента. После промывания сорбента буфером, содержащим 20% этанола, к нему добавляли раствор препарата протеиназы с концентрацией 3 мг/мл по белку, приготовленный в 0.05 М буфере, pH 8.0, содержащем 20% этанола, перемешивали и выдерживали в течение 15–20 мин при 6–10°C. Затем сорбент трижды промывали пятикратным количеством 20%-ного раствора этанола и отделяли центрифугированием (6000 g, 10 мин). Связанную протеиназу десорбировали с носителя, используя 1 М NaCl, содержащий 20% этанола. Элюированную с сорбента фракцию далее подвергали гель-фильтрации через колонку (1.4 × 30 см) с сефадексом G-50. На колонку наносили 4.0 мг протеиназы с общей активностью 6.8–7.2 ед. В элюатах определяли содержание белка по Лоури, а также спектрофотометрически, считая что концентрация белка 1 мг/мл соответствует $A_{280} = 1$ в кювете толщиной 1 см.

Степень чистоты и молекулярную массу (ММ) ферментов определяли электрофоретически в 12.5%-ном ПААГ в присутствии 0.1% ДДС-Na с использованием белковых маркеров фирмы “Sigma” (США): БСА (66 кДа), овальбумин (45 кДа), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (36 кДа), карбонангидраза (29 кДа), химоотрипсиноген (24 кДа), ингибитор трипсина из сои (20.1 кДа), лактальбумин (14.2 кДа).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что *B. subtilis* СКБ 256 секретирует в культуральную жидкость две формы протеиназы. По характеру гидролиза специфического хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNA они были отнесены к субтилизиноподобным протеиназам [7]. Формы протеиназ различаются и по pH-оптимуму. Одна, более подвижная форма (R_f 0.32), проявляет максимальную активность при pH 8.5, тогда как другая – менее подвижная форма (R_f 0.16), – при pH 8.0. Максимальная протеиназная активность культуральной жидкости равна 0.03 ед./мл.

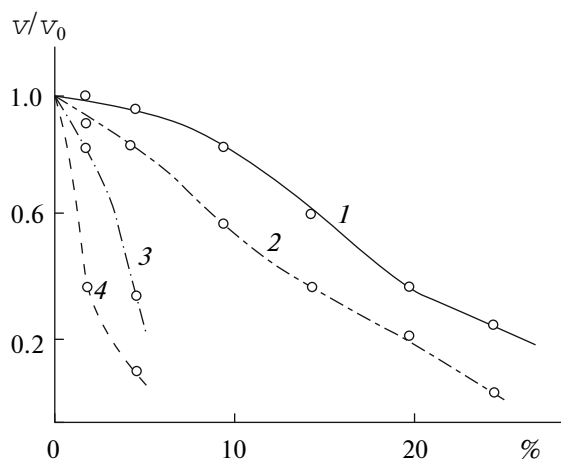


Рис. 1. Влияние первичных спиртов на активность протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256: 1 – метанол, 2 – этанол, 3 – н-пропанол, 4 – н-бутанол, v_0 – скорость гидролиза гемоглобина в отсутствие спирта, v – то же в присутствии различных количеств спирта (%).

Известно, что протеиназы имеют достаточно высокое сродство к белковым субстратам типа гемоглобина или цитохрома *c*. Прочность связывания с ними значительно выше, чем с другими субстратами или синтетическими пептидами (хотя каталитическая реакция может протекать медленнее). Поэтому мы предположили, что на основе этих субстратов можно попытаться создать биоспецифические сорбенты, используя пористые носители, пропитанные этими белками.

После предварительного испытания ряда сорбентов (полиамиды, базальтовые волокна, неорганические полимеры, фильтрующие материалы типа Millirog (“LKB”, Швеция) и др.) был выбран синтетический сорбент-сорсилен, представляющий собой сополимер терефталевой кислоты и этиленгликоля. Коммерческий сорсилен имеет объем пор 2–3 см³/г и удельную поверхность 50–120 м²/г полимера. Комплексы с белками стабильны при широком значении pH: от 3.0 до 8.5 в 2 М растворах нейтральных солей [10].

Предварительными исследованиями установлено, что адсорбированный на сорсилене гемоглобин и цитохром *c* при инкубации в растворах, содержащих протеиназы, подвергаются ферментативному гидролизу. Было также установлено, что этанол замедляет этот процесс, а при его концентрации в среде свыше 20% ферментативный процесс практически не протекает, хотя присутствие спирта мало влияет на связывание фермента с гемоглобином или цитохромом *c*.

Результаты экспериментов, полученные при ингибировании протеиназ из *B. subtilis* СКБ 256 одноатомными спиртами, показали, что их удельная активность снижалась в присутствии этанола, в зависимости от концентрации последнего (рис. 1, кривая 2).

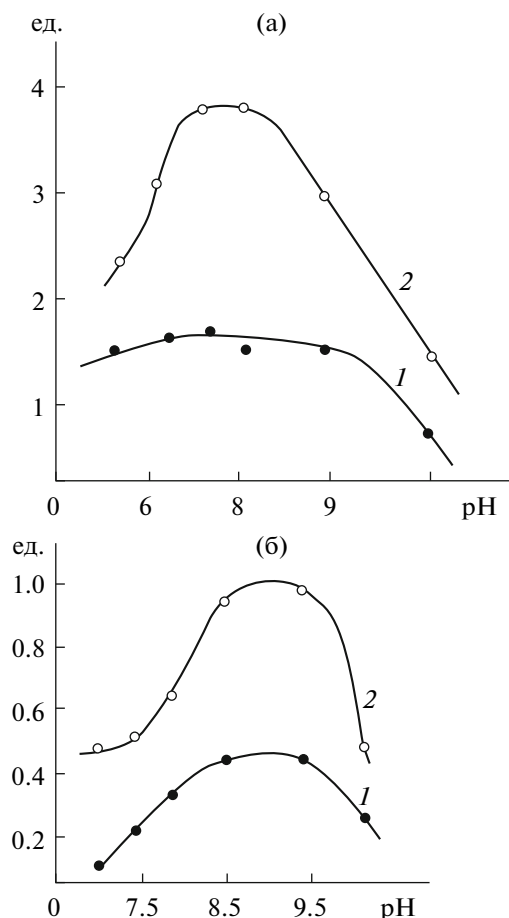


Рис. 2. Влияние pH среды на адсорбцию (а) и десорбцию протеиназы (ед.) *B. subtilis* СКБ 256 из биоспецифического сорбента под действием 1 М NaCl (б); 1 – сорсилен, пропитанный гемоглобином, 2 – сорсилен, пропитанный цитохромом с.

Протеиназная активность подавляется и в присутствии других спиртов, с увеличением длины цепи углеводородной части исследуемых спиртов (т.е. с увеличением гидрофобности) их ингибирующий эффект усиливается (рис. 1, кривая 3, 4). Снижение удельной активности протеиназы при действии метанола в концентрации до 5–6 % незначительно (рис. 1, кривая 1). Вследствие этого с целью ингибирования гидролиза субстрата в условиях хроматографии все эксперименты по подбору условий адсорбции и десорбции фермента проводили в водно-спиртовой среде.

Существенное влияние на связывание протеиназы из *Bacillus subtilis* СКБ 256 с биоспецифическим сорбентом в водно-спиртовой среде оказывает величина pH (рис. 2).

Степень связывания протеиназы с белковыми субстратами после пропитывания ими сорсилена максимальна при значениях pH от 7.0 до 8.0 (рис. 2а). В этих условиях в 1 г сорсилена, пропитанном гемоглобином, связывается 2.8–3.2 ед. актив-

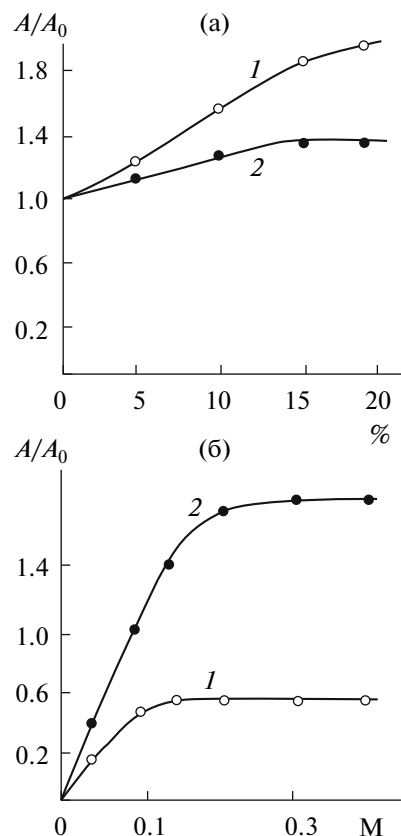


Рис. 3. Влияние состава элюирующего раствора на десорбцию протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256: а – этанол (%) в 0.1 М растворе NaCl; б – хлористый натрий (М) в 20%-ном этаноле; 1 – сорсилен–гемоглобин, 2 – сорсилен–цитохромом с. A/A_0 – активность фермента, десорбированного в присутствии и без этанола (A_0).

ности фермента, а в 1 г носителя, пропитанном цитохромом с – 1.6–1.8 ед. активности. При элюции сорбированного фермента 1 М NaCl было показано, что значительное количество фермента может быть десорбировано при значении pH среды 8.5–9.0 (рис. 2б). Выход фермента для сорбентов с цитохромом с в этих условиях составил 35% от общей активности нанесенного фермента, тогда как для сорбентов с гемоглобином эта цифра составила 38%.

Исследовали влияние концентрации хлористого натрия и этанола в составе элюирующего агента на процесс десорбции протеиназы из *Bacillus subtilis* СКБ 256 с биоспецифического сорбента (рис. 3).

Десорбция протеиназы может протекать при элюции раствором 0.1 М NaCl, содержащего различные концентрации этанола (рис. 3). При этом с сорсилен–цитохрома с десорбируется $A_0 = 0.65$ ед. акт. фермента (рис. 3а, кривая 2), а с сорсилен–гемоглобина $A_0 = 1.05$ ед. акт. фермента (рис. 3а, кривая 1). Как видно из кривых рис. 3а, присутствие в составе элюирующего агента 20% этанола увеличивает де-

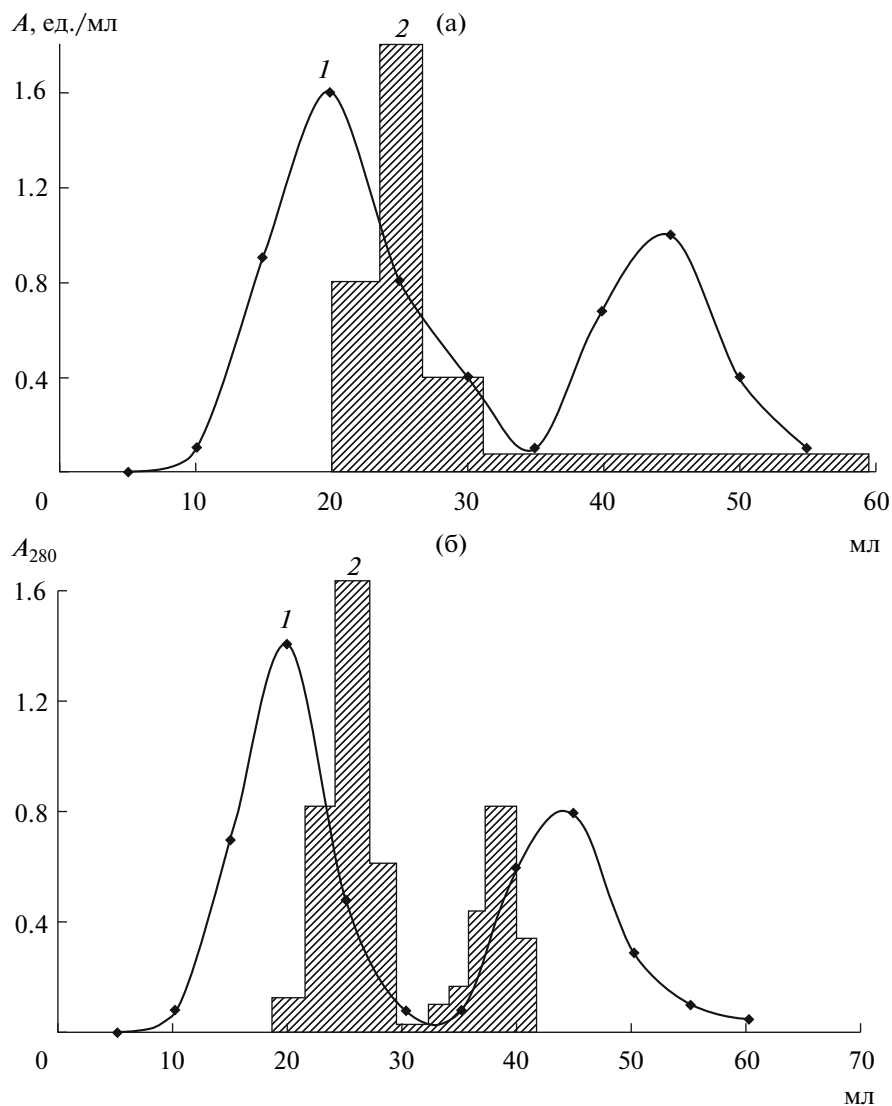


Рис. 4. Гель-фильтрация на сефадексе G-50 фракций (мл), элюированных с биоспецифического сорбента водным (а) и водно-спиртовым (б) растворами: 1 – белок, 2 – активность протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256.

сорбцию фермента с сорсилен–гемоглобина в 1.8 раза, а с сорсилен–цитохрома *c* – в 1.2 раза.

Значительное влияние на десорбцию фермента оказывает также величина ионной силы раствора. Из данных рис. 3б видно, что промывание сорбента 20%-ным раствором этилового спирта без NaCl не приводило к десорбции протеиназы, хотя при этом с сорбента удалялось более 70% балластных белков. Увеличение ионной силы способствует десорбции протеиназы при концентрации NaCl 0.2–0.3 М; кривая десорбции выходит на плато как в системе сорсилен–гемоглобина, так и сорсилен–цитохрома *c*. Существенное повышение выхода по активности характерно для сорбента сорсилен–гемоглобин. Для этого сорбента лучшим элюентом является 20%-ный спиртовой раствор, содержащий 0.4 М NaCl, а для сорси-

лен–цитохрома *c* – 20%-ный спиртовой раствор, содержащий 0.15 М NaCl.

Протеиназа из *B. subtilis* СКБ 256, полученная после биоспецифической обработки, достаточно чиста, но негомогенна (рис. 4), т. к. она элюируется двумя пиками при гель-фильтрации на сефадексе G-50. Эти данные подтверждают, что *B. subtilis* СКБ 256 синтезирует молекулярные формы протеиназ, различающиеся между собой по молекулярной массе, но имеющие одинаковое сродство к биоспецифическому сорбенту. Видно (рис. 3), что проведение десорбции в присутствии 20% этанола положительно сказывается на чистоте фермента. Количество примесей, которые обнаруживаются в элюате, значительно ниже, когда очистка происходит в присутствии этанола (рис. 4б).

Показано, что протеиназы из этого штамма представлены двумя формами, которые в нативном состоянии различаются своими молекулярными массами, т. к. разделяются при гель-фильтрации на сефадексе G-50 (рис. 4). Степень чистоты полученных белков и их молекулярную массу определяли с помощью электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в денатурирующих условиях, который показал для каждой из белковых фракций наличие одного полипептида с молекулярной массой около 27 кДа. Разделение этих фракций при гель-фильтрации, по-видимому, связано с содержанием небелковой части во фракции фермента с бóльшей молекулярной массой. Следует отметить, что молекулярные массы субтилизиноподобных протеиназ, выделенных из различных штаммов, спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, варьируют в пределах 27–32 кДа [1]. Классические субтилизины ВРН и Карлсберг имеют молекулярные массы 27.5 и 27.3 кДа соответственно [1]. Молекулярная масса субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых в стационарной фазе роста *B. amyloliquefaciens* Н2, равна 29 кДа. Для субтилизиноподобных протеиназ, *Bacillus intermedius* в ранней и поздней стационарных фазах роста показано, что их молекулярные массы составляют 32.5 и 28 кДа соответственно, однако имеют одинаковую молекулярную массу в денатурирующих условиях 27 кДа. Протеиназная активность обоих форм фермента чувствительна к этанолу и другим спиртам.

Изучено влияние рН среды, ионной силы и этанола на сорбцию протеиназ на биоспецифическом

сорбенте и десорбцию из него. Показано положительное влияние 20%-ного этанола на процесс десорбции протеиназ.

Таким образом, полученные результаты показывают, что биоспецифические сорбенты, синтезированные путем пропитывания сорсилена белками, могут быть использованы для очистки протеиназы из *B. subtilis* СКБ 256.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siezen R.J., Leunissen J.A.M. // Prot. Sci. 1997. V. 6. P. 501–523.
2. Ballinnger M.D., Wells J.A. // Handbook of Proteolytic Enzymes. N.Y.: Acad. Press. 1998. P. 284–294.
3. Rawlings N.D., Barrett A.J. // Biochem. J. 1993. V. 290. P. 205.
4. Rawlings N.D., Barrett A.J. // Method Enzymol. 1994. V. 244. P. 19.
5. Barrett A.J., Rawlings N.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1995. V. 318. P. 247.
6. Котлова Е.К., Иванова Н.М., Юсупова М.П., Воюшина Т.Л., Иванушкина Н.Е., Честухина Г.Г. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 1. С. 137–144.
7. Ражабов. У.Р. // Докл. АН Узбекистана. 2009. № 5. С. 83–85.
8. Балабан Н.П., Михайлова Е.О., Марданова А.М., Руденская Г.Н., Шарипова М.Р. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 4. С. 568–575.
9. Houmard J. // Eur. J. Biochem. 1967. V. 68. P. 621–628.
10. Budin J., Kubanek V. // Chem. Prum. 1978. V. 28. P. 589.

Purification of Extracellular Proteinases from *B. subtilis* SKB 256 by Biospecific Chromatography

U. R. Radzhabov, K. D. Davranov, and M. M. Rakhimov

Ulugbek National University of Uzbekistan, Tashkent, 100095 Uzbekistan

e-mail: k_davranov@mail.ru

Received December 12, 2009

Abstract—A simple and efficient method of preparing highly purified extracellular proteinases of *B. subtilis* B-1 (SKB 256) has been developed. A sorbent based on sorsilen impregnated with hemoglobin or cytochrome *c* has been synthesized for this purpose. A significant difference between the efficiency of hemoglobin and cytochrome *c* as biospecific ligands has been observed: the enzyme yield amounted to 40.6 and 65.6% of the total amount of enzyme adsorbed, respectively. The culture was shown to contain two major proteinase forms with different molecular masses that could be separated by chromatography on a Sephadex G-50 but gave only one band with MW 27 kDa upon denaturing electrophoresis in 12.5% PAG in the presence of 0.1% SDS. The influence of eluent pH, ionic strength and ethanol concentration on the sorption of the proteinases on the biospecific sorbent, as well as on the desorption from it, has been investigated. Positive influence of 20% ethanol on proteinase desorption has been demonstrated.

UDC 577.154.3:576.8

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ENDOXYLANASE FROM THE CULTURE BROTH OF *Bacillus cereus* BSA1

© 2011 A. Mandal, S. Kar, P. K. Das Mohapatra, C. Maity, B. R. Pati, and K. C. Mondal

Department of Microbiology, Vidyasagar University, Midnapur – 721102, West Bengal, India

e-mail: mondalkc@gmail.com

Received May 31, 2010

An extracellular xylanase from the fermented broth of *Bacillus cereus* BSA1 was purified and characterized. The enzyme was purified to 3.43 fold through ammonium sulphate precipitation, DEAE-cellulose chromatography and followed by gel filtration through Sephadex G-100 column. The molecular mass of the purified xylanase was about 33 kDa. The enzyme was an endoxylanase as it initially degraded xylan to xylooligomers. The purified enzyme showed optimum activity at 55°C and at pH 7.0 and remained reasonably stable in a wide range of pH (5.0–8.0) and temperature (40–65°C). The K_m and V_{max} values were found to be 8.2 mg/ml and 181.8 $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$, respectively. The enzyme had no apparent requirement of cofactors, and its activity was strongly inhibited by Cu^{++} , Hg^{++} . It was also a salt tolerant enzyme and stable upto 2.5 M of NaCl and retained its 85% activity at 3.0 M. For stability and substrate binding, the enzyme needed hydrophobic interaction that revealed when most surfactants inhibited xylanase activity. Since the enzyme was active over wide range of pH, temperature and remained active in higher salt concentration, it could find potential uses in biobleaching process in paper industries.

Xylan, the major component of hemicellulose, is present in plant cell wall as reserve carbon [1]. It is composed of a linear backbone of 1,4- β -linked-D-xylopyranosyl units that often has side chains of arabinosyl and methylglucuronol substituents [2]. This backbone can be broken into small oligomers by the action of microbial xylanase (endo 1-4- β -D xylan-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8). This microbial enzyme has tremendous industrial applications and along with cellulase and pectinase it occupies about 20% of global enzyme market [3]. The most important field for application of xylanase is in the process of biobleaching and biopulping. In these processes, xylanase hydrolyzes xylan and facilitates release of lignin from paper pulp and thereby reduces the use of bleaching agents like chlorinated substances [4, 5]. The application of xylanase in paper and pulp industries is not only cost effective but also it reduces about 40% pollution [2, 4]. Xylanase can also be applied in the saccharification of xylan from agro-wastes and agro-foods, and intensifies the preparation of bio-fuels, which is the potential use of this enzyme in modern biotechnology [6, 7]. The demand of pure xylanase is increasing day by day for production of rayon, cellophane, and several chemicals, such as cellulose esters like acetates, nitrates, propionates and butyrates, cellulose ethers like carboxymethyl cellulose, methyl and ethyl cellulose etc. [8].

A wide variety of microorganisms mainly bacteria and fungi are known to produce xylan degrading enzymes and among them members of Bacillaceae are more efficient for rapid production of the enzymes [9]. Previously we have isolated a potent xylanase producing bacteria *Bacillus cereus* BSA1 [10] from the garbage

dump soil of Midnapur, West Bengal, India. The organism was cultured in liquid media and the secreted enzyme was purified and some of its important properties were investigated and reported in this article.

MATERIALS AND METHODS

Source of xylanase. Previously isolated and identified a bacterial strain, *Bacillus cereus* BSA1 [10] has been used in this study for enzyme production. Production of xylanase was made in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of liquid media that composed of (%): xylan – 0.5; NaH_2PO_4 – 0.05; NH_4NO_3 – 0.1; MgSO_4 – 0.05 and NaCl – 0.5. In this enriched culture media 1% (v/v) freshly prepared inoculum was added and fermented in a rotatory shaker (120 rpm) at 35°C for 72 h. The cell-free supernatant after centrifugation (5000 g for 10 min) was used as the source of crude enzyme.

Purification and determination of molecular weight of xylanase. The culture supernatant was brought to 80% saturation of ammonium sulphate and after overnight preservation at 4°C, the precipitated enzyme was separated by centrifugation (10000 g for 30 min). Precipitate was dissolved in phosphate buffer (0.02 M, pH 7.0) and the enzyme solution was dialyzed against the same buffer for 48 h. The concentrated enzyme was loaded onto a DEAE cellulose column (3 × 20 cm) and active enzyme was eluted with a linear gradient of NaCl (0.25–1.5 M). Finally the partially purified enzyme was passed through Sephadex G-100 column (2 × 30 cm) and eluted at a flow rate of 0.2 ml/min with 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0). The fractions

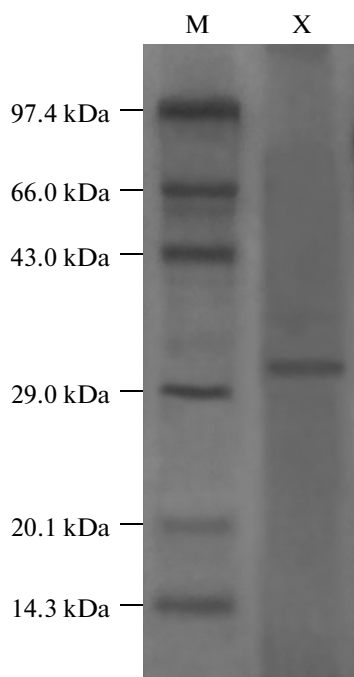


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of purified xylanase from *B. cereus* BSA1: M – molecular weight markers; X – purified xylanase.

with enzyme activity were collected, concentrated by lyophilization and used for further experiments.

To analyze the purity and to determine the molecular weight of the enzyme, the active fraction from Sephadex G-100 column was loaded onto sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (12.5%) electrophoresis (SDS-PAGE) following the method of Laemmli [11]. The molecular weight of the bacterial xylanase was determined by comparing its mobility with the medium range marker proteins (14.3–97.4 kDa).

Xylanase assay. Xylanase activity was measured by estimating released reducing sugar from the birch wood xylan (Fluka, USA) with 3,5-dinitrosalicylic acid [12]. The reaction mixture containing 0.4 ml phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0), 0.4 ml of 1% (w/v) xylan solution and 0.2 ml enzyme solution. The enzymatic reaction was carried out at 55°C for 30 min and then stopped by the addition of 1 ml of DNS (3%, w/v). The solution was then boiled in a water bath for colour development and the absorbency was measured at 540 nm (Systronics spectrophotometer 105, India) against the enzyme blank. Xylanase activity was determined by using a calibration curve of D-xylose (Sigma, USA).

One unit of xylanase activity (IU) was defined as the amount of enzyme required to produce 1 μmol of reducing sugars as xylose by hydrolyzing xylan per min under the above assay conditions.

Effect of temperature on enzyme activity and stability. To determine the optimum temperature for enzymatic activity, the catalytic reactions were carried out

at different temperatures ranging from 30 to 65°C in a controlled water bath.

Thermostability of the enzyme was studied by pre-incubating it (without substrate) at different temperature (40–65°C) and then residual activity was measured at standard assay conditions.

Effect of pH on enzyme activity and stability. The enzymatic reactions were carried out at different pH (4.0–10.0) by varying the type of reactant buffers like sodium acetate buffer (pH 4.0–5.0), phosphate buffer (pH 6.0–8.0) and carbonate – bicarbonate buffer (pH 9.0–10.0). Stability of the enzyme at different pH was studied by incubating the enzyme (without substrate) at different pH ranging from 4.0 to 10.0 for 24 h at 4°C and then activity was measured at optimum conditions.

Kinetic parameter. The K_m and V_{max} of the purified xylanase were determined by using different concentrations of birch wood xylan as substrate following the Lineweaver-Burk plot [13].

Effect of metal ions and additives on xylanase activity. Different metal ions and surfactants (1–10 mM) were added to the enzyme substrate reaction and studied their influences on the rate of catalysis.

Some of the common enzyme inhibitors like sodium azide, urea, sodium arsenate, iodoacetate, cysteine were also tested (1–10 mM) to study their effect on xylanase activity.

Salt tolerance. Salt stability of the enzyme was studied by incubating the enzyme with different concentration of NaCl (0.5–5.0 M) for over night at 4°C and then activity was measured at standard conditions.

Time course of xylan hydrolysis by purified xylanase. The periodic hydrolytic products of xylan by the action of purified xylanase were examined under the standard assay conditions. The hydrolytic products were examined in paper chromatography by using a solvent system of n-butanol: acetic acid: water (4 : 1 : 5).

RESULTS AND DISCUSSION

Purified microbial enzymes have attracted attention of biotechnological industries due to high selectivity and efficiency. The demand and applications of purified xylanase in the paper, food and chemical industries are increasing day by day.

In the present study xylanase from the culture broth of *B. cereus* BSA1 was purified by conventional methods like ammonium sulphate precipitation, DEAE-cellulose column chromatography and finally by gel filtration through Sephadex G-100 column. The efficiency of the purification processes was summarized in Table 1. The procedure followed in this study had made 3.43-fold purification with 22.15% yield. Kiddinamoorthy et al. [7] also reported 27% recovery of xylanase from *Bacillus* sp. GRE7 by using DEAE-cellulose column chromatography followed by Sephadex G-75 gel filtration.

Table 1. Purification steps of xylanase from *B. cereus* BSA1

Purification steps	Xylanase activity, IU	Protein, mg	Specific activity, IU/mg	Purification, fold	Yield, %
Culture broth	5200	186	27.45	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	2236	65	34.4	1.23	43
DEAE-cellulose column	1612	27	59.7	2.13	31
Sephadex G-100	1152	12	96	3.43	22.15

Homogeneity of the purified xylanase was tested by PAGE and subsequently gel staining by coomassie brilliant blue revealed only one band (Fig. 1). The apparent molecular mass of the xylanase was estimated to 33 kDa. Most of the xylanases from *Bacillus* sp. were reported to have the molecular weight within the range of 15 to 49 kDa [5].

The optimum temperature of xylanase from *B. cereus* BSA1 was found to be 55°C (Fig. 2a) and the enzyme was completely stable at 40°C, only loses 25% activity when incubated at 55°C for 1 h (Fig. 2b). Biobleaching with xylanase at high temperature improves pulp quality (degree of delignification) and brightness (bleaching effectiveness) [14]. Current research in the area of xylanase has been focused on developing new xylanase preparations that are able to work at high temperature (approximately 60°C) [15–17]. In this respect xylanase from *B. cereus* BSA1 can be qualified as a suitable enzyme in prebleaching process.

Xylanase from *B. cereus* BSA1 showed maximum activity at pH 7.0 (Fig. 2c). It was also stable at pH 7.0 and loosed only 18 and 28% activity at pH 5.0 and 8.0 respectively (Fig. 2d). This pH probably helped proper ionization of amino acid residues in the active site of enzyme to make strong bonding with the substrate [18]. This wide range of pH stability of the enzyme has placed it in high rank in relation to other xylanase from actinomycetes and bacteria [19–23].

The purified xylanase showed K_m and V_{max} of 8.2 mg/ml and 181.8 $\mu\text{mol}/(\text{mg min})$ respectively (Fig. 3). These kinetic parameters were found to be comparable to other reported to xylanase produced by *Bacillus* (Table 2).

Enzyme generally requires a specific activator for expressing their absolute catalytic power. Cofactor mediated activation is important in industry in order to achieve total catalytic efficiency. From this experiment it was found that calcium, magnesium and po-

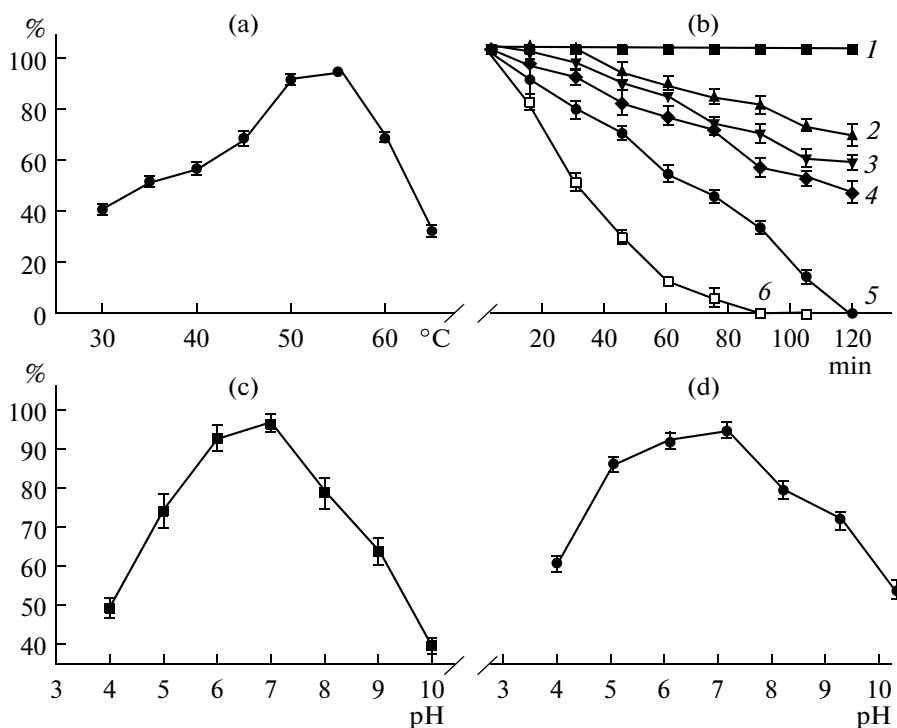


Fig. 2. Effect of temperature on activity (a), stability at 40 (1), 45 (2), 50 (3), 55 (4), 60 (5), 65°C (6) (b); and effect of pH on activity (c), stability (d) of purified xylanase from *B. cereus* BSA1.

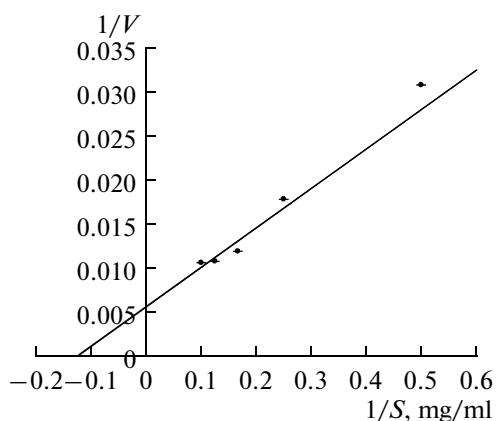


Fig. 3. Double reciprocal plot for determination of V_{max} and K_m of purified xylanase against birch wood xylan at 55°C.

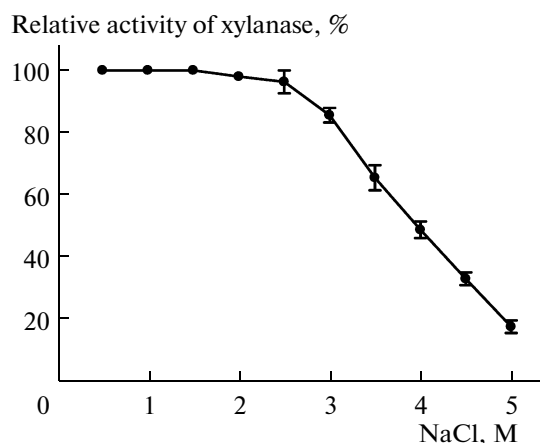


Fig. 4. Salt tolerance capability of xylanase from *B. cereus* BSA1.

tassium ions had small stimulatory effects, whereas zinc, manganese, ferrous, nickel and other heavy metals showed some inhibition on the activity of xylanase (Table 3). Sodium ion showed non-significant stimulation or inhibition. The catalytic inhibition by heavy metals may be due to their interaction with sulfhydryl groups in active site of the enzyme [24]. The enzymatic activity was not changed by the addition of EDTA, a metal chelating agent (result not incorporated). This result indicates that the enzyme needs no such metal

for its activation or it is devoid of any co-factor. Similar type of result had also been shown by Khasin et al. [25] in case of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6.

Common enzyme inhibitors prevented the catalytic efficiency of the purified xylanase at a considerable level (Table 4). The inhibition of xylanase activity was noted by addition of surfactants like SDS, tween 40, tween 60, tween 80 and tween 100 (Table 5). This indicated that hydrophobic interaction is essential for

Table 2. Comparative accounts of characters of xylanase of *B. cereus* BSA1 with some other bacterial xylanases

Characters	Xylanase from <i>B. cereus</i> BSA1	Xylanase from <i>Bacillus</i> sp. GRE7 [7]	Xylanase from <i>Arthrobacter</i> sp. MTCC 5214 [24]	Xylanase from <i>Acidobacterium capsulatum</i> [30]	Xylanase from <i>Bacillus</i> sp. BP-7 [31]	Xylanase from <i>B. polymyxa</i> CECT 153 [19]	Xylanase from <i>B. stearothermophilus</i> T-6 [25]	Xylanase from <i>Bacillus</i> sp. NCIM 59 [19]
Molecular weight, kDa	33	42	20	41	22–120	61	43	15.8, 35
Temperature for optimum activity, °C	55	70	100	65	55	50	75	50–60
pH for optimum activity	7	7	9	5	6	6.5	6.5	6
Temperature stability, °C	40	60–80	–	20–50	65	–	–	50
pH stability	5–8	5–11	7–8	3–8	8–9	–	–	7
K_m , mg/ml	8.2	2.23	0.9	3.5	–	17.1	1.63	1.58, 3.50
V_{max} , $\mu\text{mol}/(\text{mg min})$	181.8	296.8	3571	403	–	112	288	0.017, 0.742
Requirement of cofactors	Not required	Mn^{++} , Co^{++}	–	–	–	–	Not required	–
Inhibitory metal ion(s)	Cu^{++} , Hg^{++}	Cu^{++} , Fe^{++}	Hg^{++}	–	–	–	Zn^{++} , Cd^{++} , Hg^{++}	–
Salt tolerance	Upto 2.5 M of NaCl	–	–	–	–	–	–	–

Table 3. Effect of metal ions on activity of xylanase, from *B. cereus* BSA1

Salt	Relative activity of xylanase, %		
	1 mM	5 mM	10 mM
BaCl ₂	100	98	95
Na ₂ MoO ₄	93	98	100
KCl	94	102	106
MnCl ₂	100	98	85
ZnCl ₂	101	78	41
CuSO ₄	48	35	22
FeSO ₄	87	78	63
Ni(NO ₃) ₂	81	71	61
NaCl	100	102	102
CaCl ₂	98	102	105
HgCl ₂	42	35	15
MgCl ₂	95	93	104
Control	100		

Table 4. Effect of some inhibitors on activity of xylanase, from *B. cereus* BSA1

Inhibitor	Relative activity of xylanase, %		
	1 mM	5 mM	10 mM
Sodium azide	81	70	45
Urea	60	75	73
Sodium arsenate	67	41	36
Iodoacetate	39	33	25
Cysteine	101	98	79
Control	100		

folding of protein's structure or enzyme-substrate interaction [26]. Another cause could be the alteration in substrates moiety by reaction with surfactants [27].

The enzyme did not lose its original activity even at 2.5 M NaCl solution and retained about 74 and 20% of activity at 3.0 and 5.0 M of salt respectively (Fig. 4). This salt-tolerance property of the enzyme will be very useful

Table 5. Effect of surfactants on activity of xylanase, from *B. cereus* BSA1

Surfactant	Relative activity of xylanase, %		
	1 mM	5 mM	10 mM
SDS	51	34	28
Tween 40	84	70	35
Tween 80	61	51	40
Tween 100	39	22	20
Triton 100	53	31	23
Control	100		

in pollution control mechanisms for the treatment of hemicellulosic effluent in hard water [28].

Paper chromatographic study of the periodic hydrolysis of xylan by the purified xylanase was revealed that the enzyme initially splitted xylan into xylo-oligomers, which were further hydrolyzed into xylose (data not incorporated). This indicated that the studied xylanase was an endoacting enzyme. Our finding is also consistent with the finding of Khandeparkar and Bhosle [24] and Kar et al. [29]

The characteristic features of the purified xylanase from *B. cereus* BSA1 has been compared with the xylanases of other bacteria and represented in Table 2. It was found that some characters of the studied xylanase are more or less similar to other. The uniqueness of the xylanase from *B. cereus* BSA1 is that it can able to tolerate 2.5 M of NaCl.

In conclusion, it can be said that the purified extracellular xylanase from *B. cereus* BSA1 was found to be a novel as it is salt tolerant, wide range of pH tolerant and moderately thermo-tolerant enzyme and, these properties would make this enzyme potentially very effective for industrial applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to Vidyasagar University for financial assistance and to DBT, Govt. of India for providing BIF Centre in the Department of Microbiology.

REFERENCES

1. Waeonukul, R., Kyu, K.L., and Ratanakhanokchai, K., *Thai Society Biotechnology.*, 2007, vol. 8, no. 1, pp. 27–32.
2. Maheshwari, R., Bharadwaj, G., and Bhat, M.K., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64, pp. 461–488.
3. Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Trenzi, H.F., Jorge, J.A., and Amorin, D.S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 67, pp. 577–591.
4. Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G.S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, vol. 56, pp. 326–338.
5. Sa-pereria, P., Costa Ferreira, M., and Atres-Barros, M.R., *J. Biotechnol.*, 2002, vol. 94, pp. 256–275.
6. Burchhardt, G., and Ingram, L.O., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, vol. 58, no. 4, pp. 1128–1133.
7. Kiddinamoorthy, J., Anceno, A.J., Haki, G.D., and Rakshit, S.K., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 24, pp. 605–612.
8. Subramanian, S., and Prema, P., *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2002, vol. 22, no.1, pp. 33–64.
9. Bernier, R.J., Michel, D., Lubomir, J., and Michael G.P., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, vol. 46, pp. 511–514.
10. Mandal, A., Kar, S., Das Mohapatra P.K., Maity, C., Mondal K.C., and Pati, B.R., *J. Pure Appl. Microbiol.*, 2008, vol. 2, no. 1, pp. 150–160.
11. Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 6, pp. 80–685.
12. Miller, G.L., *Anal. Chem.*, 1959, vol. 31, pp. 426–428.

13. Lineweaver, H. and Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, vol. 56, pp. 658–66.
14. Bajpai, P., *Adv. Appl. Microbiol.*, 1997, vol. 43, pp. 141–194.
15. Haki, G.D. and Rakhshit, S.K., *Bioresour. Technol.*, 2003, vol. 89, pp. 17–34.
16. Sapre, M.P., Jha, H., and Patil, M.B., *Wold. J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 21, pp. 649–654.
17. Choudhury, B., Chauhan, S., Singh, S.N., and Ghosh, P., *Wold J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 22, pp. 283–288.
18. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M., *Principle of Biochemistry*, 1st Indian ed., Delhi: CBS Publishers and Distributors, 1993.
19. Garg, A.P., Roberts, J.C., and McCarthy, A.J., *Enz. Microb. Technol.* 1998, vol. 22, pp. 594–598.
20. Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M., and Hoondal, G.S., *Enz. Microb. Technol.*, 2000, vol. 27, pp. 459–466.
21. Virupakshi, S., Babu, K.G., and Naik, G.K., *Process. Biochem.*, 2005, vol. 40, pp. 431–435.
22. Batton, B., Sharma, J., and Kuhad, R.C., *Wold J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 22, pp. 1281–1287.
23. Morales, P., Madrarro, A., Flors, A., Sendra, J.M., and Gonzalez, J.A.P., *Enz. Microb. Technol.*, 1995, vol. 17, pp. 424–429.
24. Khandeparkar, R.D.S. and Bhosle, N.B., *Enz. Microb. Technol.*, 2006, vol. 39, pp. 732–742.
25. Khasin, A., Alchanati, I., and Shoham, Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, no. 6, pp. 1725–1730.
26. Protein Structure: a Practical Approach / Ed. Creighton T.E., Oxford: IRL Press 1989. ISBN 0199636168.
27. Grabskit, A.C. and Jeffries, T.W., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, no. 4, pp. 987–992.
28. Mondal, K.C., Banerjee, D., and Pati, B.R., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2001, vol. 47, pp. 263–267.
29. Kar, S., Mandal, A., Das Mohapatra, P.K., Mondal, K. C., and Pati, B.R., *Braz. J. Microbiol.*, 2006, vol. 37, pp. 462–464.
30. Inagaki, K., Nakahira, K., Mukai, K., Tamura, T., and Tanaka, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, vol. 62, pp. 1061–1067.
31. Lopez, C., Blanco, A., and Pastor, F.I.J., *Biotechnol. Lett.* 1998, vol. 20, pp. 243–246.

UDC 576.807

RAPID DIFFERENTIATION OF BACTERIAL SPECIES BY HIGH RESOLUTION MELTING CURVE ANALYSIS

© 2011 J. Šimenc^{*,**}, U. Potočnik^{*,**}

^{*}Center for Human Molecular Genetics and Pharmacogenomics, Medical Faculty, University of Maribor, SI-2000 Maribor, Slovenia

e-mail: uros.potocnik@uni-mb.si

^{**}Faculty of Chemistry and Chemical technology, University of Maribor, SI-2000 Maribor, Slovenia

Received April 12, 2010

Molecular based differentiation of various bacterial species is important in phylogenetic studies, diagnostics and epidemiological surveillance, particularly where unusual phenotype makes the classical phenotypic identification of bacteria difficult. Molecular approach based on the sequence of 16S ribosomal RNA gene analysis can achieve fast and reliable identification of bacteria. High resolution melting (HRM) curve analysis has been developed as an attractive novel technique for DNA sequence discrimination but its application for bacteria differentiation has not been well studied yet. We have developed HRM assay for differentiation of sixteen pathogenic or opportunistic bacterial species. Amplified partial 16S ribosomal RNA gene region between 968 and 1401 positions (*E. coli* reference numbering) was subsequently used in high resolution melting curve analysis of PCR products for bacterial species differentiation. Sixteen bacterial species were simultaneously discerned by difference plot of normalized and temperatures shifted melting curves, without need for spiking of DNA, hetero-duplexing experiments or application of several primer pairs. High resolution melting curve analysis of duplex DNA is simple, fast and reliable tool for bacterial species differentiation and may efficiently complement phenotypic identification of bacteria.

Culture independent, molecular based differentiation of various bacterial species is important in many situations; in phylogenetic studies of various microbial communities [1], as well as in various clinical settings [2]. Also, reliable identification and typing of bacteria is also needed for an epidemic surveillance [3, 4]. In microbiology laboratories, traditional methods for bacterial identification rely on phenotypic analyzes, which under optimal growth conditions correctly identify bacteria with known phenotype. On the other hand, when known bacteria are presented with unusual phenotype phenotypic identification may be difficult and error prone [5]. In these situations, molecular methods based on DNA sequence analysis could achieve fast and reliable identification of bacteria, and nonviable and dead bacteria could be detected, further fastidious and difficult-to-cultivate bacteria could be identified as well [5, 6].

In particular, PCR based strategies, targeting specific genetic regions [3, 4, 7] or by amplification of ribosomal genes by broad range primers [2, 5] have proven fast and reliable methods for molecular differentiation of bacteria. However for simultaneous differentiation of several bacterial species, methods targeting specific genetic regions require design of many specific primers or probes and are time consuming. On the other hand current methods using amplification of ribosomal genes using broad range primers need post-PCR processing step, with exposing PCR products, which increases risk of contamination.

Ribosomal genes are most often used genetic regions for bacterial phylogenetic relationship studies, since they are ubiquitous, and in evolutionary sense they are operating as molecular chronometer [8]. The 16S ribosomal RNA gene has been suggested as the most suitable for use in phylogenetic studies [9]. The gene has multi-domain structure with conserved and variable regions and is large enough for statistically valid measurements of phylogenetic relations [10], hence providing a basis for molecular differentiation of bacteria.

High resolution melting (HRM) curve analysis of DNA duplex is a method for DNA sequence discrimination; it is close-tube method and could be used directly after amplification without exposing PCR products [11]. The method has been initially introduced as genotyping method with continuous detection of fluorescent signal generated during melting of amplicons after real time PCR in a temperature gradient [12]. Differences between PCR products of the same size are displayed by the shape of their melting curves, which depend on base distribution, proportion of GC bases and concentration of PCR products [13]. Application of fluorescent DNA saturation dyes in HRM curve analysis, such as LC Green I dye, has further simplified and extended usefulness of HRM curve analyses, as marked primers or probes are no longer needed [11]. Also, LC Green I DNA dye has been reported advantageous over to conventional SYBR Green DNA dye, since it does not redistribute within DNA duplex during melting process from melted to coiled regions of DNA and it is

not prone to inhibit amplification at saturating concentrations [11, 14].

So far a limited number of studies evaluated the HRM curve analysis as a method for discrimination among bacterial species [15, 16], and suggested HRM as potential cost effective approach for bacterial differentiation [16]. However, approach introduced by Cheng et al. [16] still requires hetero-duplexing between the PCR products of the tested and reference bacterial species or the 2nd real-time PCR targeting a different region of the 16S ribosomal RNA gene for identification of closely related bacteria species. We hypothesized that HRM is particularly suitable for a single broad range primer pair amplification approach that could be used for simultaneous differentiation of several different bacterial species.

In this study, we therefore optimized PCR with a single broad range primer pair targeting 16S ribosomal RNA gene V6-V8 region between 968 and 1401 positions (*E. coli* reference numbering), with LC Green I DNA dye for subsequent HRM analysis of a panel of sixteen bacterial species which displayed different degrees of DNA sequence diversity, ranging from 69.7 up to 98.9% sequence identity in amplified 16S ribosomal RNA gene region.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and DNA isolation. A panel of fifteen type strains with ATCC numbers in parentheses and one clinical isolate was used in this study: *Staphylococcus epidermidis* (clinical isolate), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337), *Eubacterium lentum* (ATCC 43055), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610), *Proteus mirabilis* (ATCC 43071), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Bacteria were plated on sheep blood agar, incubated aerobically, or anaerobically at 37°C for 24 to 48 h, than 5 to 7 colonies was used for DNA extraction. DNA was extracted and purified from colonies with tissue modified procedure of Qiaamp DNA mini kit (Qiagen, Germany): colonies were picked up from a plate, suspended in 180 µl of ATL buffer and incubated with 20 µl of proteinase K (1 mg/ml) for 35 min at 56°C, without lysozyme or other cell wall degrading enzymes, than tissue protocol was followed. DNA concentration and purity was determined by photometry at 260 and 280 nm wavelengths.

PCR amplification and DNA sequencing. Extracted DNA was used as a template for 20 µl PCR reactions. PCR was preformed with 1 U of *Taq* polymerase (Fer-

mentas, Lithuania), 2.5 mM MgCl₂, 1x PCR buffer with ammonium sulphate, 0.4 mM of each deoxynucleoside triphosphate, deionized and autoclaved water, 0.5 µM of each primer f-968: 5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3' and r-1401: 5'-CGGTGTGTACAAGACC-3' amplifying V6-V8 portion of 16S ribosomal RNA [17]. The reaction was performed in a thermocycler (Biometra, Germany) as follows: 3 min at 95°C, 35 cycles of 40 s at 94°C, 40 s at 56°C, 40 s at 72°C, and 3 min at 72°C, and amplicons of 430 nucleotides were checked by agarose (1.5%) gel electrophoresis. Amplicons were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's instructions and were sent for sequencing to Macrogen, Inc, Korea (www.macrogen.com). Derived sequences were first compared with sequences available in the GeneBank, EMBL, and DDBJ databases using BLAST algorithm [18] through the National center for biotechnology information server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), and all positions showing differences from the best scoring reference sequences were visually inspected in the electropherogram and corrected if necessary. Then derived sequences were aligned with the Clustal X software package [19] and sequence identity matrix (Table 1) was constructed with the BioEdit software package (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/).

Sequence accession numbers. Sequences derived from this study were deposited in the EMBL nucleotide sequence database with accession numbers as follows: FM207087 to FM207089 and from FM207091 to FM207103. Six out of 16 sequences deposited to the EMBL from our study have to the best of our knowledge not been previously published: FM207094, FM207099, FM207096, FM207101, FM207103 and FM207100.

Real time PCR and high resolution melting curve analyses. Real time PCR and high resolution melting analyses were performed on the Roche LightCycler 480 instrument (Roche, Germany) in a 10 µl reactions with 0.25 U of GoTaq hot start polymerase (Promega, USA), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, deionized and autoclaved water, 1X LC Green I (Idaho Technology, USA), 1x PCR buffer with KCl, 0.2 µM of each primer f-968 and r-1401, amplifying V6-V8 portion of 16S rRNA gene [17], and 1 µl of bacterial DNA was added. Reactions were performed as follows: 2 min at 95°C, 40 cycles of 10 s at 95°C, 10 s at 58°C, and 10 s at 72°C. Each PCR analysis was performed in duplicate. For HRM curve analyses, amplicons were denatured at 95°C for 60 s, renatured at 40°C with ramp rate of 2.2°C/s and 60 s hold, than heated to 75°C with ramp rate 1°C/s and 1 s hold, and melted from 70 to 95°C with ramp rate 0.03°C/s and 35 fluorescence acquisitions per Celsius degree. Generated raw fluorescence curves were analyzed with LightCycler 480 software package. First absolute quantification was performed to check the amplification curves and the crossing point (Cp) value. For discerning of

Table 1. Sequence identity matrix for bacterial strains used in this study with pair-wise proportion of the sequence identity

Species	<i>S. marcescens</i>	<i>C. freundii</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. epidermidis</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>P. anaerobius</i>	<i>E. lentum</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. fragilis</i>
<i>S. marcescens</i>	ID	0.979	0.944	0.946	0.959	0.961	0.952	0.939	0.941	0.816	0.765	0.767	0.758	0.773	0.785	0.714
<i>C. freundii</i>	0.979	ID	0.939	0.941	0.939	0.956	0.933	0.931	0.924	0.802	0.769	0.761	0.762	0.776	0.788	0.715
<i>E. coli</i>	0.944	ID	ID	0.989	0.962	0.966	0.93	0.924	0.929	0.811	0.77	0.76	0.758	0.778	0.782	0.719
<i>S. flexneri</i>	0.946	0.941	0.989	ID	0.969	0.969	0.938	0.931	0.926	0.808	0.771	0.765	0.764	0.78	0.79	0.715
<i>E. cloacae</i>	0.959	0.939	0.962	0.969	ID	0.967	0.967	0.932	0.929	0.817	0.75	0.765	0.748	0.778	0.788	0.705
<i>S. typhimurium</i>	0.961	0.956	0.966	0.969	0.967	ID	0.945	0.931	0.926	0.821	0.772	0.76	0.772	0.788	0.792	0.718
<i>K. pneumonia</i>	0.952	0.933	0.966	0.969	0.967	0.945	ID	0.923	0.92	0.807	0.742	0.752	0.74	0.77	0.782	0.697
<i>Y. enterocolitica</i>	0.939	0.931	0.924	0.931	0.932	0.931	0.923	ID	0.959	0.826	0.769	0.77	0.762	0.781	0.79	0.72
<i>P. mirabilis</i>	0.941	0.924	0.929	0.926	0.929	0.926	0.92	0.959	ID	0.839	0.775	0.773	0.758	0.791	0.788	0.718
<i>P. epidermidis</i>	0.816	0.802	0.811	0.808	0.817	0.821	0.807	0.826	0.839	ID	0.795	0.828	0.773	0.831	0.848	0.725
<i>C. perfringens</i>	0.765	0.769	0.77	0.771	0.75	0.772	0.742	0.769	0.775	ID	ID	0.883	0.79	0.823	0.822	0.744
<i>P. anaerobius</i>	0.767	0.761	0.76	0.765	0.765	0.76	0.752	0.77	0.773	0.883	ID	ID	0.78	0.83	0.827	0.724
<i>E. lentum</i>	0.758	0.762	0.758	0.764	0.748	0.785	0.792	0.792	0.791	0.883	0.823	0.78	ID	0.785	0.792	0.723
<i>S. pyogenes</i>	0.773	0.776	0.778	0.78	0.778	0.788	0.77	0.781	0.791	0.823	0.823	0.83	0.785	ID	0.893	0.759
<i>E. faecalis</i>	0.785	0.788	0.782	0.79	0.788	0.792	0.782	0.79	0.788	0.822	0.822	0.827	0.792	0.893	ID	0.744
<i>B. fragilis</i>	0.714	0.715	0.719	0.715	0.705	0.718	0.697	0.72	0.718	0.725	0.744	0.724	0.723	0.759	0.744	ID

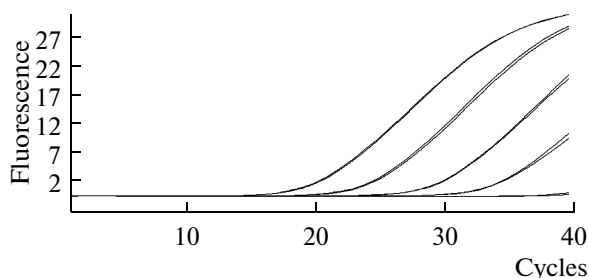


Fig. 1. Amplification curves for ten folds serial dilution of *E. coli* genomic DNAs with detection limit of 0.0002 ng/ μ l. Exponential growth of fluorescence signal is observed for each curve. Base line is a non-template control. Each sample was amplified in duplicate.

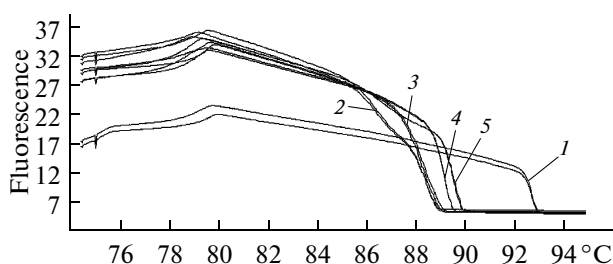


Fig. 2. Melting curves using raw fluorescence data. *Eubacterium lentum* (1), with melting transition at high temperature is clearly differentiated from the group of indiscernible bacteria; *Staphylococcus epidermidis* (2), *Peptostreptococcus anaerobius* (3), *Bacteroides fragilis* (4), *Enterobacter cloacae* (5). Each sample is presented in duplicate.

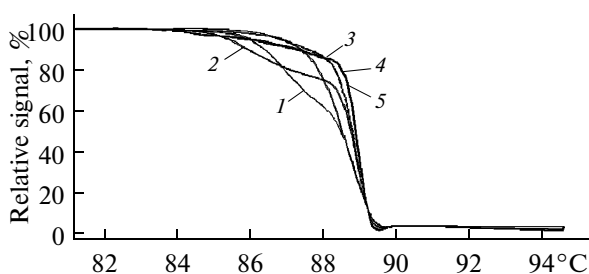


Fig. 3. Normalized fluorescence curves with 10% temperature shift. Examples for *S. epidermidis* (1), *E. cloacae* (2) and *B. fragilis* (4), with broad melting transition, *P. anaerobius* (3), *E. lentum* (5), with narrow melting transition. Each sample is presented in duplicate.

bacteria by sequence variation, gene scanning analysis was performed. Fluorescence curves were normalized and temperature shifts were done at 10% level of normalized fluorescence. In some cases, different temperature shifts were done if differentiation was not possible at 10% temperature shift. For discerning *E. cloacae* from *S. marcescens*, and *P. mirabilis*, temperature shift was done at 0% of normalized fluorescence, and for discerning *S. marcescens* and *P. mirabilis* temperature shift at 70% of normalized fluorescence. After nor-

malized and temperature shifted melting curves were obtained, first negative derivative of fluorescence over temperature was calculated ($-dF/dT$ vs. T), and fluorescence was presented as melting peaks with calculated melting temperatures (T_m) [13]. Then, in order to facilitate visual curve differentiation, fluorescence difference plots were created, by subtracting negative derivative of fluorescence for each species from negative derivative of fluorescence of *E. coli*, which was selected as reference base curve and plotted against temperature [11].

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, we amplified a V6-V8 portion of 16S ribosomal RNA gene region between 968 and 1401 positions (*E. coli* reference numbering) in 16 bacterial isolates for subsequent HRM curve analysis for simultaneous differentiation of bacterial species. We first determined detection limit of the HRM assay with *E. coli* genomic DNA serial ten fold dilutions, which as shown in Fig. 1, was up to 0.0002 ng/ μ l of bacterial DNA. We also checked reproducibility of the HRM assay with three independent amplifications for each bacterium from the 16 bacteria panel analyzed in this study and only minor differences were observed within replicates of species difference curves, indicating low inter-run variability.

When performed HRM curve analysis, raw melting data were generated during melting process. Raw melting data enabled only limited differentiation of bacterial species, i.e. melting curve of *E. lentum* is distinguished from others analyzed due to high temperature melting transition, the rest shown on Fig. 2, including *S. epidermidis*, *P. anaerobius*, *E. cloacae*, and *B. fragilis*, are indiscernible. In order to achieve better differentiation of bacterial species, raw fluorescence data should be normalized to join together curve shoulders and obtain relative values of fluorescence as percentage of the difference between minimum and maximum fluorescence values for each reaction [20]. In addition to normalization, temperature shifts of melting curves can improve differentiation and enables to distinguish even small genotype differences such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) [21]. We performed normalization of our raw fluorescence curves by first defining linear base lines before and after melting transitions of each sample, and by normalization of fluorescence intensity to values between 0 and 100%. In addition we performed temperature shifts to overlay the curves at 10% of normalized fluorescence (Fig. 3). Temperature shifts arrange melting curves positions on a temperature axis in a way to show relative temperature differences between curves rather than absolute temperatures [11]. Fig. 3, shows examples of normalized and temperature shifted curves for *S. epidermidis*, *E. cloacae*, *B. fragilis*, *P. anaerobius*, *E. lentum* which were all easily distinguished from each other by melting curve shape. We therefore suggest that normalization and temperature shift is absolutely necessary step in HRM raw data anal-

ysis for accurate differentiation between bacterial species. Using normalization and temperature shift of raw data we were able to simultaneously distinguish 16 different bacteria species into nine different groups. The first group included *S. epidermidis* and *K. pneumoniae*, the second group included *C. perfringens*, the third group included *E. faecalis*, *Y. enterocolitica* and *P. mirabilis*, the fourth group included *E. cloacae*, *B. fragilis*, *E. coli*, and *S. flexneri*, the fifth group included *S. marcescens*, the sixth group included *S. pyogenes*, the seventh group included *S. typhimurium*, the eighth group included *C. freundii* and *P. anaerobius*, the ninth group included *E. lentum*, however we were not able to distinguish bacteria from each other within a given group. Therefore, we were able to differentiate only five bacterial species out of sixteen; *C. perfringens*, *S. marcescens* and *S. pyogenes* and *S. typhimurium* and *E. lentum*.

The normalized and temperature shifted melting curve data from the same PCR amplification and HRM run could be further analyzed by calculating negative derivative of fluorescence over temperature ($-dF/dT$ vs. T), thus displaying melting temperatures peaks, expressed as T_m values, which in theory could provide simple differentiation of bacterial species. Using calculated T_m values, we were able to clearly distinguish eight groups of bacteria, however only four groups included a single bacterial species; *E. lentum*, *E. cloacae*, *B. fragilis* and *C. perfringens*. The rest of the groups were not able to distinguish the bacteria within a given group due to the overlapping T_m (Table 2). Therefore following bacteria were not distinguished from each other: *C. freundii*, *S. epidermidis*, *P. anaerobius* in the first group, *E. faecalis*, *Y. enterocolitica*, *S. marcescens*, *S. typhimurium* and *P. mirabilis* in the second group, *S. pyogenes* and *K. pneumoniae*, in the third group and *S. flexneri* and *E. coli* in the fourth group (Table 2). *E. coli* and *S. flexneri* are however, considered as the same species with 98.9% DNA sequence homology (Table 1). Figure 4 shows examples of melting peaks calculated by negative derivative of fluorescence over temperature ($-dF/dT$ vs. T) for *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica*, *S. typhimurium*, and *E. lentum*. Based on the melting peak calculation we were able to clearly distinguish only *E. lentum* from the rest of three bacteria shown in Fig. 4. We believe melting peak calculation of normalized data in HRM analysis only slightly improve bacterial species discrimination. Multi-copy organization of 16S ribosomal RNA genes in bacterial genomes with inter-operon variability [22] is probably reason why many different amplicons with slight sequence differences are produced during PCR reaction when same primers are used for amplification of 16S ribosomal RNA gene segment. Many amplicons slightly different in sequence, generated several hetero-duplexes during HRM and created complex melting patterns (Fig. 4) with asymmetric melting process and cumulative temperature peaks, similar as observed when melting longer heterozygous amplicons from diploid human genome [23].

Table 2. Average melting temperatures (T_m) expressed as °C from three independent experiments for bacterial species as first negative derivative of fluorescence over temperature ($-dF/dT$ vs. T) with standard deviations (STD)

Species	T_m	STD
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	88.018	0.30
<i>Escherichia coli</i>	89.555	0.05
<i>Bacteroides fragilis</i>	89.048	0.40
<i>Clostridium perfringens</i>	87.837	0.40
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	88.162	0.08
<i>Eubacterium lentum</i>	92.272	0.30
<i>Salmonella typhimurium</i>	88.987	0.05
<i>Shigella flexneri</i>	89.495	0.08
<i>Enterobacter cloacae</i>	89.438	0.04
<i>Serratia marcescens</i>	88.787	0.09
<i>Citrobacter freundii</i>	88.165	0.05
<i>Yersinia enterocolitica</i>	88.933	0.12
<i>Proteus mirabilis</i>	88.868	0.04
<i>Streptococcus pyogenes</i>	88.518	0.03
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	88.453	0.09
<i>Enterococcus faecalis</i>	88.963	0.09

A combination of two approaches for DNA melting curve data analysis performed in our study, first based on normalization and temperature shift and second based on T_m calculation of normalized and temperature shifted fluorescence, could clearly distinguish together only seven out of sixteen bacterial species analyzed in our study.

In order to further improve differentiation we performed further analysis of normalized and temperature shifted melting curve data by creating difference plots (Fig. 5). For this purpose, simultaneous fluorescence difference curves were created by subtracting first negative derivative of fluorescence ($-dF/dT$) curve for each normalized and temperature shifted bacterial curve

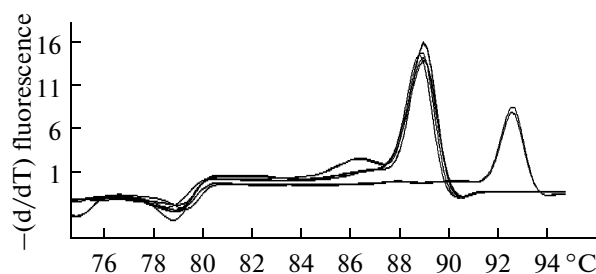


Fig. 4. Melting peaks ($-dF/dT$ vs. T) over temperature. Examples for *P. mirabilis*, *Y. enterocolitica*, *S. typhimurium*, which are clustered together and could not be separated by melting peaks, further right is clearly separated melting peak for *E. lentum*. Each sample is presented in duplicate.

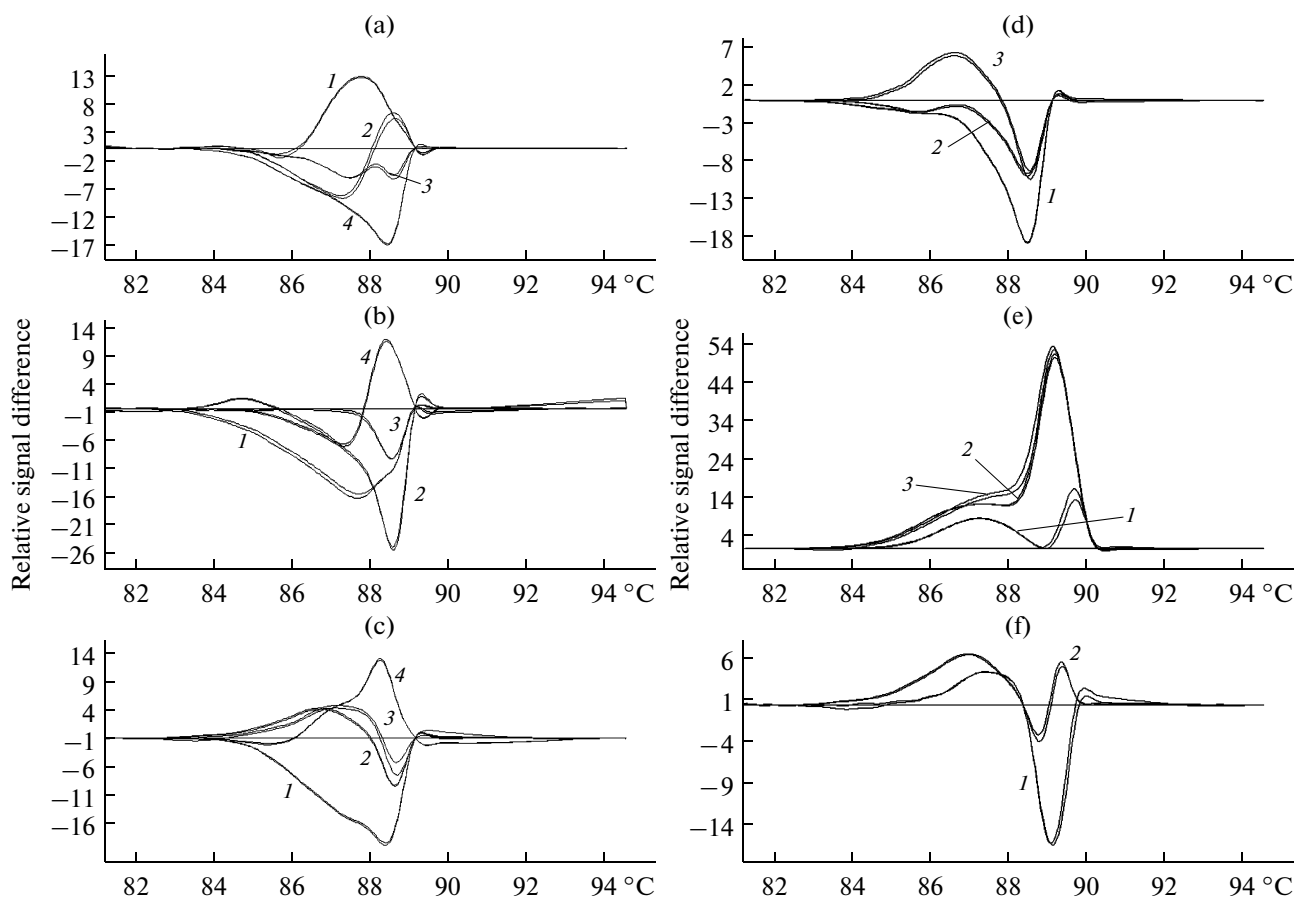


Fig. 5. Difference plot for (a) *S. epidermidis* (1), *P. anaerobius* (2), *C. perfringens* (3) and *B. fragilis* (4); (b) *S. typhimurium* (1), *E. lentum* (2), *S. flexneri* (3), and *C. freundii* (4); (c) *S. pyogenes* (1), *P. mirabilis* (2), *S. marcescens* (3), and *K. pneumoniae* (4), (d) *E. faecalis* (1), *Y. enterocolitica* (2) and *E. cloacae* (3), (e) *E. cloacae* (1), *S. marcescens* (2), and *P. mirabilis* (3). The *E. cloacae* is discernible from non-discernible *S. marcescens* and *P. mirabilis* with 0% temperature shift; (f) *Serratia marcescens* (1) and *P. mirabilis* (2) curves, with temperature shift of 70% are discernible. The *E. coli* was selected as reference species for plotting graph, and is represented with base line. Each species is presented in duplicate.

from *E. coli* base curve (linear) and plotted against temperature. The *E. coli* curve was arbitrarily selected as reference base curve for fluorescence difference plots, and by using *E. coli* as base curve it was easily to distinguish all 16 different bacteria species simultaneously, including the differentiation of *E. coli* from *S. flexneri* (Fig. 5b), despite their 98.9% sequence similarity (Table 1). For three pairs of most similar bacterial species, *E. cloacae* and *S. marcescens* pair, for *E. cloacae* and *P. mirabilis* pair, and for *S. marcescens* and *P. mirabilis* pair (Figs. 5a–5d), the difference plots were most difficult to be distinguished and therefore temperature shift was optimized. In addition to commonly used 10% temperature shift, 0 and 70% shifts were applied. Differentiation of *E. cloacae* from *P. mirabilis* and *S. marcescens* was most clearly achieved with 0% temperature shift (Fig. 5e). In contrast, differentiation of *P. mirabilis* and *S. marcescens* was most easily achieved with 70% temperature shift (Fig. 5f).

Taken together, difference plot with pre-selected base curve indeed enabled clear differentiation of all 16 bacterial species from each other, which in our experience makes this approach as the most suitable for bacteria differentiation. Also, we believe, melting peaks based differentiation could be a complement approach to difference plots, although further studies on heteroduplex formation are needed. The idea of using HRM analysis for bacteria differentiation has been initially introduced by Odell and coworkers [15]. They were able to differentiate three closely related *Mycobacterium* species (*M. chelonae*, *M. abscessus* and *M. immunogenum*) based on a few *hsp 65* gene polymorphisms. The Odell study proved HRM analysis as an attractive approach for bacterial species differentiation, and warranted differentiation of more comprehensive panel of bacteria. In the initial study for bacterial species differentiation with HRM curve analysis of partial 16S ribosomal gene amplicons, Cheng and colleagues were able to distinguish 25 different bacterial species with high accuracy;

however only for less than half of bacterial species analyzed they were able to use simple 1-step post-PCR high-resolution melting analysis protocol [16]. To distinguish among the rest of bacteria species analyzed including most closely related bacteria species such as a group of enteric bacteria, they needed to perform hetero-duplexing between the PCR products of the tested and reference bacterial species or the 2nd real-time PCR targeting a different region of the 16S rRNA gene [16]. In this study we show that using only a single pair of primers for amplification of 16S rRNA gene region between 968 and 1401 positions (*E. coli* reference numbering) is particularly useful for HRM analysis for bacterial discrimination. For this region as compared to other variable regions of the 16S ribosomal RNA gene, greater heterogeneity among bacterial species has been shown [24]. This genetic region of about 430 base-pairs has been widely used for profiling of diverse bowel bacterial communities [25, 26] however to the best of our knowledge; it has not been used yet for HRM curve analysis. Using our approach we were able to distinguish between 16 different bacterial species only by close-tube PCR reaction and HRM analysis without additional hetero-duplexing or spiking procedures required. In order to avoid misidentification, phenotypically well described bacterial ATCC type strains were used in this study. We believe bacterial type strains represent link between phylogeny and taxonomy, and could serve as standards when HRM curve analysis approach is applied for routine identification in microbiology laboratory.

For this study, we intentionally selected a panel of bacteria which displayed different degrees of DNA sequence diversity, ranging from 69.7% for *K. pneumoniae* and *B. fragilis* pair to 98.9% for *S. flexneri* and *E. coli* pair (Table 1). Since all sixteen bacterial species were simultaneously differentiated from each other based on unique HRM melting profiles, analyzed as difference plots (Fig. 5), we believe our HRM approach shows high fitness of the method.

In addition to species identification, HRM curve analysis based genotyping of bacterial strains is a challenge as well. Published studies for genotyping of *Bacillus anthracis* [3] and *Campylobacter jejuni* [4], based on amplification of the variable number of tandem repeats in genome, and subsequent HRM curve analysis were in a good agreement with length polymorphism of tandem repeats. However, for several close related strains, differing in a single nucleotide polymorphism, HRM curve analysis failed to differentiate genotypes [3, 4].

In this study we have shown that an approach for DNA sequence discrimination, HRM curve analysis, applied to partial bacterial 16S rRNA sequence after PCR amplification, is rapid and efficient method for differentiation of bacterial species. A new HRM scheme for simultaneous bacterial species differentiation presented in this study could efficiently complement phenotypic identification of known bacteria when displaying uncommon phenotype or alternatively could

enhance identification of new bacterial species. For routine identification, data base with type strains as standards should be created. For larger number of species in the data base, it may be necessary to analyze several different regions of 16S ribosomal gene.

Acknowledgements. Janez Šimenc was supported by World Federation of Scientists grant 2008-04-WFS-09-36.

REFERENCES

- Hugenholtz, P., Goebell, B.M., and Pace, R.N., *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, no. 18, pp. 4765–4774.
- Klaschik, S., Lehman, L.E., Raadts, A., Book, M., Gebel, J., Hoefft A., and Stuber, F., *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 2, pp. 512–517.
- Fortini, D., Ciammaruconi, A., De Santis, R., Fasanello, A., Battisti, A., D'Amelio, R., Lista, F., Cassone, A., and Carratoli, A., *Clin. Chem.*, 2007, vol. 53, no. 7, pp. 1377–1380.
- Price, E.P., Smith, H., Huygens, F., and Giffard, P.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 10, pp. 3431–3436.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., and Raoult, D., *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 10, pp. 3623–3630.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., and Tanaka, R., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 12, pp. 7220–7228.
- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G.T., and McMurdo, M.E.T., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 6, pp. 3575–3581.
- Woese, C.R., *Microbiol. Rev.*, 1987, vol. 51, no. 2, pp. 221–271.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J., *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, no. 2, pp. 697–703.
- Clarridge, III J.E., *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, vol. 17, no. 4, pp. 840–862.
- Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandervest, J.G., and Pryor, R.J., *Clin. Chem.*, 2003, vol. 49, no. 6, pp. 853–860.
- Lay, M.J. and Wittwer, C.T., *Clin. Chem.*, 1997, vol. 43, no. 12, pp. 2262–2267.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T., *Anal. Biochem.* 1997, vol. 245, pp. 154–160.
- Herrmann, M.G., Durtschi, J.D., Bromley, L.K., Wittwer, C.T., and Voelkerding, K.V., *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 3, pp. 494–503.
- Odell, I.D., Cloud, J.L., Seipp, M., and Wittwer, C.T., *Am. J. Clin. Pathol.*, 2005, vol. 123, pp. 96–101.
- Cheng, J.C., Huang, C.L., Lin, C.C., Chen, C.C., Chang, Y.C., Chang, S.S., and Tseng, C.P., *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 11, pp. 1997–2004.
- Nuebel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Weisshuber, A., Amann, R.I., et al., *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, no. 19, pp. 5636–5643.
- McGinnis, S. and Madden, T.L., *Nucl. Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp. W20–W25.

19. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmoughin, F., and Higgins, D.G., *Nucl. Acids Res.*, 1997, vol. 25, no. 24, pp. 4876–4882.
20. Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., and Rasmussen, R.P., *BioTechniques*, 1997, vol. 22, no. 1, pp. 130–138.
21. Reed, G.H. and Wittwer, C.T., *Clin. Chem.*, 2004, vol. 50, no. 10, pp. 1748–1754.
22. Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S., Bult, C., and Fieds, C., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, vol. 45, no. 3, pp. 595–599.
23. Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Reed, G.H., Proyor, R.J., Chen, J., and Wittwer, C.T., *Clin. Chem.*, 2003, vol. 49, no. 3, pp. 396–406.
24. Yu, Z. and Morrison, M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 8, pp. 4800–4806.
25. Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., and Dore, J., *Gut*, 2003, vol. 52, no. 2, pp. 237–242.
26. Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., and de Vós, W.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, vol. 68, no. 7, pp. 3401–3407.

УДК 577.112:579.861.043:535.31

ПЕРЕКРЕСТНАЯ АНТИСТРЕССОВАЯ ЗАЩИТА УФ-ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ УЧАСТИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ

© 2011 г. Л. И. Воробьева*, Е. Ю. Ходжаев*, М. М. Вустин**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899
e-mail: nvvorobieva@mail.ru

**ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Поступила в редакцию 30.09.2010 г.

Изучалось антистрессовое действие внеклеточных пептидов на УФ-облученные клетки дрожжей различных филогенетических групп. Показано, что дрожжи разных экологических и систематических групп, подверженные УФ-облучению летальной интенсивности, проявляют защитное и реактивирующее действие при участии внеклеточных пептидов. Наибольшая защитная активность обнаружена у пептидных реактивирующих факторов (РФ) пищевых дрожжей — *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* и *Candida utilis*; наибольшая реактивирующая активность — у факторов из указанных культур, а также из *Debariomyces hansenii*. Показано перекрестное защитное и реактивирующее действие РФ дрожжей, принадлежащих к разным систематическим группам. Перекрестная защита увеличивалась в 2–3 раза после предварительного облучения факторов реактивации УФ-светом (активация), в отличие от их реактивирующего действия.

Реакция на стрессы у прокариотных и эукариотных микроорганизмов и у высших эукариот имеет большое сходство в отношении индукции классического механизма, включающего образование внутриклеточных сигнальных (сенсорных) молекул (часто в виде поврежденной ДНК). Однако микроорганизмы, обитающие в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, обладают дополнительными средствами антистрессовой защиты с использованием внеклеточных химических сенсоров.

В настоящее время известно, что большая часть стрессовых ответов микроорганизмов реализуется с участием внеклеточных сенсорных факторов [1]. Индукция, опосредованная внеклеточными метаболитами, важна для быстрого ответа на внезапное стрессовое воздействие, что особенно необходимо для организмов, подвергающихся стрессам летальной интенсивности. Кроме того, диффундирующие сенсорные молекулы выполняют превентивную роль в популяции микроорганизмов, предупреждая клетки о возможной угрозе жизни.

Основополагающие исследования образования и защитного действия внеклеточных пептидных факторов в условиях различных стрессов на примере *Escherichia coli* были выполнены Р. Роубери [2]. В наших работах впервые было показано, что различные штаммы *E. coli*, *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* и низшие эукариоты — дрожжи в обычных условиях роста выделяют в среду вещества пептидной природы не только защитного, но и реактивирующего действия (реактивирующий фак-

тор, РФ) [3–5]. РФ присутствуют в культуральной жидкости (КЖ) и функционируют в ничтожных количествах, а их активность, по-видимому, обусловлена мембранным механизмом действия, о чем свидетельствует концентрационная зависимость и зависимость от состояния цитоплазматической мембраны [6]. Показано участие сенсорных белковых экзометаболитов в защите и реактивации клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces lactis* и перекрестное действие РФ дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *L. casei* [7].

В настоящей работе мы расширили круг изучаемых дрожжей, включив в число объектов представителей других семейств и обитателей различных экологических, имеющих важное практическое применение.

Цель работы — изучение защитной и реактивирующей по отношению к УФ-излучению активности представителей различных систематических и экологических групп дрожжей.

МЕТОДИКА

Объекты исследований. В работе изучались дрожжи *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1200, *K. lactis* ВКПМ Y-1174, *C. utilis* ВКПМ Y-25, *D. hansenii* ВКПМ Y-1007, *A. shoenii* ВКПМ Y-2895, *R. glutinis* ВКПМ Y-993, *Phaffia rhodozyma* ВКМП Y-1657, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), *Y. lipolytica* и *E. mag-nusii*, предоставленные д.б.н. Р.А. Звягильской.

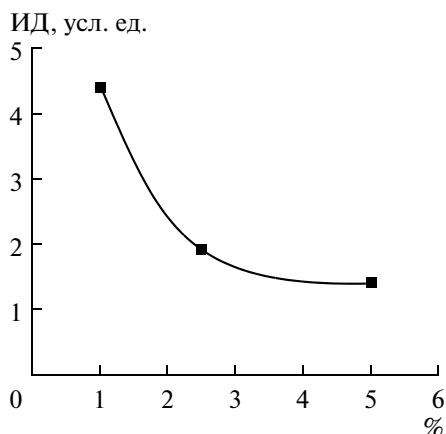


Рис. 1. Защитный эффект активированного РФ из *S. cerevisiae*, выделенного из культур того же штамма, выращенных в присутствии разных концентраций глюкозы (%).

Аскомицетные дрожжи *Debariomyces hansenii* выделены из муравейника. Это соле- и кислотоустойчивые дрожжи, встречаются в морской воде, вареньях, сиропах и джемах, играют отрицательную роль в рассолах. Активные продуценты липидов, протеаз и инулиназ, хорошо усваивают лактозу и образуют большую биомассу при росте на молочной сыворотке [8]. Эти дрожжи давно используются в пищевой промышленности при приготовлении сыровяленых колбас [9].

Arthroascus shoenii — аскомицетовые дрожжи семейства Saccaromycetaceae, часто выделяются из сокоотечений дуба. *Rhodotorula glutinis* — аспорогенные красные дрожжи базидиомицетного аффинитета семейства Стуртоссасеае, типичные фитобионты, обитают на поверхности листьев различных растений. Служат источниками внеклеточных протеаз, L-аспарагиназы (антираковое средство) и каротиноидов [8]. С использованием этих дрожжей разработан способ получения фенилаланинаммиаклиазы — фермента, участвующего у растений в синтезе фитоалексинов, защищающих растения от стрессов [9].

Phaffia rhodozyma — базидиомицетовые красные дрожжи, эпифиты, выделяются только из сокоотечений деревьев, максимальная температура роста 25°C. Единственные дрожжи, способные синтезировать каротиноид астаксантин, широко используемый в медицине, косметике и как кормовая добавка при выращивании лососевых рыб.

Yarrowia lipolytica, также дрожжи аскомицетового аффинитета семейства Dipodascaceae, выделены с поверхности экскретирующих соль листьев пустынных растений Африки. Осмо-, соле- и щелочустойчивый штамм дрожжей, в отличие от других представителей этого вида, способен к быстрому

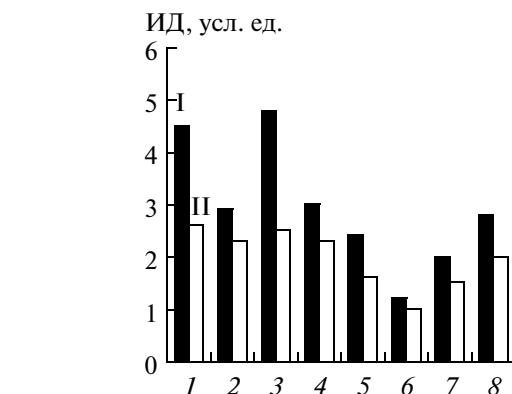


Рис. 2. Защитный (I) и реактивирующий (II) эффекты РФ, синтезированных различными штаммами дрожжей, на УФ-облученные клетки тех же культур: 1 — *S. cerevisiae*; 2 — *C. utilis*; 3 — *K. lactis*; 4 — *D. hansenii*; 5 — *R. glutinis*; 6 — *A. shoenii*; 7 — *P. rhodozyma*; 8 — *Y. lipolytica*. Во всех экспериментах РФ предварительно активировался облучением УФ-светом (доза — 146 Дж/м²).

росту при щелочных значениях pH. Предложены в качестве продуцентов лимонной кислоты из углеводородов нефти, являются хорошим продуцентом липаз и протеаз [10].

Endomyces magnusii, аскомицеты, дрожжеподобные грибы, способные образовывать истинный мицелий, облигатные паразиты грибов.

Дрожжи выращивали в колбах на 500 мл, содержащих 100 мл среды, на качалке (200 об/мин) при 28°C в аэробных условиях на 4-баллинговом солодовом сусле (pH 6.5) и в синтетической среде следующего состава (%): (NH₄)₂SO₄ — 0.5, KH₂PO₄ — 0.1, MgSO₄ · 7H₂O — 0.05, CaCl₂ · 2H₂O — 0.01, NaCl — 0.01, глюкоза — 1.0, дрожжевой экстракт — 0.1. Оптическую плотность растущей культуры дрожжей измеряли нефелометрически (ФЭК 56 ПМ, Россия, кюветы 3 мл, фильтр № 6). Использовали культуру конца экспоненциальной фазы роста.

Клетки дрожжей отделяли от среды центрифугированием (10000 g, 20 мин), промывали в 0.05 M Na-фосфатном буфере (pH 7.0) и суспендировали в том же буфере до оптической плотности 0.8. Полученные клеточные суспензии служили объектами стрессорных воздействий. Отделенную от клеток КЖ использовали в качестве источника РФ. Численность жизнеспособных клеток в суспензиях дрожжей определяли по титру колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) после высева 10^N-кратно разведенных суспензий на соответствующие плотные среды с 1.5% агаром. Для посева использовали микрометод с внесением аликвоты суспензий объемом 5 мкл в шестикратной повторности для каждого разведения. Посевы инкубировали при 30°C (*P. rhodozyma* при 22°C) в течение 48 ч.

Определение защитной и реактивирующей активности РФ. Суспензии клеток дрожжей подвергали

Таблица 1. Защитное и реактивирующее действие РФ из *D. hansenii* и *R. glutinis* на УФ-облученные клетки той же культуры

Условия эксперимента	Численность жизнеспособных клеток $\times 10^5$ КОЕ/мл	Выживаемость, %	Индекс деления
<i>D. hansenii</i>			
Защита			
Интактные клетки	80 \pm 5.1	100	–
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.010 \pm 0.001	0.013	1.0
с РФ _{акт} , затем облученные	0.030 \pm 0.002	0.038	3.0
Реактивация			
Интактные клетки	70 \pm 3.9	100	–
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.012 \pm 0.001	0.017	1.0
с РФ _{акт}	0.028 \pm 0.002	0.040	2.3
<i>R. glutinis</i>			
Защита			
Интактные клетки	160 \pm 13.1	100	–
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.014 \pm 0.001	0.009	1.0
с РФ _{акт} , затем облученные	0.034 \pm 0.002	0.021	2.4
Реактивация			
Интактные клетки	120 \pm 7.8	100	–
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.036 \pm 0.003	0.030	1.0
с РФ _{акт}	0.056 \pm 0.003	0.047	1.6

УФ-облучению на установке из двух параллельно смонтированных ламп БУВ-15 (Россия) мощностью 30 Вт, с эмиссией в области 253.7 нм. Для подбора доз облучения проводили предварительные эксперименты для установления зависимости доза–ответ. В клеточные суспензии вносили препараты РФ в стандартном соотношении (1 : 1 об./об.) до или после облучения для определения защитной и реактивирующей активности, соответственно, и инкубировали в течение 15 мин при 30°C. В ряде экспериментов препараты РФ подвергали УФ-облучению или нагреванию перед внесением в суспензии клеток в соответствии с ранее описанными методиками [11].

В некоторых экспериментах РФ из ряда штаммов, активированных УФ-облучением, предварительно инкубировали с протеиназой К (50 мкг/мл) в течение 1 ч при 37°C в присутствии Трис-буфера (20 мМ) – ЭДТА (5 мМ), pH 8.0.

Эффективность защитного или реактивирующего эффекта оценивали по соотношениям титров

КОЕ в суспензиях, инкубированных с РФ до или после УФ-облучения, к титру КОЕ в облученной культуре без пред- и постинкубации. При оценках числа КОЕ принимали в расчет разбавление исходной клеточной суспензии препаратом РФ.

Статистическая обработка. В таблицах приведены средние арифметические величины из 3 независимых экспериментов и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Чувствительность клеток дрожжей к УФ-облучению снижалась в следующем порядке: *A. shoenii*, *D. hansenii*, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *C. utilis*, *P. rhodozyma*, *E. magnusii*, *Y. lipolytica*, *R. glutinis*. Наибольшей устойчивостью обладали красные дрожжи *R. glutinis*, *P. rhodozyma* за счет высокого содержания каротиноидных пигментов и *Y. lipolytica*, выделенная из мест с высокой солнечной радиацией. К дрож-

Таблица 2. Защитное и реактивирующее действие РФ из *A. shoenii* и *P. rhodozyma* на УФ-облученные клетки той же культуры

Условия эксперимента	Численность жизнеспособных клеток $\times 10^5$ КОЕ/мл	Выживаемость, %	Индекс деления
<i>A. shoenii</i>			
Защита			
Интактные клетки	17 \pm 0.59	100	—
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.010 \pm 0.001	0.059	1.0
с РФ _{акт} , затем облученные	0.012 \pm 0.001	0.071	1.2
Реактивация			
Интактные клетки	15 \pm 0.41	100	—
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.011 \pm 0.002	0.073	1.0
с РФ _{акт}	0.011 \pm 0.001	0.073	1.0
<i>P. rhodozomat</i>			
Защита			
Интактные клетки	100 \pm 5.4	100	—
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.012 \pm 0.001	0.012	1.0
с РФ _{акт} , затем облученные	0.024 \pm 0.002	0.024	2.0
Реактивация			
Интактные клетки	70 \pm 3.8	100	—
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.022 \pm 0.002	0.031	1.0
с РФ _{акт}	0.034 \pm 0.002	0.049	1.5

Таблица 3. Защитное и реактивирующее действие РФ из *Y. lipolytica* на УФ-облученные клетки той же культуры

Условия эксперимента	Численность жизнеспособных клеток $\times 10^5$ КОЕ/мл	Выживаемость, %	Индекс деления
Защита			
Интактные клетки	90 \pm 4.3	100	—
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.008 \pm 0.001	0.009	1.0
с РФ, затем облученные	0.022 \pm 0.001	0.024	2.8
с РФ _{акт} , затем облученные	0.022 \pm 0.001	0.024	2.8
Реактивация			
Интактные клетки	88 \pm 4.8	100	—
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.006 \pm 0.001	0.007	1.0
с РФ	0.012 \pm 0.001	0.014	2.0
с РФ _{акт}	0.012 \pm 0.001	0.014	2.0

Таблица 4. Перекрестное действие РФ из некоторых штаммов дрожжей на УФ-облученные клетки тех же культур

Тест-культура	Источник РФ					
	<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. utilis</i>		<i>K. fragilis</i>	
	РФ	РФ _{акт}	РФ	РФ _{акт}	РФ	РФ _{акт}
Защита						
<i>S. cerevisiae</i>	—	—	1.7	2.6	1.5	4.2
<i>C. utilis</i>	1.3	2.3	—	—	1.7	2.9
<i>K. fragilis</i>	1.7	4.2	1.6	3.3	—	—
Реактивация						
<i>S. cerevisiae</i>	—	—	2.0	2.0	2.4	2.3
<i>C. utilis</i>	1.5	1.6	—	—	1.6	1.7
<i>K. fragilis</i>	2.1	2.1	1.8	1.9	—	—

жам, устойчивым к УФ-облучению, относятся также дрожжеподобные грибы *E. magnusii*.

В предварительных экспериментах для всех изучаемых дрожжей было подобрано время экспозиции, при котором выживаемость находилась в пределах 0.01–0.05%. При такой выживаемости, как было ранее показано на модельной тест-культуре *S. cerevisiae*, РФ проявлял максимальный защитный и реактивирующий эффекты [11]. Чем объясняется такой характер зависимости? Известно, что репарационные системы в клетках присутствуют в низких концентрациях, особенно ферменты репарации ДНК [12]. При слабом облучении (высокая выживаемость) индуцируются ферменты расщепления димеров тимина (главный продукт УФ-облучения) и активируются ферменты репарации. Летальные дозы УФ-облучения приводят к образованию такого количества димеров, при котором ферменты репарации подавлены, и именно такие клетки становятся наиболее восприимчивыми к внешним факторам реактивации [13].

Оптимальное содержание глюкозы для образования РФ подбирали при культивировании дрожжей на синтетической среде. Для ряда ферментов была показана прямая зависимость синтеза белка от содержания цАМФ, уровень которого повышался при снижении концентрации глюкозы [14]. Из рис. 1 видно, что при снижении содержания глюкозы с 5 до 1% образование РФ клетками дрожжей заметно увеличивалось.

Из данных табл. 1–3 видно, что защитное и реактивирующее действие проявляли РФ дрожжей из разных экотопов, при этом очень слабое у *A. schoenii* и наиболее сильное у *Y. lipolytica* и *D. hansenii*. Наиболее высокий защитный эффект РФ, обнаруженный у *Y. lipolytica*, можно отчасти объяснить его высокой устойчивостью к другим стрессам (см. выше) и существованием перекрестной стрессовой устойчивости [13].

На рис. 2 представлены данные по сравнительному защитному и реактивирующему действию РФ изученных дрожжей, откуда видно, что защитное действие превышало реактивирующее. Наибольшей эффективностью обладал РФ близких в систематическом отношении пищевых дрожжей *S. cerevisiae* и *K. lactis*. У дрожжей, выделенных из природных экотопов, особенно окрашенных штаммов *R. glutinis* и *P. rhodozyma*, действие РФ было менее выражено, по-видимому, в связи с наличием других природных защитных систем, например каротиноидов. Кроме того, в тех стрессовых условиях, в которых фактически обитают эти дрожжи в природе, в первую очередь, снижается синтез рРНК и рибосомных белков [15], поскольку синтез рибосом связан с большими энергетическими затратами. Более слабый рост дрожжей, выделенных из экстремальных экотопов, наблюдался и в наших исследованиях.

Ранее сообщалось о перекрестном действии РФ дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *L. casei*, а в составе РФ этих микроорганизмов были обнаружены пептиды с идентичной молекулярной массой (ММ) [16]. Предварительная обработка РФ протеиназой К приводила к существенному снижению реактивирующей активности: РФ из *S. cerevisiae* терял ее на 86%, РФ из *K. lactis* – на 67%, РФ из *C. utilis* – на 89% (данные не приведены). Можно сделать вывод о том, что реактивирующая активность преимущественно обусловлена факторами белковой природы.

В настоящем исследовании было показано перекрестное защитное и реактивирующее действие РФ разных дрожжей (табл. 4). Причем перекрестная защита увеличивалась в 2–3 раза при активации (облучение) РФ, которая, впрочем, не влияла на реактивирующее действие. Наблюдение свидетельствует о нестрогой специфичности РФ, образованных *S. cerevisiae*, *K. lactis* и *C. utilis*, которая еще больше снижалась после их облучения. Возможно, при этом происходило изменение конфор-

мации пептида или каких-то его групп, что облегчало его узнавание и связывание с рецепторными белками цитоплазматической мембраны. В случае реактивации облученных клеток может происходить модификация не только сенсорных молекул, но и рецепторов, что может снижать их сродство.

В работе были использованы штаммы, имеющие разнообразное биотехнологическое применение. При процессинге (например, при получении этанола) дрожжи подвергаются воздействию ряда стрессорных факторов. Использование природных протекторных факторов может увеличить выход полезных продуктов за счет снижения ингибирующего действия стрессоров на клетки продуцентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 2003. V. 86. № 4. P. 313–332.
2. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 2001. V. 84. № 3. С. 205–233.
3. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 4. С. 482–487.
4. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М., Брюханов А.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 2. С. 202–207.
5. Воробьёва Л.И., Федотова А.В., Ходжаев Е.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 1–7.
6. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Мулюкин А.Л., Торопыгин И.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 5. С. 544–549.
7. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 2. С. 191–197.
8. Квасников У.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. Киев: Наукова Думка, 1991. С. 300.
9. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. С. 122.
10. Walker G.M. // The Desk Encyclopedia of Microbiology. Ed. Schaechter M. N.Y.: Academic Press, 2009. P. 1174–1188.
11. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 176–180.
12. Booth I.R. // Int. J. Food Microbiol. 2002. V. 78. № 1–2. P. 19–30.
13. Rowbury R.J. // J. Appl. Microbiol. 2001. V. 90. № 2. P. 677–695.
14. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. С. 107–108.
15. Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. // Mol. Biol. Cell. 2000. V. 11. № 12. P. 4241–4257.
16. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 2. С. 171–175.

Antistress Cross-Protection of UV Irradiated Yeast Cells with Participation of Extracellular Peptide Factors

L. I. Vorob'eva^a, E. Yu. Khodzhaev^a, and M. M. Vustin^b

^a Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

e-mail: nvvorobieva@mail.ru

^b Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia

Received September 30, 2010

Abstract—Antistress effect of extracellular peptides on UV irradiated yeast of different phylogenetic groups was studied. Yeast from different ecotopes and taxonomic groups exposed to UV radiation of a lethal intensity showed a protective effect and reactivating effect with participation of extracellular peptides. The highest protective activity was found in peptide reactivation factors (RFs) of bakery yeast—*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, and *Candida utilis*; the highest reactivating activity was exhibited by factors of the above-mentioned cultures and *Debariomyces hansenii*. Cross-protective and reactivating effects of RFs of yeast belonging to different taxonomic groups were demonstrated. Cross-protection increased two to three times after preexposure of reactivation factors to UV light (activation) in contrast to their reactivating effect.

УДК 547.92, 579.873.2

ПОЛУЧЕНИЕ 3,17-ДИКЕТОСТЕРОИДОВ ИЗ СОЕВЫХ СТЕРИНОВ С ПОМОЩЬЮ АКТИНОБАКТЕРИЙ *Mycobacterium neoaurum*, *Pimelobacter simplex* И *Rhodococcus erythropolis*

© 2011 г. В. А. Андрияшина*, Н. В. Родина*, Т. С. Стыщенко*, Лью Дук Хи**, А. В. Дружинина*, В. В. Ядерец*, Н. Е. Войшвилло*

*Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312
e-mail: andryushina@rambler.ru

**Институт химии, Вьетнамская академия наук и технологий, Ханой

Поступила в редакцию 14.04.2010 г.

Конвертировали соевые стеринны (СС) в андрост-4-ен-3,17-дион (АД), андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД) и 9 α -гидрокси-АД (9-ОН-АД) с помощью трех штаммов актинобактерий. Найдены условия получения АД с помощью *Mycobacterium neoaurum* из 30 г/л СС. Стерины вносили в среду в виде микрокристаллов, либо в комплексе с метил- β -циклодекстрином (МЦД). Через 144 ч трансформации содержание АД в культуральной жидкости достигало 14.5 и 15.2 г/л соответственно. АД, полученный в присутствии МЦД, трансформировали (не выделяя из культуральной жидкости), в АДД с помощью *Pimelobacter simplex* или в 9-ОН-АД с помощью *Rhodococcus erythropolis*. Через 3 ч 1,2-дегидрирования в реакционной смеси содержалось 13.5 г/л АДД, который был выделен с выходом 75% с примесью 1.25% АД и 1.5% 1,2-дегидротестостерона. В контрольном опыте – 1,2-дегидрирование 20 г/л чистого АД в водном растворе с МЦД заканчивалось через 4 ч без образования побочных продуктов. Продукт, полученный через 22 ч 9 α -гидроксилирования АД, содержал по данным ВЭЖХ 80% 9-ОН-АД и 1.5% АД, отделение которого от гидроксистероида не представляло трудностей в отличие от опытов с АДД. Выход 9-ОН-АД с т.пл. 218–220°C в пересчете на СС составил 56%.

Базовыми структурами для синтеза многих лекарственных препаратов стероидной природы [1–4] являются 3,17-дикетостероиды – андрост-4-ен-3,17-дион (АД), андроста-1,4-диен-3,17-дион (АДД) и 9 α -гидроксиандростендион (9-ОН-АД), образуемые в результате селективного отщепления боковой цепи стериннов бактериями.

Указанные соединения получают главным образом с помощью мутантных штаммов бактерий рода *Mycobacterium* (*M. fortuitum*, *M. neoaurum*, *M. phlei*, *M. roseum*, *M. vaccae*), у которых блокирован синтез ферментов, отвечающих за деградацию стероидных колец [5–9]. Сообщается также о способности к селективному отщеплению боковой цепи стериннов бактериями *Arthrobacter globiformis*, *A. oxydans*, *A. simplex*, *Micrococcus roseus*, *Rhodococcus equi*, *Lactobacillus bulgaricus* [10–15]. Максимальное содержание трансформируемых стериннов достигает 30 г/л. При такой нагрузке период полной биоconversion стериннов в АД составляет более 300 ч [5, 6].

Условия трансформации стериннов в АДД существенно отличаются от условий ферментации АД-образующими штаммами вследствие токсичности АДД для бактерий при содержании в среде более 0.6–1.0 г/л [16, 17]. Эффект ингибирования процесса продуктом трансформации устраняют, выводя АДД из сферы реакции адсорбцией его на органических смолах, либо применяя циклодекстри-

ны, образующие с ним комплексы включения [4, 9, 18].

Имеются данные получения АДД трансформацией стериннов в 2 стадии (в количестве не выше 10 г/л) с использованием двух различных культур [19, 20]. В работе [19] на первой стадии фитостерин трансформировали в АД с помощью культуры *Mycobacterium* sp., затем с помощью гриба *Fusarium solani* АД дегидрировали в АДД. Однако в любом варианте кроме АДД в реакционной среде оставался промежуточный продукт трансформации – АД, присутствие которого вследствие очень близкой к АДД химической структуры усложняло стадию выделения последнего в чистом виде.

Так же, как и АДД, 9-ОН-АД получают либо непосредственно из стериннов (иногда в присутствии адсорбентов), либо из АД [1–4, 21–25]. Конверсия АД в 9-ОН-АД наиболее эффективно осуществляется мутантными штаммами микроорганизмов, у которых заблокирован синтез 3-кетостероид-1,2-дегидрогеназы [21, 25]. Например, двойной мутант *Rhodococcus erythropolis* RG8 с высокой скоростью конвертирует 92–96% АД в 9-ОН-АД при нагрузке субстрата до 20 г/л [25].

Цель работы – получение АД из фитостериннов с помощью *Mycobacterium neoaurum* при нагрузке стериннов в среде не менее 30 г/л и трансформирование его без выделения из культуральной жидко-

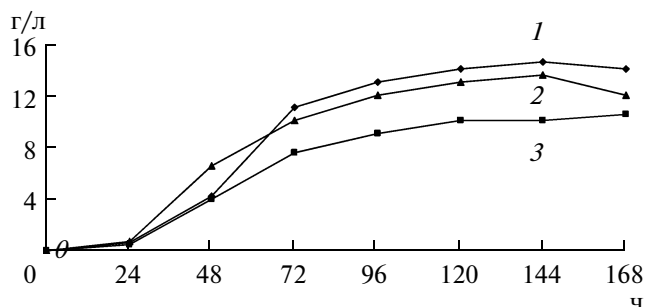


Рис. 1. Влияние количества посевного материала на образование АД из СС при нагрузке 30 г/л: 1 – 30% (дробное внесение), 2 – 30% (одноразовое внесение), 3 – 20%.

сти в АДД и 9 α -ОН-АД с помощью *Pimelobacter simplex* и *Rhodococcus erythropolis* соответственно.

МЕТОДИКА

Микроорганизмы. Использовали штаммы: *Mycobacterium neoaurum* Ac-1634, расщепляющий боковую цепь стерина животного и растительного происхождения с образованием АД [26], *Pimelobacter simplex* Ac-1632, осуществляющий 1,2-дегидрирование Δ^4 -3-кетостероидов [27] и *Rhodococcus erythropolis* Ac-1740, выполняющий 9 α -гидроксилирование Δ^4 -3-кетостероидов [28], депонированные в Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Среды и условия культивирования. Актинобактерии хранили на агаровых средах, в состав которых кроме агара входили: для *M. neoaurum* (г/л): глюкоза – 10.0, соевая мука – 5.0, лимонная кислота – 2.2, мочевины – 0.5, NH_4Cl – 1.0, K_2HPO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.5, FeSO_4 – 0.05, CaCO_3 – 1.5, pH 6.8–7.0; для *P. simplex* и *R. erythropolis* (г/л): глюкоза – 10.0, кукурузный экстракт – 15.0, K_2HPO_4 – 1.0, pH 6.8–7.2. Посевной материал (1 стадия культивирования) готовили в 100 мл этих сред (без агара) в конических колбах объемом 750 мл и выращивали 65–68 ч. Для 2 стадии – трансформации стерина в АД с помощью *Mycobacterium neoaurum* – культивирование бактерии осуществляли в таких же колбах, но снабженных отбойником, в среде, содержащей (г/л): глюкоза – 20.0, соевая мука 18%-ной жирности – 5.0, лимонная кислота – 2.2, мочевины – 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1.5, MgSO_4 – 0.5, FeSO_4 – 0.05, CaCO_3 – 3.0, соевые стерин (СС) с размером частиц 5–15 мкм – 20.0 (или 30.0), pH 7.0–7.2. При использовании СС в количестве 30 г/л раствор глюкозы и посевной материал подавали дробно (в начале эксперимента в количестве 10%, через 48 ч – 10%, через 96 ч – 10%. Глюкозу в 0 ч – 2%, через 48 ч – 1.5%, через 96 ч – 1.5%). Потребление

глюкозы определяли, используя глюкозо-оксидазный метод [26].

Условия биотрансформации. Смесь СС, состоящую из (%): ситостерин – 38, стигмастерин – 29, кампестерин – 18, насыщенные стерин – 1.5, вносили в виде мелкокристаллической суспензии (размер частиц 5–15 мкм) в количестве 20–30 г/л в указанную выше среду.

Для трансформации АД в АДД или в 9-ОН-АД соответственно с помощью *P. simplex* и *R. erythropolis* в суспензию СС добавляли метил- β -циклодекстрин (МЦД) в мольном отношении 1 : 1 (МЦД/АД), предполагая полную конверсию СС в АД. Процессы культивирования и трансформации проводили на качалке при 30 $^\circ\text{C}$ и скорости перемешивания 220 об/мин.

Биомассу *R. erythropolis* для 2 стадии трансформации выращивали 24–26 ч и осаждали декантацией в холодильнике в течение 1 сут. Влажную биомассу в количестве, соответствующем весу 0.4–0.5 г сухого вещества, переносили в колбы с 100 мл культуральной жидкости, полученной через 140–145 ч трансформации СС с помощью *M. neoaurum*.

Для получения АДД из АД использовали замороженную биомассу *P. simplex*, приготовленную согласно [27].

Оценка количества продуктов трансформации. Количество АД, АДД и 9-ОН-АД в культуральной жидкости оценивали с помощью ТСХ и ВЭЖХ. Стероиды извлекали экстракцией этилацетатом. Для ТСХ использовали пластинки Sorbfil (“Imid Ltd”, Россия) и систему бензол–ацетон 3 : 1. ВЭЖХ осуществляли на хроматографе “Gilson”, США, колонка с Silasorb C-18 (4.0 \times 250 мм), зернение 10 мкм. Скорость потока 0.8 мл/мин. Подвижная фаза $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (70 : 30).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение АД из СС с помощью *M. neoaurum*. Конверсия СС в АД культурой *M. neoaurum* при нагрузке субстрата 30 г/л показана на рис. 1. Так же, как при трансформации СС в количестве 10–20 г/л [26], появление АД зафиксировано уже в лаг-фазе, которая заканчивалась через 20–22 ч после инокуляции. Наиболее активно бактерия трансформировала СС в фазе экспоненциального роста и, как видно из рис. 1, скорость накопления АД определялась плотностью посевного материала – $2.7\text{--}3.0 \times 10^{10}$ или $4.2\text{--}4.5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл, что соответствовало одноразовым дозам инокулята 20 и 30 об. %. Максимальный выход АД наблюдали при дробном внесении посевного материала – первая порция 20 об. %, вторая – 10 об. % через 48 ч ($1.2\text{--}1.4 \times 10^{10}$ КОЕ/мл). Одновременно с второй порцией инокулята подавали дополнительно глюкозу, которая при начальной (одноразовой) дозе инокулята 30 об. % через 48 ч была полностью исчерпана

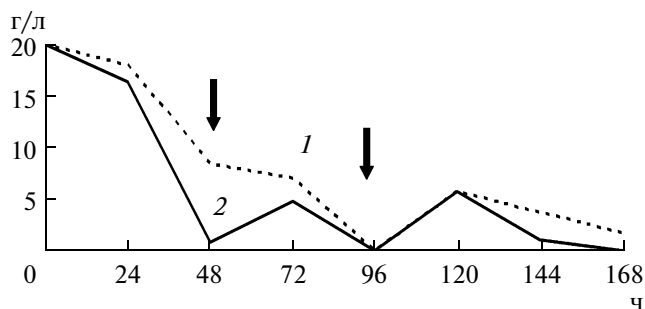


Рис. 2. Динамика потребления глюкозы в процессе трансформации СС с нагрузкой 30 г/л. Стрелки указывают время внесения дополнительной порции глюкозы. Посевной материал: 1 – 20%, 2 – 30%.

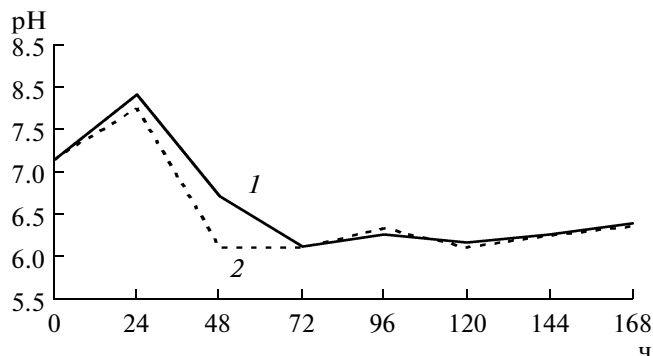


Рис. 3. Изменение pH культуральной жидкости в процессе трансформации СС с помощью *M. neoaurum*. Посевной материал: 1 – 20%, 2 – 30%.

(рис. 2). На рис.1 видно, что стероидтрансформирующая активность культуры *M. neoaurum* резко возрастала в результате добавления через 48 ч свежей порции инокулята в количестве 10 об. %.

Для периода максимальной стероидтрансформирующей активности культуры и интенсивного потребления глюкозы (первые 72 ч ферментации) была характерна тенденция к изменению pH с 7.5 до 6.0–6.2 (рис. 3). Следующий период (72–144 ч) характеризовался замедлением накопления АД, несмотря на вторую дополнительную порцию глюкозы через 96 ч. Значение pH в этом периоде оставалось на постоянном уровне – около 6.3. В отличие от контроля (20 об. % посевного материала и дополнительная порция глюкозы 2% через 48 ч), в котором через 144 ч было получено 10 г/л АД, в опыте с дробным внесением инокулята (в сумме 30 об. %) и добавлением 2 порций глюкозы (по 1.5%) через каждые 48 ч трансформации мелкокристаллического СС, содержание АД через 144 ч достигло 14.5 г/л (70% от теор.).

Получение АДД и 9-ОН-АД без выделения АД из культуральной жидкости (КЖ). В процессе трансформации СС в виде микрокристаллической суспензии АД накапливался в КЖ в виде крупных кристаллов, размер которых был несоизмерим с размером клеток актинобактерии [26]. Поэтому для проведения второй стадии превращения АД в АДД или в 9-ОН-АД без выделения АД из КЖ процесс его получения проводили в присутствии метил-β-циклодекстрина, который образовывал во-

дорастворимый комплекс с АД. Трансформация СС при нагрузке 30 г/л в АД была проведена в условиях, оптимальных для конверсии микрокристаллического субстрата, т.е. дробное внесение 30 об. % инокулята и глюкозы. Содержание АД в виде комплекса с МЦД через 6 сут составило 15.2 г/л.

Получение АДД. Данные конверсии АД в АДД с помощью *P. simplex* приведены в таблице. Полученный указанным выше способом АД в виде комплекса с МЦД был трансформирован в течение 3 ч в АДД. Выход выделенного технического продукта, содержащего 1.2% АД и 1.5% 1,2-дегидротестостерона (таблица) в пересчете на СС, составил 75%. Присутствие в конечном продукте АД и 1,2-дегидротестостерона – продукта восстановления АДД в КЖ *M. neoaurum* – было, по-видимому, связано с недостаточной аэрацией реакционной смеси, содержащей плотную биомассу двух культур. Контрольный опыт (получение АДД из 20 г/л субстрата, содержащего 98% АД, растворенного в воде с помощью МЦД и подвергнутого 1,2-дегидрированию с помощью меньшего количества биомассы *P. simplex*) заканчивался без образования побочных продуктов.

Получение 9-ОН-АД. Стадию превращения АД в 9-ОН-АД осуществляли с помощью биомассы штамма *R. erythropolis* с высокой 9α-гидроксилазной активностью по отношению к Δ⁴-3-кетостероидам и низкой деструктивной активностью в отношении стероидного ядра. В работе [28] было пока-

Получение АДД с помощью *P. simplex* из АД в КЖ *M. neoaurum* через 140 ч трансформации СС (I) или из АД в виде водного раствора комплекса АД 98%-ного содержания с МЦД (II, контроль)

Реакционная среда	Содержание АД, г/л	Биомасса <i>P. simplex</i> , г/л	Время трансформации, ч	Содержание стероидов в кристаллическом продукте, %		
				АДД	дегидротестостерон	АД
I	15.0	8.0	3	90	1.5	1.2
II	20.0	6.0	4	95	следы	следы

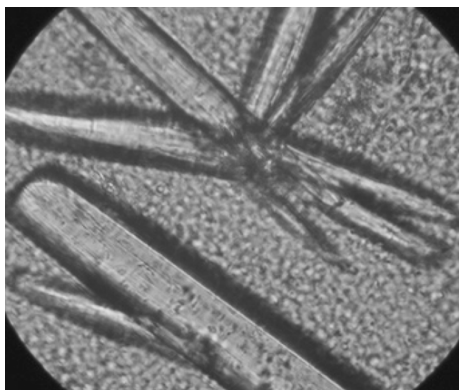


Рис. 4. Кристаллы 9-ОН-АД в КЖ *Rhodococcus erythropolis*.

зано, что указанная актинобактерия конвертирует микронизированный АД при содержании в среде в количестве 10–15 г/л (в присутствии диметилформамида) в течение 48 ч, образуя крупные кристаллы 9-ОН-АД, недоступные для дальнейшей модификации (рис. 4). В результате 22 ч трансформации 15 г/л АД с помощью этого штамма в смешанной культуре с *M. neoaurum* получен кристаллический продукт, содержащий по данным ВЭЖХ 80% 9 α -ОН-АД и 1.5% не вступившего в реакцию АД. Выход 9-ОН-АД с т. пл. 218–220°C в пересчете на трансформируемые СС составил 56%.

Таким образом, способ получения 9-ОН-АД из стеринов с помощью последовательно используемых двух культур актинобактерий, осуществляющих соответственно отщепление боковой цепи фитостеринов с образованием АД и его 9 α -гидроксигидрирование, можно рассматривать как эффективную альтернативу способам трансформации стерина одной культурой. В то же время АДД, в отличие от 9-ОН-АД, более целесообразно получать введением 1,2-двойной связи в АД, выделенный из КЖ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sedlaczek L. // CRC Crit. Rev. Biotechnol. 1988. V. 7. № 3. P. 187–236.
- Mahato S.B., Garai S. // Steroids. 1997. V. 62. № 4. P. 332–345.
- Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S. // Enzyme Microb. Technol. 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
- Донова М.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 41 № 1. С. 1–14.
- Wovcha M.G., Biggs C.B. Патент США. 1982. № 4345029.
- Wovcha M.G., Biggs C.B. Патент США. 1982. № 4345030.
- Bokany J., Albrecht K., Ambrus G., Lang T., Szabo I.M. Патент США. 1991. № 5004695.
- Rutijowska-Galewicz A., Ziolkowski A., Korycka-Machala M., Sedlaczek L. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 16. № 3. P. 237–244.
- Молчанова М.А., Андриюшина В.А., Савинова Т.С., Стыценко Т.С., Родина Н.В., Войшвилло Н.Е. // Биоорг. химия. 2007. Т. 33. № 3. С. 379–384.
- Ahmad S., Roy P.K., Khan A.W., Basu S.K., Johri B.N. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 7. № 5. P. 557–561.
- Naghibi F., Tabatabai-Yazdi M., Noori-Daloi M.R., Faramazzi M.A., Farnia F. // J. Sci. Islamic Repub. Iran. 1996. V. 6. № 4. P. 207–210.
- Sarangthem K., Singh L.J., Srivastava R.C. // Indian J. Plant Physiol. 1998. V. 3. № 4. P. 249–252.
- Saganska K., Kazmierczak J., Uszycka-Horawa T. Патент Польши. 1999. № 164535.
- Dogra N., Qazi G.N. // Folia Microbiol. 2001. V. 46. № 1. P. 17–20.
- Kumar R., Dahiya J.S., Singh D., Nigam P. // Bioresour. Technol. 2001. V. 78. № 2. P. 209–211.
- Goswami P.G., Singh H.D., Baruah J.N. // Folia Microbiol. 1984. V. 29. № 3. P. 209–216.
- Perez C., Falero A., Llanes N., Hung B.R., Herve M.E., Palmero A., Marti E. // J. Basic Microbiol. 2003. V. 43. № 2. P. 113–120.
- Gottschaldt B., Grosse H.H., Horhold C., Wetzker M., Naumann H., Heller I., Birke M., Plonka G. Патент Германии. 1993. № 301740.
- Kutney J.P., Herrington E.J., Spassov G. Междунар. Патент. 2003. № WO 03/064674.
- Lee C.J., Chen C.D., Liu W.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 38. № 4. P. 447–452.
- Marsheck W.J., Jui J., Wang P.G. Патент США. 1983. № 4397947.
- Jekkel B.A., Albrecht K., Ambrus G., Lang T., Szabo I.M., Ilkoy E., Konczol K., Moravesik I., Hantos G., Csajagi E. Патент США. 1991. № 5004695.
- Atrat P.G., Koch B., Szekalla B., Horhold-Schubert C. // J. Basic Microbiol. 1992. V. 32. № 3. P. 147–157.
- Angelova B., Mutafov S., Avramova T., Dimova I., Boyadjieva L. // Process Biochem. 1996. V. 31. № 2. P. 179–184.
- Geize R. van der, Hessels G. Патент Австралии. 2001. № 775476.
- Родина Н.В., Молчанова М.А., Войшвилло Н.Е., Андриюшина В.А., Стыценко Т.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 1. С. 56–62.
- Дружинина А.В., Андриюшина В.А., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 6. С. 642–646.
- Родина Н.В., Андриюшина В.В., Стыценко Т.С., Турова Т.П., Баслеров Р.В., Пантелеева А.Н., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 439–445.

Conversion of Soybean Sterols into 3,17-Diketosteroids Using Actinobacteria *Mycobacterium neoaurum*, *Pimelobacter simplex*, and *Rhodococcus erythropolis*

V. A. Andryushina^a, N. V. Rodina^a, T. S. Stytsenko^a, Luu Duc Huy^b, A. V. Druzhinina^a,
V. V. Yaderetz^a, and N. E. Voishvillo^a

^a Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 177312, Russia
e-mail: Andryushina@rambler.ru

^b Laboratory of Steroids, Institute of Chemistry, Vietnamese Academy of Science and Technology, Hanoi, 7/1, Vietnam
Received April 14, 2010

Abstract—Soybean sterols were converted into androst-4-ene-3,17-dione (AD) and 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione (9-OH-AD) using three actinobacterium strains. The transformation of a microcrystalline substrate (particle size 5–15 nm) or the transformation in the presence of randomly methylated β -cyclodextrin (MCD) were carried out by *Mycobacterium neoaurum* with a phytosterol load of 30 g/l over 144 h with an AD content of 14.5 and 15.2 g/l, respectively. AD obtained in the presence of MCD was transformed into ADD (13.5 g/l) by *Pimelobacter simplex* cells over 3 h and into 9-OH-AD by *Rhodococcus erythropolis* cells after 22 h without the isolation of AD from the cultural liquid. The technical product ADD was obtained in 75% yield, based on phytosterol. It contained as impurity 1.25% of AD and 1.5% of 1,2-dehydrotestosterone. In a control experiment—the process of 1,2-dehydrogenation of 20 g/l AD in the water solution of MCD—no by products were isolated. Thus, it is more expedient to introduce the 1,2-double bond into pure AD, whereas *R. erythropolis* strain with low destructive activity towards steroid nucleus can be used in the mixed culture with *M. neoaurum*. The crystal product contained, according to HPLC, 80% of 9-OH-AD, and 1.5 AD was combined. The yield of 9-OH-AD (m.p. 218–220°C) based on transformed phytosterol was 56%.

УДК 581.1:58.07.071

ВЛИЯНИЕ НА РАСТЕНИЯ ФИТОГОРМОНОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

© 2011 г. М. Г. Соколова*, Г. П. Акимова*, О. Б. Вайшля**

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, 664033
e-mail: SokolovaMG@sifibr.irk.ru

**Томский государственный университет, Томск, 634050

Поступила в редакцию 18.03.2010 г.

Новые штаммы ризосферных микроорганизмов *Azotobacter chroococcum* Az d10, *Bacillus megaterium* P1-04 и *Bacillus mucilaginosus* B-1574 способны к синтезу цитокининов (ЦК) и индолилуксусной кислоты (ИУК). Обнаружено три формы ЦК: дигидрозеатинрибозид, изопентениладенозин, трансзеатинрибозид, соотношение между которыми было различно в трех бактериальных культурах. Инокуляция растений огурца (*Cucumis sativus* L.) приводила к повышению в них ЦК – на 35.6%, ИУК – на 21.3% и увеличивала прорастание семян, скорость роста, биомассу проростков, количество боковых корней и площадь распространения корневых волосков, что способствовало лучшему питанию растений. Соотношение ИУК/ЦК при бактериализации сдвигалось в сторону ЦК за счет возрастания их рибозидных форм, что, вероятно, и обуславливало стимуляцию роста.

Почвенные микроорганизмы находятся в тесных и многообразных взаимосвязях с корневой системой высших растений. Эффект от этого взаимодействия может быть различным [1]. Существуют ассоциативные бактерии, обитающие в прикорневой зоне, которые оказывают на растения значительное позитивное влияние [2, 3]. В последнее время активно изучаются стимулирующие рост растений ризобактерии [4–6], инокуляция которыми позволяет направленно регулировать состав и численность микрофлоры на корнях в соответствии с потребностями и возможностями растений [7, 8]. Применение бактериализации растений в настоящее время является одним из наиболее перспективных экологических направлений современного агропроизводства [4, 9].

Микроорганизмы могут способствовать росту и повышению устойчивости растений за счет синтеза ими фитогормонов, в частности ауксинов и цитокининов (ЦК) [10, 11]. Существует распространенное мнение о том, что свойство продуцировать фитогормоны присуще многим ризосферным микроорганизмам, хотя этому нет убедительных доказательств [12]. Отмечается, что корень является одним из органов растения, наиболее восприимчивых к колебаниям концентрации ауксина – индолилуксусной кислоты (ИУК) [13]. Экскреция фитогормонов часто помогает бактериям занять определенную экологическую нишу и повлиять на метаболизм растения в собственных интересах [14].

Инокуляция растений специфическими микробными препаратами с целью увеличения урожайности сельскохозяйственных культур стано-

вится весьма привлекательной и уже используется в практике во многих регионах мира [2, 4, 15]. Прирост урожая, обусловленный бактериальной инокуляцией, связывают, помимо прочего, с продукцией микроорганизмами фитогормонов. По мнению некоторых авторов, микроорганизмы для инокуляции растений должны отбираться по способности синтезировать рострегулирующие вещества [16, 17].

Остается открытым вопрос относительно механизмов действия ассоциативных микроорганизмов на растения. Выяснение тонких механизмов формирования и функционирования уникальных биологических систем – ассоциаций бактерий и растений – представляет значительный фундаментальный интерес [1, 3]. Эти исследования необходимы также для решения практических задач дальнейшего улучшения эффективности применения бактериальных биопрепаратов в сельскохозяйственном производстве. Однако многие вопросы фитомикробных отношений на физиолого-биохимическом уровне остаются недостаточно изученными.

Цель работы – изучение возможности ризобактерий родов *Azotobacter* и *Bacillus* к синтезу фитогормонов (ИУК и ЦК) и их влияние на рост растений.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Новые штаммы ризосферных микроорганизмов *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mucilaginosus* были впервые выделены из серых лесных почв Западной Си-

бири в Томском госуниверситете. Это жидкие чистые культуры живых почвенных бактерий трех видов. Они являются нетоксичными, безопасными для человека и животных и используются как экологически чистые биологические удобрения [5].

Azotobacter chroococcum (штамм Az d10, ВКМ В-2272 Д) – культура свободноживущих почвенных азотфиксаторов [18]. Это новый уникальный штамм бактерий, преимуществом которого является способность к продуцированию фитогормонов и устойчивость к дельтаметрину. *A. chroococcum* поставляет аммонийную форму азота в ризосферу растений. Штамм селекционирован по способности продуцировать ИУК, ЦК, антибиотические вещества и возможности выдерживать такие концентрации дельтаметрина, которые используют в практике сельскохозяйственных работ, что позволяет применять эти бактерии совместно с пестицидами при прополке посевов.

Bacillus megaterium var. phosphaticum (штамм Р1-04, ВКМ В-2357 Д) – культура живых почвенных кислотообразующих бактерий [19], которая переводит фосфор из нерастворимой формы в доступную для растений и стимулирует процесс корнеобразования.

Bacillus mucilaginosus (ВКМ В-1574) – культура силикатных бактерий, способных выщелачивать кремний, другие макро- и микроэлементы из природных силикатов и поставлять их в ризосферу растений.

Определение ростстимулирующей активности биопрепаратов. Проводили модельные эксперименты по влиянию чистых культур ризосферных бактерий на ростовые параметры проростков огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта “Изящный” (энергии прорастания семян, скорость роста корневых проростков) в кюветах на фильтровальной бумаге, смоченной растворами культур, проращивали по 100 семян огурца. Использовали несколько концентраций растворов чистых культур: 0.5; 1.0 и 2.0 мл/л. Рабочий раствор препаратов чистых культур, рекомендованный для полевых опытов – 0.5 мл/л. Титр бактерий в рабочем растворе 10^6 кл./мл (10^6 КОЕ/мл).

Определение содержания ЦК и ИУК. Использовали 45-дневные растения огурца. Выращивание растений проводили в почвенной культуре (чернозем выщелоченный – содержание гумуса 8.4%; рН солевой вытяжки 5.8; NH_4 – 14; NO_3 – 15; P_2O_5 – 70; K_2O – 80 мг/100 г почвы); при освещенности 40 Вт/м² и 14-часовом фотопериоде. В каждом варианте ставили контроль – стерильная почва и питательная среда; и опыт – стерильная почва и культура бактерий: рабочий раствор содержал не менее 10^6 КОЕ/мл. Почву поливали во всех вариантах объемом воды, составляющим 60% от полной влагоемкости почвы. Бактеризацию проводили по предварительно увлажненной почве, в день посад-

ки растений, на 7 и 15 сутки онтогенеза. Норма расхода препарата составляла 20 мл рабочего раствора на 100 г почвы.

Выделение фитогормонов из фильтрата культуральной жидкости. Бактериальные клетки осаждали из свежей 2-суточной культуры того или иного вида бактерий в рефрижераторной центрифуге (8000 г, 15 мин, 4°C). Супернатант депротеинизировали 96%-ным этанолом и центрифугировали (12000 г, 10 мин). Надосадочную жидкость использовали для определения количества гормонов. Пробы для определения ИУК подкисляли до рН 2.5 10%-ным раствором H_2SO_4 , затем метилировали эфирным раствором диазометана с последующим выпариванием спирта, эфира и диазометана.

Выделение фитогормонов из растительной ткани. Количество ИУК и ЦК определяли в третьем настоящем листе, закончившем рост. Материал фиксировали жидким азотом, экстрагировали горячим 70%-ным этанолом, упаривали экстракт до водного остатка и делили на две части: ИУК экстрагировали диэтиловым эфиром при рН 2.5, а ЦК – бутанолом при рН 8.0. Разделение фитогормонов проводили с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках “Silufol UV-254” (Чехия): ИУК в системе растворителей этилацетат–хлороформ–уксусная кислота (100 : 100 : 1 по объему), ЦК – в дистиллированной воде. Для идентификации веществ на хроматограмме использовали стандартные образцы (“Serva”, Германия). После разделения гормонов вырезали интересующие зоны на пластинке и элюировали 96%-ным этанолом. Пробы для определения ИУК метилировали эфирным раствором диазометана.

Количественное определение фитогормонов. Использовали твердофазный иммуноферментный метод [20] с наборами ELISA (“Olchemim”, Чехия), позволяющими обнаружить от 0.01 до 10 пМ гормона в 50 мкл пробы. Определяли количество трансзеатинрибозида, дигидрозеатинрибозида, изопентиладенозина и ИУК. Оптическую плотность проб и концентрацию гормонов измеряли на многофункциональном анализаторе Victor (“Pribori Oy”, Финляндия).

Результаты обработаны статистически методом дисперсионного анализа. Опыты проводили в 3-кратной биологической повторности. В таблицах приведены средние арифметические величины и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ризосферные бактерии *A. chroococcum*, *B. megaterium* и *B. mucilaginosus* положительно влияли на ростовые процессы огурца. Всхожесть семян повышалась через 2 сут воздействия на 10–17%, через 3 сут – на 14–28%. Максимальное влияние бактериальные культуры оказали в концентрации 2 мл/л.

Таблица 1. Содержание ЦК (нг/мл) и ИУК (мкг/мл) в 2-суточной культуральной жидкости ризосферных бактерий

Фитогормон	<i>A. chroococcum</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mucilagenosus</i>
Дигидрозеатинрибозид	23.3 ± 0.53	18.6 ± 4.73	26.4 ± 1.07
Изопентениладенозин	10.5 ± 0.31	37.2 ± 2.52	34.2 ± 1.26
Трансзеатинрибозид	7.6 ± 0.09	6.2 ± 0.38	4.9 ± 0.28
Общее содержание ЦК	41.4 ± 0.62	62.0 ± 5.35	65.5 ± 1.68
ИУК	15.3 ± 0.64	12.0 ± 0.42	9.3 ± 0.35
Соотношение ИУК/ЦК	370 : 1	194 : 1	142 : 1

При бактеризации проростки огурца имели хорошо развитые боковые корни. Корни выглядели более объемными по сравнению с контролем, корневые волоски покрывали большую поверхность корня, область опушенности смещалась к кончику корня. Вероятно, это способствовало лучшему всасыванию минеральных веществ, что улучшало ростовые процессы в корне и в целом растении.

Бактеризация способствовала возрастанию массы корней. Прирост корня и скорость роста проростков повысились на 7.8% при обработке *A. chroococcum* в концентрации 2 мл/л. Совместное влияние трех культур на проростки было максимальным и достигало 42.6% при 2 мл/л.

Ранее нами показано [21], что ростстимулирующий эффект биопрепаратов на основе чистых культур *A. chroococcum*, *B. megaterium* и *B. mucilagenosus* активно проявлялся на растениях гороха (*Pisum sativum* L.), а также и при воздействии низкой температуры: все ростовые показатели бактеризованных проростков были выше контрольных. Инокуляция исследуемыми ассоциативными бактериями повышала устойчивость проростков гороха к гипотермии, способствовала восстановлению их роста и развития после действия холода. Кроме того, бактериальные биопрепараты, созданные на основе исследуемых штаммов микроорганизмов, являлись эффективным фактором увеличения урожайности различных овощных агрокультур (картофель, томаты, огурцы, морковь, капуста, свекла, лук-порей), они повышают устойчивость растений к грибным заболеваниям: существенно снижают пораженность картофеля грибной инфекцией паршой обыкновенной (*Streptomyces scabies*), снижают содержание нитратов в урожае, что повышает качество пищевой продукции, ускоряют созревание различных культур на 5–15 сут [22, 23].

Повышение урожая и устойчивости бактеризованных растений к различным биотическим и абиотическим воздействиям отмечали ряд исследователей [6–8, 11].

Увеличение площади поверхности корневой системы при инокуляции, по-видимому, не только способствует лучшему снабжению растений водой и минералами, но и благоприятствует размножению бактерий-колонизаторов [1]. Возможно,

скопление бактерий в ризосфере различных растений создает пленку на поверхности корней, при этом благоприятное воздействие бактерий может осуществляться за счет повышения питательных веществ в ризосфере в доступной для растений форме, подавления фитопатогенной микрофлоры. Кроме того, полезные микроорганизмы способны производить биологически активные вещества, что стимулирует рост растений [24].

В литературе отмечается, что бактериальные препараты могут способствовать стимуляции роста и повышению устойчивости растений за счет выделения микроорганизмами, входящими в их состав, биологически активных веществ фитогормональной природы, в частности ауксинов, гиббереллинов, ЦК [1, 10, 12, 16]. Как на один из факторов, повышающих устойчивость к биотическим и абиотическим воздействиям, указывают на гормональный баланс и особую роль в нем ЦК [25–27].

Штаммы ризобактерий, стимулирующих рост растений (plant growth-promoting rhizobacteria, **PGPR**) с нормальным уровнем образования ИУК способствуют удлинению у растений главного корня, развитию придаточных корней и увеличению количества корневых волосков. Мутанты PGPR с подавленным синтезом ауксина дефектны по позитивному влиянию на корневую систему растений [13, 28].

Поэтому нами исследовано содержание ауксинов и ЦК в культуральной жидкости и в растениях огурца после обработки ризосферными микроорганизмами.

В бактериальных средах обнаружено значительное количество ЦК и ИУК (табл. 1). При этом содержание ИУК, особенно в среде с *A. chroococcum*, было на несколько порядков выше (мкг/мл), чем ЦК (нг/мл).

Обнаружено три формы ЦК: дигидрозеатинрибозид, изопентениладенозин и трансзеатинрибозид. Соотношение между этими формами ЦК было различно в трех бактериальных средах. В культуре *A. chroococcum* было больше дигидрозеатинрибозид, в средах *B. megaterium* и *B. mucilagenosus* – изопентениладенозина. Содержание трансзеатинрибозид было существенно ниже во всех культуральных средах. Трансзеатинрибозид – это изомер

Таблица 2. Содержание ЦК и ИУК в растениях огурца (третий настоящий лист) через 45 сут после инокуляции бактериальными культурами (нг/г сырой массы)

Фитогормон	Контрольные растения	Растения после инокуляции	% к контролю
Дигидрозеатинрибозид	9.4 ± 0.21	13.5 ± 0.39	143.6
Изопентениладенозин	5.1 ± 0.19	4.9 ± 0.15	96.1
Трансзеатинрибозид	15.8 ± 0.83	22.7 ± 1.36	143.7
Общее содержание ЦК	30.3 ± 0.92	41.1 ± 1.42	135.6
ИУК	48.9 ± 2.12	59.3 ± 2.91	121.3
Соотношение ИУК/ЦК	1.6 : 1.0	1.4 : 1.0	

зеатинрибозид, который является активной формой ЦК именно у растений. Возможно, у бактерий в культуральной жидкости содержится цис-изомер, мы не изучали его содержание. Кроме того, известно, что ЦК образуются в результате распада т-РНК, возможно, поэтому трансзеатинрибозид у бактерий мало, а в листьях растений – больше, чем других форм ЦК.

При инфицировании растений огурца содержание фитогормонов и их соотношение (ИУК/ЦК) существенно менялось по сравнению с контролем (табл. 2). Инокуляция приводила к повышению уровня фитогормонов: общего содержания ЦК – на 35.6%, ИУК – на 21.3%. Уровень ЦК при бактериализации увеличивался за счет возрастания содержания в равной степени дигидрозеатинрибозид и трансзеатинрибозид – на 44%, а изопентениладенозина оставался без изменения.

Соотношение между формами ЦК в растениях отличалось от их соотношения в культуральных средах. В листьях огурца содержание изопентениладенозина было в 2–3 раза меньше, чем дигидрозеатинрибозид и трансзеатинрибозид. Соотношение ИУК/ЦК в растениях было во много раз ниже, чем в культуральных средах. Возможно, это связано с тем, что в растительном метаболизме, с одной стороны, ИУК активно используется, с другой стороны, большие количества этого гормона находятся в связанном виде. Очевидно, для растения физиологически оправдано иметь запасной пул ИУК в виде связанной формы, который может быть реализован растением при возникновении такой необходимости. Мы приводим данные о свободной, то есть активной форме ИУК.

Таким образом, количество фитогормонов в культуральных средах исследуемых микроорганизмов и в бактериализованных ими растениях огурца существенно различалось. Культуральные среды содержали на несколько порядков больше ИУК, чем ЦК. Содержание ИУК и ЦК в листьях огурца находилось примерно на одинаковом уровне. Кро-

ме того, обнаружены ЦК разных физиологических форм как в культуральных средах, так и в растениях огурца, причем их содержание и соотношение менялось при инокуляции.

Известно, что ауксины и ЦК – растительные гормоны, регулирующие у растений ряд процессов, связанных с их ростом и развитием: элонгацию клеточных стенок, клеточное деление, рост клеток, дифференцировку тканей, а также процесс фотосинтеза [25, 27]. Фитогормоны продуцируются не только растениями, но и многими микроорганизмами и грибами [10]. Молекулярные механизмы синтеза ИУК и ЦК, их генетический контроль у ассоциативных бактерий изучены мало, хотя считается, что эти гормоны играют существенную роль в формировании ассоциаций бактерий с растениями и оказывают стимулирующий эффект на их рост и развитие [2, 11].

Известно, что ЦК в клетке присутствуют в активной и неактивной форме. Рибозидные (транспортные) формы сами обладают определенной активностью и легко переводятся в более активные формы – свободные ЦК (зеатин, дигидрозеатин и изопентениладенин). В наших экспериментах повышалось содержание рибозидных форм ЦК в бактериализованных растениях огурца. По-видимому, инокуляция активировала синтез ЦК в корнях, которые затем перемещались в листья и способствовали активизации ростовых процессов в этих органах.

Одним из важнейших вопросов в исследовании растительно-микробных ассоциаций остается вопрос подбора и проверки наиболее эффективных и продуктивных штаммов бактерий [11, 15] при создании эффективных микробиологических препаратов для экологического агропроизводства. В частности, на наш взгляд, немаловажным является исследование предлагаемых для растениеводства биопрепаратов по способности бактерий, входящих в их состав, к синтезу рострегулирующих веществ – фитогормонов [10, 14, 17], что может служить критерием оценки практической эффек-

тивности подобных штаммов микробов и бактериальных препаратов.

В данной работе экспериментально показан ростостимулирующий эффект чистых культур ризосферных микроорганизмов: *A. chroococcum*, *B. megaterium* и *B. mucilaginosus*: бактериализация дает толчок семенам при прорастании и далее способствует поддержанию ростовых процессов на высоком уровне, повышается скорость роста проростков, количество боковых корней и корневых волосков, существенно снижается количество непроросших семян.

Ростстимулирующие свойства бактерий в изучаемой фито-микробной ассоциации объясняются способностью ризобактерий к синтезу биологически активных веществ гормональной природы. Показана способность исследуемых штаммов бактерий к синтезу ИУК и ЦК, содержание которых возрастало в листьях огурца при инокуляции. Обнаружено несколько форм ЦК как в культуральной жидкости, так и в растениях огурца. Соотношение ИУК/ЦК при бактериализации сдвигалось в сторону ЦК за счет их рибозидных форм, что, вероятно, и обуславливало стимуляцию роста.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что инокуляция исследуемыми ассоциативными бактериями повышает ростовые показатели растений за счет участия в этих процессах фитогормонов (ИУК и ЦК) как растений, так и синтезируемых микроорганизмами. Выяснено, что комплексное применение трех штаммов бактерий, вызывающих широкий спектр позитивных физиологических реакций у растений, является более эффективным [21, 22]. Как показывает практика, использование комплексных биоудобрений, включающих консорциум активных бактериальных штаммов, сочетающих в себе полезные свойства различных видов, способствует стабильному увеличению урожая (на 25% и более) и повышению устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам.

Данные культуры ризобактерий можно рекомендовать для обработки семян перед посадкой с целью стимуляции прорастания, повышения корнеобразования и улучшения дальнейшего роста растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кацы Е.И.* Молекулярная генетика ассоциативно-взаимодействия бактерий и растений. М.: Наука, 2007. 86 с.
2. *Vissey J.K.* // *Plant and Soil*. 2003. V. 225. № 2. P. 571–586.
3. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Ред. В.В. Игнатов. М.: Наука, 2005. 262 с.
4. *Завалин А.А.* Биопрепараты, удобрения и урожай. М.: РАСХН, 2005. 301 с.
5. *Вайшля О.Б., Ведерникова А.А., Бондаренко А.П.* Микробиологические аспекты гипергенеза. Томск: ТМЛ-Пресс, 2007. 288 с.
6. *Yang J., Klopffer J.W., Ryu C.-M.* // *Trends Plant Sci*. 2009. V. 14. № 1. P. 1–8.
7. *Дахмуш А.С., Кожемяков А.П.* // *Агрохимия*. 2007. № 1. С. 57–61.
8. *Курдиш И.К., Бега З.Т., Гордиенко А.С., Дырченко Д.И.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2008. Т. 44. № 4. С. 442–447.
9. *Мачнева В.В., Семина С.А.* // *Плодородие*. 2007. № 6 (39). С. 19–20.
10. *Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2006. Т. 42. № 2. С. 133–143.
11. *Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Меленьтьев А.И.* // *Биотехнология*. 2006. № 4. С. 50–55.
12. *Мишке И.В.* Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига: Зинатне, 1988. 151 с.
13. *Patten C.L., Glick B.R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 8. P. 3795–3801.
14. *Costacurta A., Vanderleyder J.* // *Crit. Rev. Microbiol.* 1995. V. 21. № 1. P. 1–18.
15. *Bashan Y.* // *Biotechnol. Adv.* 1998. V. 16. № 4. P. 729–770.
16. *Меленьтьев А.И.* Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах. М.: Наука, 2007. 120 с.
17. *Arshad M., Frankenberger W.* // *Plant and Soil*. 1991. V. 133. № 1. P. 1–8.
18. Патент РФ. 2004. № 2231546.
19. Патент РФ. 2006. № 2327737.
20. *Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н., Гули-заде В.З., Чередова Е.П., Мустафина А.Р., Мошков И.Е., Кулаева О.Н.* // *Физиология растений*. 1990. Т. 37. № 1. С. 193–199.
21. *Соколова М.Г., Акимова Г.П.* // *Вестник Харьковского нац. аграрн. университета*. 2009. Т. 3(18). С. 55–63.
22. *Соколова М.Г., Акимова Г.П., Бойко А.В., Нечаева Л.В., Глянко А.К., Вайшля О.Б., Ведерникова А.А.* // *Агрохимия*. 2008. № 6. С. 62–67.
23. *Соколова М.Г., Акимова Г.П., Рудиковский А.В., Глянко А.К., Вайшля О.Б.* // *Плодородие*. 2008. № 1. С. 26–28.
24. *Fall R., Kinsenger R.F., Wheeler K.A.* // *Syst. Appl. Microbiol.* 2004. V. 27. № 3. P. 372–379.
25. *Чернядьев И.И.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2009. Т. 45. № 4. С. 389–402.
26. *Соколова М.Г., Акимова Г.П., Нечаева Л.В.* // *Агрохимия*. 2005. № 5. С. 66–70.
27. *Веселов Д.С., Веселов С.Ю., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р., Фархутдинова Р.Г.* Гормоны растений: регуляция концентрации, связь с ростом и водным обменом. М.: Наука, 2007. 158 с.
28. *Xie H., Pasternak J.J., Glick B.R.* // *Cur. Microbiol.* 1996. V. 32. № 2. P. 67–71.

Effect of Phytohormones Synthesized by Rhizosphere Bacteria on Plants

M. G. Sokolova^a, G. P. Akimova^a, and O. B. Vaishlya^b

^a Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia
e-mail: SokolovaMG@sifibr.irk.ru

^b Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

Received March 18, 2010

Abstract—New strains of rhizosphere microorganisms *Azotobacter chroococcum* Az d10, *Bacillus megaterium* PI-04, and *Bacillus mucilaginosus* B-1574 were found to be able to synthesize cytokinins (CKs) and indolylacetic acid (IAA). Three forms of CKs—dihydrozeatin riboside, isopentenyl adenosine, and *trans*-zeatin riboside—were identified, whose ratio was different in the three bacterial cultures. Inoculation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants increased the content of CKs and IAA in them by 35.6 and 21.3%, respectively, and also stimulated seed germination and increased the growth rate, the biomass of shoots, the number of lateral roots, and the root hair area, which ensured better plant nutrition. The IAA/CKs ratio shifted during bacterization towards CKs due to increase in the content of riboside forms, which apparently caused growth stimulation.

УДК 577.152:577.113:579.252

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ГРИБА *Aspergillus awamori*

© 2011 г. А. М. Рожкова*, А. С. Серeda**, Н. В. Цурикова**, А. К. Нуртаева***, М. В. Семёнова*,
Л. В. Римарева**, Е. А. Рубцова*, И. Н. Зоров****, О. А. Сеницына****, А. П. Сеницын****

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

**Всероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии Россельхозакадемии, Москва, 111033
e-mail: vnipbt@com2com.ru

***Казахский институт менеджмента и экономики, Казахстан, Алматы 050010
e-mail: anurtaeva@kimer.kz

****Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119992
e-mail: info@rector.msu.ru

Поступила в редакцию 12.04.2010 г.

Создана экспрессионная система гетерологичных генов в отечественном штамме *Aspergillus awamori* Co-6804 – продуценте глюкоамилазы. Используя промоторную и терминаторную области гена глюкоамилазы, был получен вектор рСа, в который успешно клонировались гены фитазы *A. niger*, эндоглюканазы *Trichoderma reesei* и ксиланазы *Penicillium canescens*. Разделение ферментных препаратов с использованием системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (FPLC) показало, что содержание рекомбинантных ферментов в общем пуле секретируемого белка составляло от 0.6 до 14%.

До недавнего времени основными методами повышения продуктивности штаммов являлись химический и радиационный мутагенез и селекция. Эти методы эффективны, но не лишены недостатков: получаемые таким образом штаммы нестабильны и имеют высокий процент реверсий, кроме того, данные методы исключительно трудоемки и требуют больших затрат времени. С развитием ДНК-технологий широкое распространение получили методы плазмидной трансформации микроорганизмов. Использование методов генной инженерии имеет ряд преимуществ, основным из которых является интегративная встройка целевого гена в хромосому, что обеспечивает стабильность получаемых штаммов, не требующих постоянной поддерживающей селекции [1]. Суть процесса получения штамма-продуцента с измененными свойствами состоит во включении экзогенной ДНК в хромосому путем трансформации штамма-реципиента плазмидой, несущей ген целевого белка под контролем гомологичных регуляторных элементов – промотора и терминатора гена хорошо экспрессирующегося белка штамма-реципиента (т.н. гена “мажорного” белка). В мировой практике используются экспрессионные системы на основе грибных штаммов родов *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* и других, и различных промоторов (амилазных, целлюлогидролазных, эндоглюканазных, ксиланазных

и других) [2–4], в том числе широкое распространение получило использование промоторного участка гена глюкоамилазы гриба *A. niger*. Таким путем, например, был получен штамм-продуцент химозина [5].

Штамм гриба *A. awamori* является отечественным промышленным продуцентом глюкоамилазы [6]. Можно предположить, что клонирование регуляторных полинуклеотидных последовательностей (промотора и терминатора) гена глюкоамилазы (в данном случае мажорного белка) и создание на их основе экспрессионной системы в грибе *A. awamori* приведет к увеличению уровня экспрессии гетерологичных белков. Отметим, что низшие грибы рода *Aspergillus* являются хорошо изученными объектами в биотехнологической практике, что облегчает разработку трансформационной системы, обеспечивающей доставку экзогенной ДНК в клетку-реципиент [7].

Глюкоамилаза (α -(1-4), (1-6)-D-глюкан глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) является внеклеточным ферментом, эффективно гидролизующим крахмалсодержащее сырье до глюкозы, обладающим способностью расщеплять α -(1-4) и α -(1-6)-глюкозидные связи в крахмале (в амилопектине и мальтоолигосахаридах), что делает этот фермент ключевым в процессах осахаривания крахмалсодержащего сырья в спиртовой и крахмало-паточной промышленности [8].

Различные виды зерна кроме крахмала содержат некрахмальные полисахариды (НПС) – ксиланы, β -глюканы, целлюлозу, причем содержание НПС варьирует (табл. 1). Наличие НПС приводит к набуханию зерна и увеличению вязкости водно-мучных суспензий, что уменьшает эффективность действия амилолитических ферментов, поэтому целесообразно осуществлять одновременное применение амилаз и ферментов, способных гидролизовать НПС, т.е. обладающих целлюлазной, β -глюканазной или ксиланазной активностью [9]. Ксиланазные и целлюлазные ферментные препараты более пригодны в случае пшеницы, ржи и кукурузы, тогда как для ячменя целесообразно применять ферментные препараты с высокой β -глюканазной и целлюлазной активностью.

Еще одним важным сопутствующим амилазам ферментом является фитаза (КФ 3.1.3.8 и 3.1.3.26), которая гидролизует фитин зерна (смесь кальциевых и магниевых солей фитиновой кислоты) приводит к образованию неорганического фосфата и мио-инозита. Фитин является запасным соединением фосфора во всех злаках, содержание фитина в зерне колеблется от 0.4 до 3.2%, а фосфор фитина составляет 60–88% от общего содержания фосфора зерна [10]. Фитаты плохо ассимилируются в процессе получения этанола из крахмалсодержащего сырья, поэтому превращение фосфора в доступную для дрожжей форму и освобождение микроэлементов и металлов приводит к интенсификации процессов брожения, а также уменьшает нагрузку на очистные сооружения. Кроме того продукт гидролиза фитина – инозит способствует росту дрожжевых клеток [11].

На практике при переработке крахмалсодержащего сырья обычно применяют несколько ферментных препаратов, одни из которых обладают амилолитической активностью, другие – активностью по отношению к НПС или фитину, что приводит к определенным неудобствам, а также увеличивает затраты. Поэтому важной задачей представляется повышение уровня продукции ферментов, гидролизующих НПС и фитин у штамма-продуцента глюкоамилазы *A. awamori*, что может привести к увеличению эффективности его применения в биотехнологических процессах. В качестве целевых ферментов в работе были выбраны ксиланаза (КФ 3.2.1.8) *P. canescens*, свойства которой подробно описаны в работе [12], эндоглюканаза (КФ 3.2.1.4) *T. reesei*, обладающая помимо целлюлазной еще и β -глюканазной активностью [13], и фитаза *A. niger* [14].

Цель работы – увеличение активности ферментов, гидролизующих НПС, а также фитин, у штамма *A. awamori* (высокоактивного продуцента глюкоамилазы) путем создания системы экспрессии гетерологичных генов с использованием технологий рекомбинантных ДНК.

Таблица 1. Относительное содержание полисахаридов в зерне, %

Зерновая культура	Крахмал	Арабиноксилан	β -Глюкан	Целлюлоза
Пшеница	55–65	6.0–6.6	0.7–0.8	2.5–3.0
Рожь	52–60	8.7–10	2.2–2.8	3.0
Ячмень	53–57	4–5	5.7–7.0	4.3
Кукуруза	60–65	4–5	0	2.6

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов. *A. awamori* Co-6804 – продуцент глюкоамилазы, стабильный штамм, селекционированный среди популяции УФ-мутантов. *A. awamori* 6804-19 (*niaD*⁻) – мутант с дефектом в гене *niaD*, кодирующим фермент нитратредуктазу, реципиентный штамм для плазмидной трансформации.

Среды для культивирования штаммов гриба *A. awamori*. Минимальные среды: среда РМ (%): KH_2PO_4 – 1.5, KCl – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, H_3BO_3 – 0.0025, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.04, $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.04, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.04, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.04, глюкоза – 1.0; среда Чапека-Докса (%): NH_4Cl – 0.3, KCl – 0.2, KH_2PO_4 – 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.002, глюкоза – 2.0.

Селекционная среда: РМ с добавками (мМ): NaClO_3 – 10, NH_4Cl – 10; NaNO_3 – 10, аспарагин – 10; гипоксантин – 10.

Для поддержания штамма *A. awamori* и хранения посевного материала использовали следующие агаризованные среды: РМ + 10 мМ NaNO_3 + 2.0% агар; а также среда Чапека (%): картофельный крахмал – 3.0, NaNO_3 – 0.91, KCl – 0.05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05; KH_2PO_4 – 0.1; агар-агар – 2.0.

Культивирование трансформантов проводили в колбах на ферментационной среде для глубинного культивирования штаммов *A. awamori*: 24% пшеничной муки, обработанной α -амилазой, из расчета 2 ед. α -амилазной активности на 1 г крахмала. Трансформанты культивировали в течение 7 и 9 сут при 35°C и 250 об/мин.

Получение штамма-реципиента *A. awamori* 6804-19 (*niaD*⁻). Суспензию спор штамма *A. awamori* Co-6804 обрабатывали нитрозогуанидином с концентрацией 2, 1, 0.5 и 0.1 мг/мл в течение 15–30 мин. Выживаемость клеток при этом составляла от 0.13 до 7%. Для выделения хлорат-устойчивых мутантов обработанную суспензию рассеивали на чашки Петри с минимальной средой с хлоратом натрия. Выросшие клоны для выявления подлинности предполагаемых мутантов *niaD*⁻ пересевали на чашки Петри с минимальными средами с нитратом натрия, нитритом натрия, гипоксантином и аспарагином, т.е.

клоны проверяли на способность расти с использованием данных веществ в качестве единственных источников азота. Среди селектантов определяли клоны, которые соответствовали по свойствам мутантам *niaD*⁻, отличавшимся от исходного штамма только по признаку роста на среде с NaNO₃, при этом способность этих мутантов расти на средах с другими источниками азота оставалась такой же, как у исходного штамма *A. awamori* Со-6804. Кроме того, отбирали полученные штаммы-реципиенты с такой же способностью к биосинтезу глюкоамилазы как у исходного штамма.

Получение плазмидных конструкций. Нуклеотидная последовательность, соответствующая полноразмерному гену глюкоамилазы, включающая промоторный и терминаторный участки была амплифицирована методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), где в качестве матрицы использовали геномную ДНК *A. awamori*, выделенную с помощью набора фирмы “Qiagen” (США) по стандартным протоколам [15]. Для амплификации последовательности использовались праймеры:

GA_Aawa_pr-LIC5: TACTTCCAATCC-
ATGGAGAATCAGCAGGAGCCATTTCCGT

GA_Aawa_tr-LIC3: TATCCACSTTTACTGCG-
GCCGCGAGCCGATCAGACCAGTAGGT.

ПЦР проводили на приборе MyCycler “BioRad” (США) по следующему протоколу: 95°C – 5 мин – 1 цикл; 95°C – 1 мин 30 с, 50°C – 1 мин, 68°C – 4 мин – 25 циклов; 68°C – 10 мин, 4°C – 30 мин. Полученный ПЦР-продукт был клонирован в вектор pUC-LIC (рис. 1а) с использованием метода независимого лигирования [16]. ПЦР-продукт (~4500 п.о.) был выделен из агарозного геля и очищен, используя набор реагентов фирмы “Qiagen” (США). Далее продукт ПЦР был обработан T4-ДНК полимеразой “Fermentas” (США) в присутствии одного из нуклеотидов, подходящего для прерывания 3'–5' экзонуклеазной активности полимеразы. Обработанная вставка была лигирована в вектор pUC-LIC путем смешивания 50 нг вектора и 150 нг вставки. Смесь инкубировали 30 мин при 22°C, после чего трансформировали в клетки *Escherichia coli* Mach1 (“Invitrogen”, США) по стандартному протоколу трансформации [15]. Таким путем была получена плазида pGA-GA (рис. 1б).

Методом ПЦР был получен линейаризованный вектор pGA (рис. 1в), имеющий в своей структуре гомологичные промоторную и терминаторную части глюкоамилазы *A. awamori*. Для этого были генерированы праймеры, содержащие на 5'-концах новые LIC-сайты:

pGAvect-LowLIC: AGGATGGGGATGAGGGCA-
ATTGGTTATATGATCATG.

pGAvect-UpLIC: ATTGGTGAGGTGTAATCAT-
CTGGGGATGAAGCTC.

В качестве матрицы для ПЦР была использована плазида pGA-GA. Полученный амплификат был секвенирован по методу Сэнгера, нуклеотидная последовательность не содержала мутаций, инсерций или делеций. ПЦР-продукт был обработан T4-полимеразой по схеме, описанной выше. Таким путем был получен линейаризованный вектор pGA, обладающий регуляторными элементами, позволяющими после клонирования в него целевой ДНК реплицироваться как в клетках *E. coli*, так и интегрироваться в хромосому *A. awamori* за счет гомологичных промоторных и терминаторных участков.

Для получения плазмид, несущих гетерологичные гены: ксиланазы *P. canescens* pGA-Xyl (рис. 1г), эндоглюканазы *T. reesei* pGA-EG (рис. 1д) и фитазы *A. niger* pGA-PhyA (рис. 1е) были амплифицированы нуклеотидные последовательности соответствующих генов. Для амплификации были использованы следующие праймеры:

GA-Xyl-UpperLIC: ATTACACCTCA-
CCAATGGTTCAACTCAAGACTGCT.

GA-Xyl-LowerLIC: CCCTCATCCCCAT-
CCTGCTAAAGCGCATTTGGCGATAG.

GA-EG-UpperLIC: ATTACACCTCACCAT-
GCGCCCTCAGCTACACTGCCGTTAAS.

GA-EG-LowerLIC: CCCTCATCCCCA-
TCCTGCTAGAGGCATTGCGAGTAGTCT.

GA-Phy-UpperLIC: ATTACACCTCACCA-
AATGGGCGTCTCTGCTGTTCTAC.

GA-Phy-LowerLIC: CCCTCATCCCCA-
TCCTGCTAAGCAAACACTCCGCCCA.

В качестве матрицы в ПЦР-методе использовали геномные ДНК *P. canescens*, *T. reesei* и *A. niger* соответственно, выделенные по стандартным протоколам [15]. Условия проведения реакций: 95°C – 5 мин – 1 цикл; 95°C – 1 мин 30 с, 55°C – 1 мин, 68°C – 2–3 мин (в зависимости от размера амплифицируемого продукта) – 20 циклов; 68°C – 10 мин, 4°C – 30 мин. Полученный ПЦР-продукт был выделен, очищен и клонирован в вектор pGA методом независимого лигирования. Нуклеотидные последовательности генов ксиланазы, эндоглюканазы и фитазы были секвенированы в обоих направлениях по методу Сэнгера. Гетерологичные гены не содержали мутаций, делеций или инсерций и соответствовали последовательностям, представленным в GenBank (AN: AY756109 – для гена ксиланазы *P. canescens*, X60652 – для гена эндоглюканазы *Trichoderma* sp., Z16414 – для гена фитазы *A. niger*).

Тест на стабильность продукции целевых ферментов. Трансформацию штамма-реципиента *A. awamori* 6804-19 (*niaD*⁻) и получение протопластов проводили в соответствии с методикой, разработанной Тилбурном с соавт. для штамма *A. nidulans* [17]. Отобран-

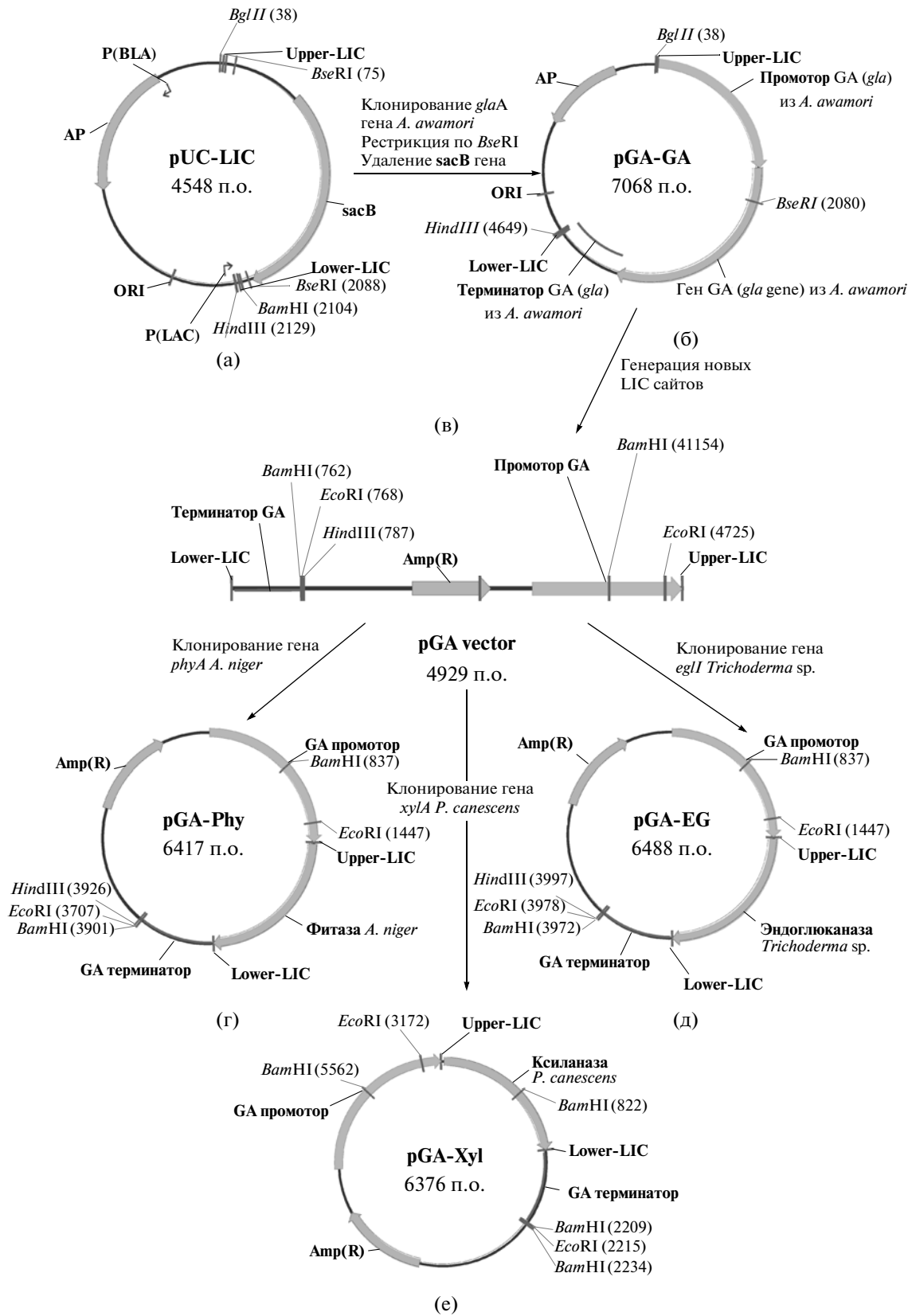


Рис. 1. Схема получения плазмидных конструкций для обеспечения гетерологичной экспрессии в рекомбинантном штамме *A. awamori* Co-6804.

ные штаммы-реципиенты и трансформанты проверяли на стабильность исследуемого признака в генерациях. Пересевы штамма проводили непосредственно после выращивания штамма, т.е. через 7 и 30 сут хранения при 4°C. После каждого посева проверяли активность штамма при глубинном культивировании.

Определение активности ферментов. Метод определения *глюкоамилазной активности* основан на измерении скорости образования глюкозы глюкозооксидазно-пероксидазным методом из растворимого картофельного крахмала. За единицу глюкоамилазной активности принимали такое количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль глюкозы из 1%-ного раствора картофельного крахмала за 1 мин при 30°C и pH 4.7 [6]. Метод определения *ксиланазной активности* основан на измерении скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди–Нельсона при гидролизе ксилана из древесины березы. За единицу ксиланазной активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС (в ксилозном эквиваленте) из 1%-ного раствора ксилана за 1 мин при 50°C и pH 5.0 [18]. Метод определения *β-глюканазной активности* основан на измерении скорости образования ВС методом Шомоди–Нельсона при гидролизе β-глюкана из зерен ячменя. За единицу β-глюканазной активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС (в глюкозном эквиваленте) из 1%-ного раствора β-глюкана за 1 мин реакции при 50°C и pH 5.0 [18]. Метод определения *эндоглюканазной активности* основан на измерении скорости образования ВС методом Шомоди–Нельсона при гидролизе Na-соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) средней вязкости. За единицу эндоглюканазной (КМЦазной) активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС (в глюкозном эквиваленте) из 1%-ного раствора КМЦ за 1 мин при 50°C и pH 5.0 [18]. Метод определения *фитазной активности* основан на измерении скорости образования свободных фосфатионов (P_i) при гидролизе фитата Na из зерен риса с использованием аммоний-молибденового реагента (13 мМ FeSO₄ · 7H₂O, 8.1 мМ (NH₄)₆Mo₂O₂₄ · 4H₂O и 0.533 М · H₂SO₄). За единицу фитазной активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль P_i из 1.4 мМ раствора фитата Na за 1 мин при 37°C и pH 5.0 [10].

Анализ состава ферментных препаратов. Для разделения ферментных препаратов использовали хроматографическую систему FPLC, колонки и носители фирмы “Pharmacia” (Швеция). Для подготовки образцов, а также для их обессоливания и замены буфера использовали систему низкого давления Econo-System фирмы “BioRad” (США).

Ферментный препарат обессоливали на колонке с акрилексом П2 фирмы “Reanal” (Венгрия) в 20 мМ буфере пиперазин-HCl, pH 5.5. Далее проводили анионообменную хроматографию на колонке с носителем Mono Q HR 5/5 (“Sigma-Aldrich”, США). Образец наносили в стартовом буфере при pH 5.5; связавшиеся белки элюировали при градиенте концентрации NaCl (0–0.4 М). В полученных фракциях определяли активность анализируемых белков. Зная общую целевую активность соответствующей фракции (глюкоамилазную, ксиланазную, эндо-глюканазную, фитазную) и общее содержание в ней белка, а также учитывая удельную активность соответствующего целевого фермента (гомогенных глюкоамилаз, ксиланазы, эндоглюканазы, фитазы) рассчитывали содержание соответствующего целевого фермента в общем пуле секретируемого белка [19]. Удельная активность гомогенной “легкой” (80 кДа) и “тяжелой” (140 кДа) форм глюкоамилазы *A. awamori* (80 кДа) составила 28 и 42 ед./мг белка, соответственно [6], ксиланазы *A. awamori* (35 кДа) – 165 ед./мг [20], ксиланазы *P. canescens* (31 кДа) – 30 ед./мг [12], эндоглюканазы *T. reesei* (57 кДа) – 24 ед./мг по КМЦазе [13], фитазы *A. niger* – 150 ед./мг [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Трансформационная система рекомбинантного гриба *A. awamori* Co-6804. С помощью обработки нитрозогуанидином и последующей селекции был получен штамм-реципиент *A. awamori* Co-6804 *niaD*⁻, характеризующийся наличием мутации в гене нитратредуктазы (*niaD*) и нарушенным метаболическим путем ассимиляции азота, что позволило осуществить селекцию трансформантов. Этот вид селекции традиционно используется для ряда грибных штаммов родов *Aspergillus* и *Penicillium* [22] и состоит в возможности отбора трансформантов на средах с нитратом натрия, в то время как не-трансформированный штамм-реципиент на таких средах не растет. Следует отметить, что среди нескольких десятков клонов потенциального штамма-реципиента *A. awamori* Co-6804 *niaD*⁻ отбирали только те, которые имели активность глюкоамилазы на уровне исходного штамма и сохраняли стабильность мутации (что выявляли путем последовательных пересевов на селективных средах и проведением контрольных трансформаций плазмидой pSTA10, содержащей ген *niaD* для определения числа прототрофных клонов).

Экспрессионная система рекомбинантного гриба *A. awamori* Co-6804. В литературе описан промотор гена глюкоамилазы *glaA* *A. niger* [23]. Основываясь на сравнении генов глюкоамилаз близкородственных штаммов *A. niger* и *A. awamori*, нами были амплифицированы нуклеотидные последовательности, соответствующие регуляторным участкам гена гомологичной глюкоамилазы штамма *A. awamori*

Таблица 2. Активность глюкоамилазы и целевых ферментов в КЖ трансформантов

Штамм	Белок, мг/мл	Активность, ед./мл				
		глюкоамилаза	ксиланаза	КМЦаза	β -глюканаза	фитаза
<i>A. awamori</i> Co-6804 (контроль)	25	460	35	17	10	1
pGA-Xyl15	22	390	105	0	0	0
pGA-Xyl21	20	394	104	0	0	0
pGA-EG46	22	283	0	120	82	0
pGA-EG47	23	280	0	103	65	0
pGA-Phy7	22	407	0	0	0	347
pGA-Phy39	21	396	0	0	0	241

Таблица 3. Активность сухих ферментных препаратов. Общая активность приведена в ед./г препарата, удельная – в ед./мг белка

Штамм	Белок, мг/г	Активность									
		глюкоамилаза		ксиланаза		КМЦаза		β -глюканаза		фитаза	
		ед./г	ед./мг	ед./г	ед./мг	ед./г	ед./мг	ед./г	ед./мг	ед./г	ед./мг
<i>A. awamori</i> Co-6804 (контроль)	679	14 500	21.4	296	0.44	130	0.19	82	0.12	34	0.05
pGA-Xyl21	590	15 800	26.8	462	0.78	0	0	0	0	0	0
pGA-EG46	374	6900	18.4	0	0	2136	5.71	124	3.32	0	0
pGA-Phy7	732	14 500	19.8	0	0	0	0	0	0	8010	10.90

Co-6804 – промоторная область гена глюкоамилазы размером 1649 п.о., а также терминаторный участок *gla* гена размером 715 п.о. Следует отметить, что сам ген глюкоамилазы хорошо изучен и подробно охарактеризован. На примере однокопийного по гену глюкоамилазы штамма *A. awamori* NRRL 3112 было показано, что две формы глюкоамилазы – “легкая” форма GA I и “тяжелая” GA II – транскрибируются с одного гена глюкоамилазы и являются продуктом сплайсинга мРНК, причем обе формы глюкоамилазы образуются за счет сплайсинга на 3'-конце гена, т.е. у обеих форм белков одинаковые N- и разные C-концы. Соответственно, промоторная область у обеих форм одна, что облегчает задачу клонирования [24].

Методом инверсного ПЦР были клонированы нуклеотидные последовательности, соответствующие регуляторным областям гена глюкоамилазы *A. awamori* Co-6804 и на основе этих участков сформирован вектор pGA (рис. 1), являющийся шаттл-вектором, обеспечивающим как встраивание целевого гена в хромосому *A. awamori* Co-6804 за счет гомологичной рекомбинации, так и репликацию экспрессионных плазмид в клетках *E. coli*, что облегчает наработку целевой ДНК для последующих трансформационных экспериментов.

Были получены экспрессионные плазмиды на основе вектора pGA, обеспечивающие экспрессию гетерологичных ксиланазы pGA-Xyl *P. canescens* (6376 п.о., рис. 1г), эндоглюканазы *T. reesei* pGA-EG (6488 п.о., рис. 1д) и фитазы *A. niger* pGA-Phy (6417 п.о., рис. 1е) и оптимизированы условия ко-трансформации штамма-реципиента *A. awamori* Co-6804 *niaD*⁻ целевыми плазмидами и трансформирующей плазмидой pSTA10. Это позволило получить достаточное для скрининга число трансформантов (20–50 трансформантов на 1 мкг целевой ДНК), что соответствовало литературным данным по частоте трансформаций грибов рода *Aspergillus* [25].

Скрининг трансформантов. После проведения трансформации штамма *A. awamori* Co-6804 *niaD*⁻ плазмидами pGA-Xyl, pGA-EG и pGA-Phy нами были отобраны в среднем по 200 трансформантов каждого вида, выросших на селекционной среде с нитратом натрия. Полученные трансформанты были культивированы в колбах при использовании стандартной жидкой ферментационной среды для *A. awamori*. Для анализа целевых и глюкоамилазной активностей пробы культуральной жидкости (КЖ) исследуемых клонов и контрольного штамма *A. awamori* Co-6804 были отобраны на 7 сут

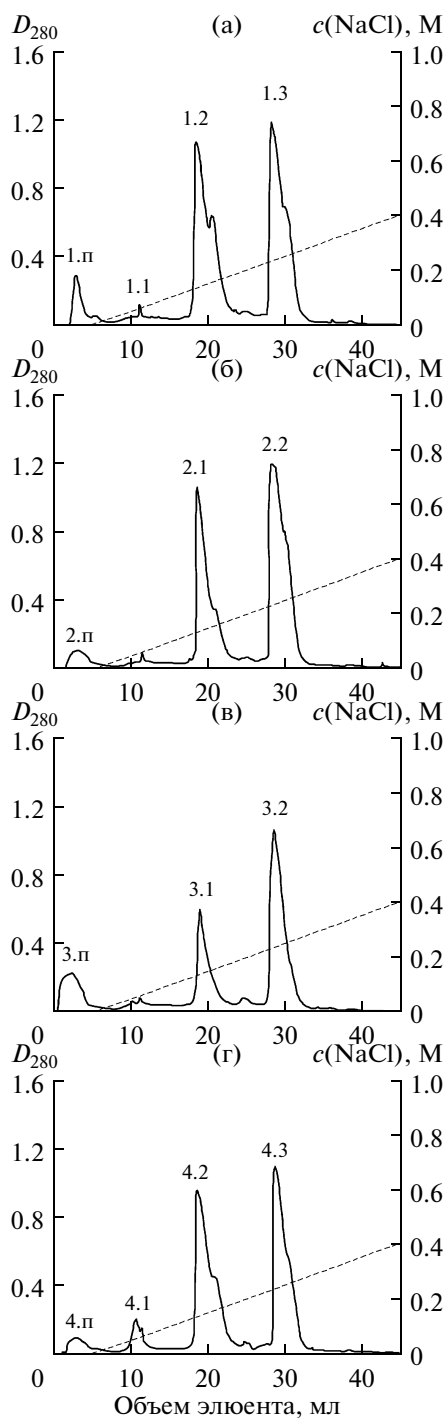


Рис. 2. Анионообменная хроматография на Mono Q препаратов контрольного штамма Co-6804 (а) и клонов рGA-Xyl21 (б), рGA-EG46 (в) и рGA-Phy7 (г). Сплошная линия – белковый профиль, штриховая – градиент концентрации NaCl. Общие активности во фракциях (с учетом объема фракций): активность глюкоамилазы во фракции 1.2 – 54 ед., 1.3 – 119 ед., 2.1 – 41 ед., 2.2 – 116 ед., 3.1 – 25 ед., 3.2 – 77 ед., 4.2 – 56 ед., 4.3 – 99 ед.; активность ксиланазы во фракции 1.п – 1.5 ед. (собственная ксиланаза), 2.п – 2.5 ед.; активность эндоглюканазы во фракции 3.п – 20 ед.; активность фитазы во фракции 4.п – 22 ед.

культивирования. Активности в КЖ контрольного штамма и в КЖ лучших клонов, экспрессирующих ксиланазу, эндоглюканазу и фитазу, а также содержание секретируемого белка в КЖ, представлены в табл. 2. Уровень экспрессии секретируемой ксиланазы повысился примерно в 3 раза, эндоглюканазы (КМЦазы) и β -глюканазы в 6–8 раз (как отмечалось выше, эндоглюканаза *T. reesei* обладает как целлюлазной, так и β -глюканазной активностью), а фитазы – более чем в 300 раз по сравнению с контрольным нетрансформированным штаммом *A. awamori* Co-6804. Глюкоамилазная активность в КЖ трансформантов по сравнению с контрольным штаммом уменьшалась, в целом, незначительно, только в случае штаммов, экспрессирующих эндоглюканазу было отмечено уменьшение активности глюкоамилазы в 1.6 раза.

Отобранные клоны были проверены на стабильность при пересеве и определении ферментов в КЖ после завершения процесса ферментации в колбах. Полученные трансформанты не теряли активности после 4 последовательных пересевов (данные не приведены), что говорит о стабильности трансформантов и стабильности интегративной встройки ДНК в хромосому гриба.

Активность сухих ферментных препаратов, полученных с помощью рекомбинантных штаммов *A. awamori*. Для анализа активности и состава секретируемого ферментного комплекса рекомбинантных штаммов из КЖ наиболее активных трансформантов рGA-Xyl21, рGA-EG46 и рGA-Phy7 были получены сухие ферментные препараты. Для этого проводили культивирование соответствующих штаммов в колбах на ферментационной среде для *A. awamori* с последующим осаждением белка из КЖ ацетоном.

В табл. 3 для сухих ферментных препаратов представлены значения активности глюкоамилазы, а также активностей, обеспечиваемых соответствующими секретируемыми гетерологичными целевыми ферментами: ксиланазной, КМЦазной, β -глюканазной и фитазной.

Для препарата рGA-Xyl21, полученного с помощью штамма с рекомбинантной ксиланазой *P. canescens*, наблюдали увеличение удельной ксиланазной активности в 1.8 раза относительно контрольного препарата из *A. awamori* Co-6804. Отметим, что в ферментном препарате с рекомбинантной ксиланазой наблюдали и некоторое увеличение удельной активности глюкоамилазы (26.8 ед./г) по сравнению с контрольным препаратом (24.1 ед./г).

Препарат рGA-EG46, полученный с помощью штамма с рекомбинантной эндоглюканазой *T. reesei*, характеризуется существенным (примерно 30-кратным) увеличением удельной КМЦазной и β -глюканазной активности по сравнению с контрольным препаратом. При этом удельная актив-

Таблица 4. Содержание индивидуальных ферментов в ферментных препаратах

Штамм	Фермент, % от общего пула белков				
	“легкая” форма глюкоамилазы	“тяжелая” форма глюкоамилазы	ксиланаза	эндоглюканаза	фитаза
<i>A. awamori</i> Co-6804 (контроль)	32	39	0.15*	0	0
pGA-Xyl21	28	46	0.60	0	0
pGA-EG46	15	31	0	14	0
pGA-Phy7	33	39	0	0	2.4

* Собственная ксиланаза *A. awamori*.

ность глюкоамилазы в препарате с рекомбинантной эндоглюканазой по сравнению с контрольным препаратом уменьшалась незначительно (с 21.4 до 18.4 ед./мг).

Препарат pGA-Phy7, полученный с помощью штамма с рекомбинантной фитазой из *A. niger* имел высокую удельную фитазную активность, примерно в 220 раз превосходящую удельную активность контрольного препарата. Удельная активность глюкоамилазы в препарате с рекомбинантной фитазой по сравнению с контрольным препаратом несколько уменьшалась (с 21.4 до 19.8 ед./мг).

Состав сухих ферментных препаратов. Было проведено аналитическое фракционирование полученных сухих препаратов на анионообменной колонке Mono Q при pH 5.5 с помощью FPLC-системы (рис. 2, для всех препаратов на колонку наносили одинаковое количество белка – 6 мг). На хроматограммах во всех случаях наблюдали два основных белковых пика: первый соответствовал “легкой” форме глюкоамилазы (80 кДа, фракция 1.2, рис. 2а), второй – ее “тяжелой” форме (140 кДа, фракция 1.3, рис. 2а). В контрольном препарате, полученном с помощью штамма *A. awamori* Co-6804, преобладающей являлась “тяжелая” форма глюкоамилазы – ее содержание составило 39% от общего пула белка, “легкой” формы – 32%. Отметим, что контрольный препарат характеризовался наличием “собственной” ксиланазы (35 кДа, фракция 1.п, рис. 2а), ее содержание составило 0.15% от общего пула белка.

При фракционировании препарата pGA-Xyl21 “собственная” ксиланаза (35 кДа) *A. awamori* и рекомбинантная ксиланаза (31 кДа) *P. canescens* находились во фракции, не связавшейся с носителем (фракция 2, рис. 2б). Содержание обоих ферментов во фракции невелико и дальнейшее хроматографическое разделение этих ферментов было затруднительным. Содержание общей ксиланазной фракции в препарате pGA-Xyl21 составляло 0.75% от общего пула белка. Если предположить, что содержание собственной ксиланазы *A. awamori* в ходе

трансформации не изменилось и равно содержанию в контрольном препарате (0.15%), то содержание рекомбинантной ксиланазы в препарате pGA-Xyl21 составляло 0.6%. Содержание “легкой” формы глюкоамилазы в этом препарате несколько уменьшалось по сравнению с контрольным препаратом (28 и 32% от общего пула белка соответственно). Содержание “тяжелой” формы по сравнению с контрольным препаратом увеличилось (с 39 до 46%). В целом, общее содержание глюкоамилазы увеличивалось до 74% по сравнению с 71% в контрольном препарате.

При фракционировании препарата pGA-EG46 рекомбинантная эндоглюканаза *T. reesei* была обнаружена во фракции, не связавшейся с носителем (фракция 3, рис. 2в). Следует отметить, что ни в одной фракции контрольного препарата *A. awamori* Co-6804 не было обнаружено заметной эндоглюканазной (КМЦазной) активности. Содержание рекомбинантной эндоглюканазы составило 14% от общего пула белка. Содержание “легкой” формы глюкоамилазы уменьшалось по сравнению с контрольным препаратом (с 32 до 15%), уменьшалось и содержание “тяжелой” формы (с 39 до 30%). В целом, общее содержание глюкоамилазы уменьшилось до 46% (71% в контрольном препарате).

При фракционировании препарата pGA-Phy7 фитазная активность была обнаружена во фракции, элюирующейся в начале градиента NaCl (фракция 4.1, рис. 2г). Ни в одной фракции контрольного препарата *A. awamori* Co-6804 не было обнаружено заметной фитазной активности. Содержание рекомбинантной фитазы *A. niger* составляло 2.4% от общего пула белка. Содержание “легкой” и “тяжелой” форм глюкоамилазы не изменялось.

Таким образом, нами была получена система экспрессии гетерологичных генов в штамме *A. awamori* Co-6804. Содержание рекомбинантных ферментов в общем пуле секретируемого белка варьировало от 0.6 до 14%, причем содержание глюкоамилазы для штаммов с рекомбинантной ксиланазой и фитазой не изменялось и несколько

уменьшалось в случае штамма с эндоглюканазой. Относительно невысокий уровень экспрессии (в случае ксиланазы) можно объяснить следующим образом. В литературе [26] на примере промотора *alcA*, широко используемого в системе экспрессии *A. nidulans*, и гена человеческого α 5-интерферона-2 (INF- α 2), находящегося под его контролем, показано, что для конструкции *alcA*-INF- α 2 существует т.н. эффект лимитирования активатора, в данном случае *AlcR*, для обслуживания избыточного количество копий под контролем промотора *alcA*. Такой же эффект наблюдался и для промотора *glaA* *A. niger* [27], причем привнесение в промоторную область дополнительных сайтов связывания с активатором принесло ожидаемый эффект повышения уровня экспрессии гетерологичных генов [28]. Таким образом, следующие шаги в наших исследованиях целесообразно направить на выяснение причин лимитирования высокой экспрессии белков в рекомбинантном штамме *A. awamori* и на поиск возможностей решения этих проблем.

Данная работа была выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России”, ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России”, а также программы ПНР-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wiebe M.G. // *Mycologist*. 2003. V. 17. № 3. P. 140–144.
2. Патент США. 1990. № 4966850.
3. Патент США. 1994. № 5298405.
4. Патент США. 1997. № 5610048.
5. Dunn-Coleman N.S., Bloebaum P., Berka R.M., Bodie E., Robinson N., Armstrong G., Ward M., Przetak M., Carter G.L., La Cost R. // *Biotechnology*. 1991. V. 9. P. 976–981.
6. Патент РФ. 2002. № 2245364.
7. Lubertozzi D., Keasling J.D. // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27. P. 53–75.
8. Sauer J., Sigurskjold B.W., Christensen U., Frandsen T.P., Mirgorodskaya E., Harrison M., Roepstorff P., Svensson // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1543. № 2. P. 275–293.
9. Bentley I.S., Williams E.C. *Industrial Enzymology* / Ed. Godfrey T., Stuart W. London: MacMillan Press, 1996. P. 339–358.
10. Синицына О.А., Федорова Е.А., Гусаков А.В., Упоров И.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П., Синецын А.П. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 9. С. 1260–1268.
11. Lim M.H., Lee O.H., Chin J.E., Ko H.M., Kim I.C., Lee H.B., Im S.Y., Bai S. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 12. P. 2125–2130.
12. Синицына О.А., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Серебряный В.А., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Синецын А.П. // *Биохимия*. 2003. Т. 68. № 12. С. 1631–1638.
13. Марков А.В., Гусаков А.В., Дзедзюля Е.И., Устинов Б.Б., Антонов А.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Синецын А.П. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2006. Т. 42. № 6. С. 654–664.
14. Han Y., Wilson D.B., Lei X.G. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 1915–1918.
15. Sambrook J., Russell D. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. P. 1–44.
16. Aslanidis C., de Jong P.J. // *Nucleic Acid Res.* 1990. V. 18. № 20. P. 6069–6074.
17. Tilburn J., Scazzocchio C., Taylor G.G., Zabicky-Zissman J.H., Lockington R.A., Davies R.W. // *Gene*. 1983. V. 26. P. 205–221.
18. Синецын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.А. *Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов*. М.: Изд-во МГУ, 1995. С. 144.
19. Семёнова М.В., Зоров И.Н., Синецын А.П., Окунев О.Н., Барышникова Л.М., Цурикова Н.В. *Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК* / Ред. Поляков В.А., Римарева Л.В. М.: Пищепромиздат, 2006. С. 77–81.
20. Hessing J.G., van Rotterdam C., Verbakel J.M., Roza M., Maat J., van Gorcom R.F., van den Hondel C.A. // *Curr. Genet.* 1994. V. 26. № 3. P. 228–232.
21. Casey A., Walsh G. // *Biores. Technol.* 2003. V. 86. P. 183–188.
22. Turner G. *Applied Molecular Genetics of Fungi*. Cambridge: Univ. Press, 1991. P. 29–44.
23. Gwynne D.I., Buxton F.P., Williams S.A., Sills A.M., Johnstone J.A., Buch J.K., Guo L.M., Drak D., Westphal M., Davies R.W. // *Biochem. Soc. Trans.* 1989. V. 17. P. 338–341.
24. Nunberg J.H., Meade J.H., Cole G., Lawyer F.C., Peter McC., Schweickart V., Tal R., Wittman V.P., Flatgaard J.E., Innis M.A. // *Mol. Cell. Biol.* 1984. V. 4. № 11. P. 2306–2315.
25. Unkles Sh.E., Campbell E.I., de Ruiter-Jacobs Y.M.J.T., Broekhuijsen M., Macro J.A., Carrez D., Contreras R., van den Hondel C.A.M.J.J., Kinghorn J.R. // *Mol. Gen. Genet.* 1989. V. 218. № 1. P. 99–104.
26. Gwynne D.I., Buxton F.P. // *Biotechnology*. 1987. V. 5. P. 713–719.
27. Verdoes J.C., Punt P.J., Stouthamer A.H., Hondel C.A.M.J.J. // *Gene*. 1994. V. 145. № 2. P. 179–187.
28. Liu L., Liu J., Qiu R.X., Zhu X.G., Dong Z.Y., Tang G.M. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2003. V. 36. № 6. P. 358–361.

Creation of a Heterologous Gene Expression System on the Basis of *Aspergillus awamori* Recombinant Strain

A. M. Rozhkova^a, A. S. Sereda^b, N. V. Tsurikova^b, A. K. Nurtaeva^c, M. V. Semenova^a,
L. V. Rimareva^b, E. A. Rubtsova^a, I. N. Zorov^d, O. A. Sinitsyna^d, and A. P. Sinitsyn^d

^a *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

e-mail: amrojko@mail.ru, inbi@inbi.ras.ru

^b *Institute of Food Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 111003 Russia*

e-mail: vnipt@com2com.ru

^c *Kazakhstan Institute of Management and Economics, Almaty, 050010 Kazakhstan*

e-mail: anurtaeva@kimep.kz

^d *Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

e-mail: info@rector.msu.ru

Received April 12, 2010

Abstract—A heterologous gene expression system was created in a domestic *Aspergillus awamori* Co-6804 strain, which is a producer of the glucoamylase gene. Vector pGa was prepared using promoter and terminator areas of the glucoamylase gene, and *A. niger* phytase, *Trichoderma reesei* endoglucanase, and *Penicillium canescens* xylanase genes were then cloned into pGa vector. Separation of enzyme samples using FPLC showed the amount of the recombinant proteins to be within the 0.6–14% range of total protein.

УДК 582.282.123.2.57.063.7:547.94

НОВЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ГРИБЫ РОДА *Penicillium*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ

© 2011 г. Т. В. Антипова, В. П. Желифонова, Б. П. Баскунов, С. М. Озерская, Н. Е. Иванушкина, А. Г. Козловский

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино, 142290

e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 24.05.2010 г.

Проведен скрининг продуцентов вторичных метаболитов среди 25 штаммов грибов рода *Penicillium*, выделенных из отложений вечной мерзлоты Арктики, Антарктиды и из мерзлого вулканического пепла Камчатки. Обнаружено, что половина из исследованных штаммов синтезирует биологически активные вещества алкалоидной природы: эргоалкалоиды, дикетопиперазины и производные хинолина. Большая часть из идентифицированных метаболитов относится к микотоксинам. Найден штамм *Penicillium waksmanii* – продуцент эпоксиагроклавина-I и хиноцитрининов, исследованы его основные физиолого-биохимические характеристики.

Поиск новых продуцентов неизвестных биологически активных веществ и практически важных метаболитов не перестает привлекать внимание биотехнологов различных направлений, а также научных работников, занимающихся фундаментальными аспектами микробиологии. О важности проблемы свидетельствует тот факт, что природные соединения и полученные на их основе полусинтетические вещества представляют собой более половины из используемых в практике лекарственных средств [1]. Биосинтетический потенциал микроорганизмов, особенно грибов, далеко не исчерпан, в настоящее время изучено не более 10% их метаболического разнообразия. В последние годы поиск новых продуцентов биологически активных соединений ведется среди микроорганизмов, выделенных из экзотических и практически неизученных местообитаний. Такой подход позволяет с большей вероятностью ожидать обнаружения продуцентов не только уже известных, но и новых для науки биоактивных веществ.

Грибы рода *Penicillium* хорошо известны как продуценты различных вторичных метаболитов, обладающих ценными фармацевтическими и терапевтическими свойствами. Среди разнообразных соединений, синтезируемых пенициллами, особый интерес представляет большая группа биологически активных веществ, таких как эргоалкалоиды, дикетопиперазиновые и хинолиновые алкалоиды.

Цель работы – поиск новых продуцентов вторичных метаболитов среди штаммов грибов рода *Penicillium*, выделенных из грунтов вечной мерзлоты

Арктики, Антарктиды, мерзлых пеплов Камчатки и изучение их физиолого-биохимических характеристик.

МЕТОДИКА

Объектами исследования были 25 штаммов грибов рода *Penicillium*, полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ РАН. Штаммы были выделены из арктических многолетнемерзлых грунтов Колымской низменности – *P. canescens* Sopp ВКМ FW-2648, ВКМ FW-2836, *P. chrysogenum* Thom ВКМ FW-2739, ВКМ FW-2835, ВКМ FW-2873, *P. citrinum* Thom ВКМ FW-2621, ВКМ FW-2629, ВКМ FW-2631; *P. commune* Thom ВКМ FW-2829, ВКМ FW-2830; *P. fellutanum* Biourge ВКМ FW-2611; *P. simplicissimum* (Oudem.) Thom ВКМ FW-2435, ВКМ FW-2461, ВКМ FW-2735; *P. waksmanii* К. М. Zalessky ВКМ FW-2866, ВКМ FW-2875; из многолетнемерзлых грунтов Антарктиды – *P. chrysogenum* ВКМ FW-2877, *P. citrinum* ВКМ FW-2882, *P. commune* ВКМ FW-2885, *P. corylophilum* Dierckx ВКМ FW-1455, *P. jensenii* К. М. Zalessky ВКМ FW-2903, из воды озера Радек в Антарктиде – *P. janczewskii* К. М. Zalessky ВКМ FW-2919, *P. waksmanii* ВКМ FW-2936, а также из мерзлого вулканического пепла Камчатки – *P. chrysogenum* ВКМ FW-2863, *P. commune* ВКМ FW-2666 [2].

Идентификацию штаммов проводили по макро- и микроморфологическим признакам у 7-суточных культур, выращенных при 5, 25 и 37°C на агаризованных средах СУА – среда Чапека с дрожжевым автолизатом, МЕА – мальц-экстракт агар и G25N – нитратный агар, содержащий 25% глицерина [3].

При изучении продукции вторичных метаболитов грибы культивировали глубинным способом на среде Абе следующего состава (г/л дистиллированной воды): маннит – 50.0; янтарная кислота – 5.4; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.3; KH_2PO_4 – 1.0; pH доводили до 5.4 25%-ным раствором NH_4OH . Грибы выращивали в 150 мл среды в колбах объемом 750 мл при $24 \pm 1^\circ C$ на качалке (220 об/мин). Засев среды осуществляли водной суспензией конидий ($1-2 \times 10^7$ спор/мл) 14-суточных культур, выращенных на скошенном сусло-агаре. Отбор проб проводили на 7 и 14 сут.

Внеклеточные метаболиты кислой, нейтральной и щелочной природы извлекали из фильтрата культуральной жидкости трехкратной экстракцией хлороформом по ранее описанной методике [4]. Анализ экстрактов осуществляли методом ТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системах I и II: хлороформ–метанол–25%-ный NH_4OH 90 : 10 : 0.1 (I) и 80 : 20 : 0.2 (II). Вещества обнаруживали по поглощению и флуоресценции в УФ-свете и после опрыскивания пластин реактивами Драгендорфа для обнаружения азотсодержащих метаболитов и Эрлиха для обнаружения индольных алкалоидов.

Выделение и очистку метаболитов проводили препаративной ТСХ на пластинках силикагеля. Идентификацию метаболитов осуществляли сохроматографией со стандартными образцами, полученными ранее в лаборатории вторичных метаболитов ИБФМ РАН, а также с использованием физико-химических методов. УФ-спектры соединений в метаноле получали на спектрофотометре UV-160 А, фирмы “Shimadzu” (Япония). Масс-спектры соединений регистрировали на масс-спектрометре LCQ Advantage MAX “Thermo Finnigan” (Германия), используя одноканальный шприцевой насос для прямого ввода образца в область химической ионизации при атмосферном давлении. Сбор и обработку масс-спектрометрических данных осуществляли с помощью программного обеспечения Xcalibur. Детекцию метаболитов для более полной информации проводили как в положительных, так и в отрицательных ионах. МС/МС спектры получали при нормализованной энергии столкновений 20–40%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация вторичных метаболитов. Изучение продукции вторичных метаболитов грибами, выделенными из регионов вечной мерзлоты, показало, что почти половина из изученных культур способна синтезировать азотсодержащие низкомолекулярные соединения разнообразных структур. Биосинтеза поликетидных метаболитов – патулина, гризеофульвина, пеницилловой кислоты, охра-токсина и PR-токсина у изученных штаммов об-

наружено не было. По спектру продуцируемых вторичных метаболитов штаммы можно разделить на три группы. К первой группе были отнесены штаммы *P. commune* ВКМ FW-2885, FW-2829, FW-2666, FW-2830, синтезирующие метаболит 1 с $R_f = 0.25$ (I), дающий с реактивом Эрлиха фиолетовое окрашивание, которое указывает на наличие индольной структуры в данном соединении. УФ-спектр выделенного метаболита был типичен для клавиновых эргоалкалоидов с характерным для α -циклопиазоновой кислоты (ЦПК) плечом в области 250 нм [5]. Молекулярная масса метаболита 1 (336 Да) и его масс-спектр совпадал со стандартным образцом ЦПК (табл. 1). ТСХ со стандартными образцами также показала одинаковую хроматографическую подвижность метаболита 1 на пластинках силикагеля в системах (I, II) с заведомым образцом ЦПК. Таким образом, на основании физико-химических характеристик выделенного метаболита, которые практически совпали с литературными данными [5], и прямого сравнения со стандартным образцом данное соединение было идентифицировано как клавиновый эргоалкалоид ЦПК.

У второй группы штаммов *P. chrysogenum* ВКМ FW-2863, FW-2739, FW-2873, FW-2877, FW-2835 обнаружен метаболит 2 с $R_f = 0.2$ (I), дающий с реактивом Эрлиха сначала желтое, а со временем голубое окрашивание. Аналогичная окраска с этим реактивом характерна для дикетопиперазинового алкалоида рокефортина. Полосы поглощения метаболита в УФ-спектре, молекулярная масса метаболита 2 (389 Да), его масс-спектр совпадал с таковыми для рокефортина (табл. 1). Этот метаболит имел одинаковую хроматографическую подвижность на пластинках силикагеля в системах (I, II) с заведомым образцом рокефортина. На основании полученных данных метаболит 2 штаммов ВКМ FW-2739, FW-2835, FW-2863, FW-2873 и FW-2877, был идентифицирован как рокефортин. Штаммы ВКМ FW-2739, FW-2863, FW-2873 также синтезировали метаболит 3, который образовывал с реактивом Эрлиха оранжевую окраску, характерную для мелеагрина. Данные УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии метаболита 3 полностью совпадали с таковыми для мелеагрина (табл. 1). Сравнение хроматографической подвижности выделенного метаболита с образцом мелеагрина на пластинках силикагеля в системах (I, II) показало полную идентичность двух соединений. У штаммов FW-2739 и FW-2863 помимо основных метаболитов был обнаружен минорный метаболит 4, обладающий низкой хроматографической подвижностью $R_f = 0.05$ (I) и дающий синее окрашивание с реактивом Эрлиха. УФ-спектр выделенного метаболита, молекулярная масса метаболита (321 Да) и масс-спектр соответствовали литературным данным для триптофанилдегидрогистидилдикетопиперазина [6]. У штамма FW-2835 был обнаружен метаболит 5 с $R_f = 0.08$ (I), развивающий с реакти-

Таблица 1. Физико-химические свойства идентифицированных метаболитов

Номера метаболитов	Стандартный образец	Окраска с реактивами		Хроматографическая подвижность в системах		УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм	Молекулярный ион и характеристические пики в МС/МС спектрах	
		Эрлиха	Драгендорфа	I	II		[M – H] [–]	[M + H] ⁺
1	ЦПК	Фиолетовая	Оранжевая	0.25	0.55	223, 251(пл.), 281, 290	335, 180, 140	337, 182, 196
2	Рокефортин	Голубая	»	0.2	0.52	238, 325	388, 190	390, 322, 193
3	Мелеагрин	Оранжевая	»	0.25	0.58	226, 272, 346	432, 404, 363	434, 403, 366
4	Триптофанилди-гидрогистидилди-кетопиперазин	Синяя	»	0.05	0.22	207, 238, 248, 312	320, 191	322, 193
5	3,12-дигидророкефортин	Голубая	»	0.08	0.30	209, 244, 301	390, 322, 205	392, 324
6	Гландиколин А	Оранжевая	»	0.1	0.38	226, 286, 344	402, 333	404, 335
7	Гландиколин Б	Оранжевая	»	0.1	0.38	226, 286, 344	418, 349, 332	420, 334, 274
8	Агроклавин-I	Фиолетовая	»	0.18	0.35	223, 276, 282, 292	–	239, 208, 183
9	Эпоксиагроклавин-I	Фиолетовая	»	0.28	0.55	223, 276, 282, 292	253, 235, 183	255, 237, 182
10, 11	Хиноцитринины А и Б	нет	»	0.14	0.6	216, 248, 256, 300, 314, 328	269, 254, 253	271, 214

вом Эрлиха сначала желтое, а со временем голубое окрашивание, аналогичное рокефортину. УФ-спектр соединения, молекулярная масса метаболита 5 (391 Да) и его масс-спектр совпали с данными для 3,12-дигидророкефортина. ТСХ метаболита со стандартом 3,12-дигидророкефортина показала одинаковую хроматографическую подвижность обоих соединений. Штамм FW-2863 синтезировал два метаболита 6 и 7, дающих на ТСХ с реактивом Эрлиха оранжевую зону. УФ-спектры соединений были идентичны и практически аналогичны спектрам мелеагрина, что говорит об общности хромофорных групп этих соединений (табл. 1). Молекулярные массы метаболитов 6 (419 Да) и 7 (403 Да) соответствовали массам гландиколинов А и Б. Все идентифицированные метаболиты у второй группы штаммов относятся к дикетопиперазиновым алкалоидам группы рокефортина, образующихся циклизацией триптофана и гистидина с участием мевалоновой кислоты. Триптофанилдегидрогистидилдикетопиперазин является первым интермедиантом биосинтетического пути, ведущим к образованию рокефортина. Предполагают, что 3,12-дигидророкефортин – следующее звено на пути биосинтеза рокефортина. У некоторых видов *Penicillium* роке-

фортин – конечный метаболит биосинтетического пути, а у других он претерпевает ряд превращений. Так, продуктом модификации рокефортина является мелеагрин. Промежуточными метаболитами в биосинтетической цепочке рокефортин – мелеагрин выступают гландиколины А и Б [7]. Таким образом установлено, что штаммы *P. chrysogenum* ВКМ FW-2739, FW-2863, FW-2873, FW-2877, FW-2835 синтезируют разнообразные дикетопиперазиновые алкалоиды семейства рокефортина.

Третья группа представлена штаммами *P. fellutanum* FW-2611 и *P. waksmanii* ВКМ FW-2875. Штамм FW-2611 синтезировал метаболит 8 с $R_f = 0.18$ (I), дающий фиолетовое окрашивание с реактивом Эрлиха. Метаболит имел УФ-спектр типичный для клавиновых эргоалкалоидов и молекулярная масса метаболита (238 Да) соответствовала агроклавинолу или агроклавинолу-I (табл. 1). Методом ТСХ было проведено прямое сравнение хроматографических подвижностей метаболита 8 и заведомых образцов агроклавинолу и агроклавинолу-I. Хроматографические характеристики метаболита 8 оказались идентичны соответствующим данным для агроклавинолу-I ($R_f = 0.18$ и 0.35 в системах I и II соответственно) и отличались от данных для агроклави-

на ($R_f = 0.22$ и 0.39 соответственно). Метаболит 8 штамма FW-2611 идентифицирован как агроклавин-1. В щелочных экстрактах штамма FW-2875 присутствовали два метаболита с $R_f = 0.18$ (I) и $R_f = 0.28$ (II), дающие фиолетовую окраску с реактивом Эрлиха. Физико-химические характеристики метаболита с более низким значением R_f соответствовали агроклавину-1 (табл. 1). Метаболит 9 с более высоким R_f имел УФ-спектр, типичный для клавиновых эргоалкалоидов, молекулярная масса метаболита (254 Да) и его спектр соответствовал масс-спектру стандарта эпоксиагроклавина-1. На основании полученных данных соединения штамма FW-2875 были идентифицированы как агроклавин-1 и эпоксиагроклавин-1. В кислых экстрактах этого штамма обнаружено два метаболита 10 и 11, с близким значением R_f , дающие положительную реакцию с реактивом Драгендорфа, но не реагирующие с реактивом Эрлиха. УФ-спектр и масс-спектр соединений был идентичен и соответствовал хиноцитрининам А и Б (табл. 1). Сравнение хроматографической подвижности выделенных метаболитов со стандартом хиноцитрининов показало их полную идентичность. Хиноцитринины А и Б относятся к классу хинолиновых алкалоидов. Эпоксиагроклавин-1 и агроклавин-1 – это алкалоиды клавинового ряда, имеющие необычную стереохимию 5R-, 10S-конфигурации эрголинового ядра.

Неидентифицированный индолсодержащий метаболит дикетопиперазиновой структуры с молекулярной массой 358 Да обнаружен у *P. canescens* ВКМ FW-2648.

Таким образом, найдены новые продуценты биологически активных соединений, таких как эргоалкалоиды, дикетопиперазиновые и хинолиновые алкалоиды (табл. 2). Большая часть штаммов способна синтезировать в значительных количествах ЦПК, рокефортин, мелеагрин, которые по своей физиологической активности обычно относятся к классу микотокосинов [5, 8]. Изученные штаммы относятся к палеогрибам, поэтому учитывая современные прогнозы о глобальном потеплении, полученные нами данные о токсигенном потенциале данных грибов, несомненно, представляют интерес для специалистов, занимающихся охраной здоровья человека и животных. Идентификация у *P. waksmanii* FW-2875 эпоксиагроклавина-1 и хиноцитрининов представляет практический интерес с точки зрения биологической активности этих соединений. Ранее проведенные исследования эпоксиагроклавина-1 показали, что соединение обладает нейротропной активностью и оказывает умеренное гипотензивное действие. Хиноцитринины проявляют антимикробную и противоопухолевую активность [9].

Физиолого-биохимические характеристики *P. waksmanii* – продуцента клавиновых эргоалкалоидов (ЭА) и хиноцитрининов (ХЦ). Показано, что

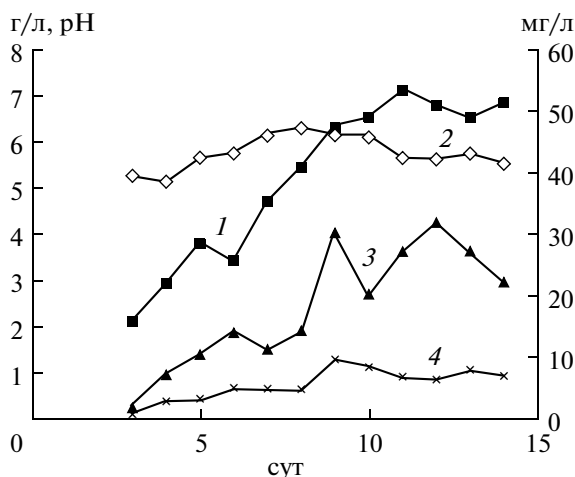
Таблица 2. Вторичные метаболиты, идентифицированные у изученных штаммов

Вид	Штамм ВКМ FW-	Вторичные метаболиты
<i>P. commune</i>	2885	ЦПК
<i>P. commune</i>	2666	
<i>P. commune</i>	2830	
<i>P. commune</i>	2829	
<i>P. chrysogenum</i>	2739	Рокефортин, мелеагрин, триптофанилдегидрогистидилдикетопиперазин
<i>P. chrysogenum</i>	2835	Рокефортин, 3,12-дигидроорокефортин
<i>P. chrysogenum</i>	2863	Рокефортин, мелеагрин, триптофанилдегидрогистидилдикетопиперазин, гландиколины А и Б
<i>P. chrysogenum</i>	2877	Рокефортин
<i>P. chrysogenum</i>	2873	Рокефортин, мелеагрин
<i>P. fellutanum</i>	2611	Агроклавин-1
<i>P. waksmanii</i>	2875	Агроклавин-1, эпоксиагроклавин-1, хиноцитринины А и Б
<i>P. canescens</i>	2648	Индолсодержащий метаболит

Таблица 3. Максимальные показатели роста и биосинтеза ЭА и ХЦ продуцентами

Показатель	<i>P. waksmanii</i>	<i>P. citrinum</i> [10]
Биомасса, г/л	7.1	4.1
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0.014	0.01
ЭА, мг/л	32	3.9
ХЦ, мг/л	9.6	2.4
Y _{ЭА/Х} , мг/г	4.8	0.8
Y _{ХЦ/Х} , мг/г	1.5	0.6
q _{ЭА} , мг/г ч	0.11	0.01
q _{ХЦ} , мг/г ч	0.04	0.02

штамм *P. waksmanii*, выделенный из условий естественной криоконсервации, в которых он находился около 100–200 тыс. лет способен синтезировать алкалоиды, известные для другого палеогриба – *P. citrinum* [10]. Причем *P. waksmanii* оказался более эффективным продуцентом этих алкалоидов, чем *P. citrinum* (табл. 3). Максимальные показатели роста и биосинтеза ЭА и ХЦ *P. waksmanii* были в 1.7, 8 и 4 раза больше соответственно, по сравнению с аналогичными показателями *P. citrinum*. Выходы алкалоидов в расчете на единицу биомассы (Y_{ЭА/Х} и



Динамика роста и биосинтеза ЭА и ХЦ *P. waksmanii*: 1 — биомасса, г/л; 2 — рН; 3 — ЭА, мг/л; 4 — ХЦ, мг/л.

$Y_{\text{ХЦ/Х}}$ *P. waksmanii* также превосходили *P. citrinum* в 6 и 2.5 раза, а удельные скорости синтеза ЭА и ХЦ ($q_{\text{ЭА}}$ и $q_{\text{ХЦ}}$) были выше в 10 и 2 раза соответственно (табл. 3).

С целью выяснения особенностей роста и алкалоидообразования *P. waksmanii* изучали динамику их накопления в культуральной жидкости (рисунок). Рост *P. waksmanii* на среде Абе характеризовался ди-ауксией с переходной лаг-фазой на 5–6 сут, связанной с перестройкой метаболизма с одного источника углерода (сукцинат) на другой (маннит). Биосинтез алкалоидов шел параллельно росту продуцента. Динамика накопления алкалоидов в культуральной жидкости носила циклический характер. Падение концентраций ЭА и ХЦ и снижение $q_{\text{ЭА}}$ и $q_{\text{ХЦ}}$ приходилось на вторую лаг-фазу роста гриба (рисунок) и на начало стационарной фазы роста гриба (10 сут). При продолжении культивирования наблюдалось увеличение концентрации алкалоидов.

Ранее с целью выяснения закономерности образования ЭА и ХЦ была исследована динамика их накопления в процессе роста продуцента *P. citrinum* [10]. Сравнение продукции ЭА и ХЦ у *P. waksmanii* и *P. citrinum* показало существование общих закономерностей в биосинтезе этих метаболитов. Общим является преимущественно внеклеточное накопление алкалоидов. Так, у *P. waksmanii* в период максимального биосинтеза алкалоидов (13 сут) содержание внеклеточных ЭА и ХЦ составляло 76 и 93% от общего количества алкалоидов соответственно. У *P. citrinum* свыше 90% алкалоидов обнаруживалось в среде [10]. Другой закономерностью является то, что алкалоиды синтезируются активно растущим мицелием. Причем в процессе роста грибов накопление алкалоидов носит периодический характер. На модельном опыте было показано, что падение концентрации ЭА и ХЦ в культуральной жидкости

в начале стационарной фазы роста *P. citrinum* вызвано их поглощением клетками гриба [10]. Выявлено, что процессы биосинтеза и экскреции, а также поглощения ЭА и ХЦ *P. citrinum* отражают способы регуляции баланса внутриклеточного триптофана [11].

Таким образом, был проведен поиск продуцентов вторичных метаболитов среди грибов, являющихся элементами различных древних микробных сообществ многолетнемерзлых отложений различного генезиса и возраста. Половина из изученных штаммов синтезировала вторичные метаболиты, относящиеся к эргоалкалоидам (ЦПК, агроклавин-1 и эпоксиагроклавин-1), хинолиновым производным (хиноцитринины А и Б) и дикетопиперазинам (группа рокефортина). Большая часть из идентифицированных метаболитов относится к микотоксинам. Найдена вторая в мире культура гриба, продуцирующая эпоксиагроклавин-1 и хиноцитринины, идентифицированная как *P. waksmanii* и исследованы ее основные физиолого-биохимические характеристики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clark A.M. // *Pharmaceutic. Res.* 1996. V. 13. № 8. P. 1133–1141.
2. Ozerskaya S., Kochkina G., Ivanushkina N., Gilichinsky D. *Permafrost Soils* / Ed. Margesin R. Berlin–Heidelberg: Springer Verlag, 2009. P. 85–95.
3. Pitt J.I. *The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. London: Acad. Press, 1979. 633 p.
4. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М., Антипова Т.В., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Грефе У. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2003. Т. 39. № 4. С. 446–451.
5. Cole R.J., Cox R.H. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. New York: Acad. Press, 1981. 937 p.
6. Козловский А.Г., Винокурова Н.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1997. Т. 33. № 1. С. 70–74.
7. Козловский А.Г., Винокурова Н.Г., Решетилова Т.А., Сахаровский В.Г., Баскунов Б.П., Селезнев С.В. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1994. Т. 30. № 3. С. 410–414.
8. Betina V. // *Mycotoxins, Production, Isolation, Separation and Purification* / Ed. Betina A.B. Amsterdam: Elsevier, 1984. 528 p.
9. Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Adanin V.M., Ozerskaya S.M., Kochkina G.A. // *J. Antibiotics*. 2003. V. 56. № 5. P. 488–491.
10. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2005. Т. 41. № 5. С. 568–572.
11. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Лысанская В.Я. // *Микробиология*. 2006. Т. 75. № 3. С. 334–341.

New Producers of Biologically Active Compounds—Fungal Strains of the Genus *Penicillium* Isolated from Permafrost

T. V. Antipova, V. P. Zhelifonova, B. P. Baskunov, S. M. Ozerskaya,
N. E. Ivanushkina, and A. G. Kozlovsky

*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russia Academy of Sciences,
pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Received May 24, 2010

Abstract—Screening of producers of secondary metabolites was carried out among 25 fungal strains of *Penicillium* genus isolated from permafrost in Arctic and Antarctic regions and Kamchatka. Nearly 50% of the investigated strains synthesize biologically active substances of alkaloid nature: ergot alkaloids, diketopiperazines, and quinoline derivatives. A large group of the identified metabolites belongs to mycotoxins. A strain of *Penicillium waksmanii* was found producing epoxyagroclavine-I and quinocitrinins. The main physiological and biochemical characteristics of this producer were investigated.

УДК 577.3;582.284

ДЕЙСТВИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ СВЕТЯЩИХСЯ ГРИБОВ

© 2011 г. Г. А. Выдрякова, А. А. Гусев, С. Е. Медведева

Институт биофизики СО РАН, Красноярск, 660036

e-mail: vydryakova@mail.ru

Поступила в редакцию 17.11.2009 г.

Оценена возможность создания твердофазного биолюминесцентного биотеста с использованием светящегося воздушного мицелия грибов. Исследовано действие органических и неорганических токсических веществ (ТВ) в концентрациях от 10^{-6} до 1 мг/мл на свечение воздушного мицелия культур 4 видов светящихся грибов: *Armillaria borealis* (Коллекция культур ИЛ СО РАН), *A. mellea*, *A. gallica* и *Lampteromyces japonicus* (Коллекция грибов БИН РАН). Наиболее чувствительной к действию растворов модельных ТВ оказалась культура *A. mellea*. Показано, что чувствительность светящихся грибов сравнима с таковой светящихся бактерий, используемых для мониторинга окружающей среды. Использование в качестве тест-объекта светящегося воздушного грибного мицелия на твердофазном носителе является перспективным направлением биотестирования для создания биосенсоров с целью непрерывного мониторинга воздушной среды.

Биолюминесцентный анализ – один из возможных экспресс-методов мониторинга окружающей среды, обнаружения токсических веществ (ТВ) как органических, так и неорганических, включая тяжелые металлы. Наибольшее применение в биолюминесцентном анализе нашли светящиеся бактерии. Ингибирование свечения бактерий ТВ служит основой большинства биолюминесцентных биотестов, среди которых наиболее популярными являются лиофилизированные светящиеся бактерии в качестве тест-объектов благодаря их высокой чувствительности к микроколичествам токсических веществ и простоте использования [1–5]. Большое распространение в биолюминесцентном анализе получили генетически модифицированные бактерии, несущие *lux*-гены светящихся бактерий и других светящихся организмов [5–7]. Однако с помощью бактериальных биотестов не всегда можно оценить воздействие веществ на эукариотические организмы и обнаружить ТВ в воздушной среде. Разработка и использование биотестов более высоко организованных организмов (дрожжи, черви, грибы), несущих гены люминесцентной системы, открывает новые перспективы развития биолюминесцентного анализа.

В последние годы наблюдается увеличение количества исследований, посвященных изучению светящихся грибов благодаря возможности их использования в биолюминесцентном анализе. Количество известных светящихся грибов [8–10] неуклонно растет в связи с обнаружением новых видов [11, 12]. К настоящему времени насчитывается

83 вида светящихся грибов [13], в то время как среди бактерий известно лишь 17 [14]. Светящиеся грибы всех известных видов испускают голубовато-зеленый свет с максимумом около 530 нм [15]. Грибы в зависимости от видовой принадлежности светятся в широком диапазоне температур: от 4 до 50°C [16]. На агаризованных средах и на древесине свечение мицелия может длиться от нескольких дней до нескольких недель в зависимости от вида гриба.

Длительное свечение грибов в широком температурном диапазоне, наличие воздушного мицелия делают перспективным создание на их основе новых биолюминесцентных биотестов непрерывного действия, которые могут быть использованы для обнаружения токсичности, в том числе и в воздушной среде.

Цель работы – сравнение действия токсических веществ (ТВ) органической и неорганической природы на уровень свечения воздушного мицелия культур *Armillaria borealis*, *A. mellea*, *A. gallica* и *Lampteromyces japonicus*.

МЕТОДИКА

Объектами исследования были культуры грибов, имеющие светящийся мицелий: *Armillaria mellea*, *A. gallica* и *Lampteromyces japonicus* из Коллекции культур базидиомицетов ЛЕ(БИН) Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН и *A. borealis* из рабочей коллекции культур Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (табл. 1).

Таблица 1. Культуры грибов, использованные в экспериментах

Культура	Штамм, № в коллекции	Место и год выделения	Коллекция грибов
<i>Armillaria gallica</i> (Vahl.) P. Kumm.	1043	Центральный Урал, Пермская обл., 1993	ЛЕ(БИН)
<i>A. mellea</i> (Vahl.) P. Kumm., s.l.	0356	Минская область, Беларусь, 1970	»
<i>Lampteromyces japonicus</i> (Kawam.) Singer	491	Великобритания, 1947	»
<i>A. borealis</i> (Marxm. & Korhonen)	3к-4	Красноярский край, 2007	Рабочая коллекция ИЛ СО РАН

Таблица 2. Величина остаточной люминесценции (%) по истечении 3 мин после добавления токсичного вещества

Вещество	Концентрация, мг/мл						
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Бензохинон	27	35	42	63	65	74	79
CuSO ₄	33	52	58	88	67	81	85

В качестве модельных ТВ использовали водные растворы солей, в том числе тяжелых металлов: Na₂WO₄, NiSO₄, CoCl₂, (NH₄)₂MoO₄, CrSO₄, ZnSO₄, Li₂SO₄, AlCl₃, MnCl₂, CsCl, CdSO₄, SnCl₂, HgCl₂, ацетата свинца [Pb(OCOCH₃)₂], а также бензохинона (БХ), фенантренхинона (ФАХ), 5-амино-2-3 дигидро-1,4-фталазиндиона (А-ДХ-ФД) и 1,2-нафтохинон-4-сульфоновой кислоты (НХ-СК) в концентрациях 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹, и 1 мг/мл. Токсичность исследуемых растворов оценивали по величине биолюминесцентного индекса (БИ), который рассчитывали по формуле: $БИ = I_0/I_k$, где I_0 – нормированное относительно исходного значения интенсивности свечения грибного мицелия в опыте, I_k – нормированное относительно исходного значения интенсивности люминесценции грибного мицелия в контроле.

Культуры выращивали на агаризованной среде Сабуро (40 г глюкозы, 10 г пептона, 15 г агар-агара на 1 л дистиллированной воды) при комнатной температуре. Эксперименты по действию ТВ проводили при наличии видимого свечения мицелия. Интенсивность свечения измеряли на планшетном люминометре Luminoscan Ascent (“ThermoElectron Co”, Финляндия). Блоки агаризованной среды площадью около 3 × 3 мм² с растущей светящейся культурой грибов помещали в лунки планшета (куда

предварительно для предотвращения высыхания агара вносили 50 мкл стерильной дистиллированной воды) и измеряли исходную интенсивность люминесценции. После добавления 200 мкл исследуемого вещества в лунки с культурой повторно измеряли люминесценцию через 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. В контрольные варианты вносили 200 мкл дистиллированной воды. Нормированные значения рассчитывали по отношению к исходному свечению. Растворы исследуемых веществ считали токсичными, если отклонение величины биолюминесцентного индекса опыта от 1 (биолюминесцентный индекс контроля) превышало 20%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительно нами был проведен эксперимент по кратковременному воздействию (3 мин) растворов CuSO₄ и бензохинона в концентрациях 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹ и 1 мг/мл на свечение мицелия *A. mellea* (табл. 2). Минимальная концентрация бензохинона (10⁻⁶ мг/мл) вызывала уменьшение уровня свечения на 21% по сравнению с начальным, в то время как 3 мин воздействие бензохинона в концентрации 1 мг/мл вызвало падение уровня люминесценции на 73%. Воздействие раствора CuSO₄ в концентрации 10⁻⁶ мг/мл приводило

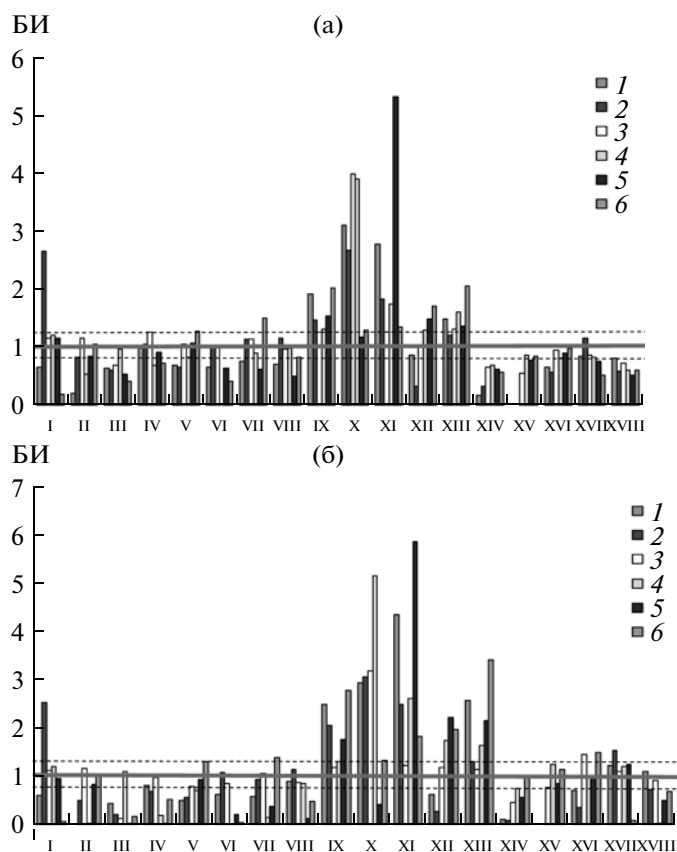


Рис. 1. Действие модельных ТВ в течение 5 (а) и 30 мин (б) на свечение воздушного мицелия (БИ) *Armillaria borealis*. (На рис. 1, 2 приводятся нормированные значения свечения. БИ = 1 – биоломинесцентный индекс контроля. Область, ограниченная пунктирными линиями БИ = 0.8–1.2, обозначает зону нетоксичного действия вещества).

I – Na_2WO_4 ; II – NiSO_4 ; III – CoCl_2 ; IV – $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$; V – CrSO_4 ; VI – ацетат свинца, VII – ZnSO_4 ; VIII – Li_2SO_4 ; IX – AlCl_3 ; X – MnCl_2 ; XI – CsCl ; XII – $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; XIII – SnCl_2 ; XIV – HgCl_2 ; XV – бензохинон, XVI – фенантренин; XVII – амино-2-3 дигидро-1,4-фталазиндион; и XVIII – 1,2-нафтохинон-4-сульфоновой кислоты.

Концентрация ТВ (мг/мл): 1 – 1; 2 – 10^{-1} ; 3 – 10^{-2} ; 4 – 10^{-3} ; 5 – 10^{-4} ; 6 – 10^{-5} .

к уменьшению люминесценции на 15%, а в концентрации 1 мг/мл к ее падению на 67% по сравнению с исходным значением.

В последующих экспериментах нами было исследовано действие ряда органических и неорганических веществ в концентрациях от 10^{-5} до 1 мг/мл на свечение исследуемых культур светящихся грибов (рис. 1, 2). В ходе экспериментов было показано, что для определения возможного токсического действия растворов модельных ТВ на свечение грибного мицелия достаточно 5 мин экспозиции. Так, на рис. 1а и 1б приведены данные по определению биоломинесцентного индекса культуры *A. bo-*

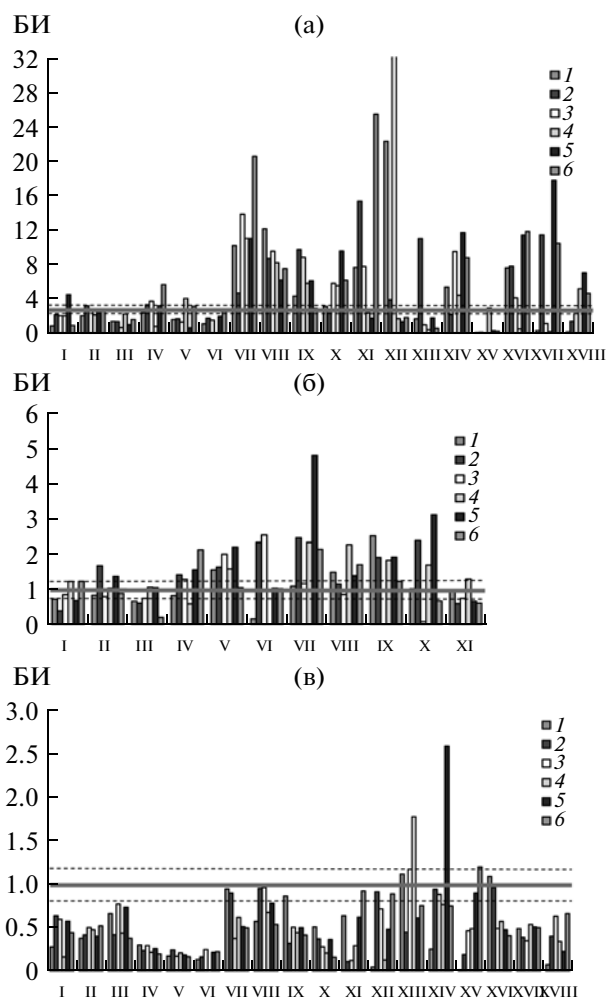


Рис. 2. Действие модельных ТВ (5 мин) на свечение воздушного мицелия (БИ) *Armillaria mellea* (а), *Lampteromyces japonicus* (б), *A. gallica* (в). Обозначения ТВ и их концентрации аналогичны приведенным на рис. 1.

realis при воздействии на нее тестируемых растворов в течение 5 (рис. 1а) и 30 (рис. 1б) мин. Как следует из приведенных на рисунках данных, действие наиболее эффективных токсикантов проявляется уже после 5 мин экспозиции, поэтому в дальнейшем мы не приводим данные, полученные для 10, 15, 20, 25 и 30 мин воздействия исследуемых растворов на культуры светящихся грибов.

Эффект используемых модельных ТВ на люминесценцию грибного мицелия был разнонаправлен и зависел от концентрации тестируемого вещества и видовой принадлежности гриба (рис. 1, 2).

Культура *A. borealis* оказалась чувствительной к действию ионов металлов Mn, Cs, Pb, Cd и Al. Большинство исследованных растворов солей этих металлов разных концентраций стимулировало свечение мицелия данной культуры, а растворы солей

Co, Cr и ацетата свинца в низких концентрациях его ингибировали. Действие растворов органических веществ не было столь выраженным (рис. 1а, 1б).

В случае культуры *A. mellea* наибольший эффект (увеличение уровня свечения в 5 и более раз) наблюдался при действии солей Cd, Zn, Li, Al, Mn, Hg. Таким же явно выраженным был эффект на свечение данной культуры всех использованных в эксперименте органических веществ уже после 5 мин экспозиции (рис. 2а).

Растворы солей Zn, Li, Al, Mn и растворы ацетата свинца стимулировали свечение *L. japonicus* (рис. 2б). В большинстве же случаев для *A. gallica* наблюдалось ингибирование люминесценции как органическими, так и неорганическими ТВ (рис. 2в).

Среди исследованных культур максимальный исходный уровень свечения наблюдался у культуры *A. borealis*. Однако наиболее чувствительной к воздействию модельных ТВ оказалась культура *A. mellea*. В то время как преобладающим ответом культуры *A. mellea* на воздействие ТВ было стимулирование люминесценции, для культуры *A. gallica* наблюдалось ее падение под действием большинства ТВ, а в случае *A. borealis* в равной мере имели место как стимулирование, так и ингибирование свечения.

Стимулирование свечения растворами солей некоторых металлов и отдельными органическими веществами может быть обусловлено особенностями метаболизма грибов. Так, клетками грибов синтезируются ферменты — металлопротеины, в состав которых входят ионы металлов, например марганецзависимые лигнинпероксидазы, а также лакказы и тирозиназы, в состав которых входят одно- и двухвалентные ионы меди, а субстратами являются фенольные соединения [17].

Следует подчеркнуть, что в наших экспериментах был использован грибной мицелий, выращенный на твердой питательной среде, в то время как известные в литературе экспериментальные данные получены с использованием глобулярного мицелия, выращенного в жидкой среде. Светящийся воздушный грибной мицелий на твердофазном носителе представляется более предпочтительным тест-объектом при создании биотеста для определения токсичности в воздушной среде. Однако использование агаровых блоков оказалось не лишено недостатков, поскольку, с одной стороны, в процессе нарезания блоков происходит нарушение структуры мицелия, с другой, — они не могут быть использованы при длительном мониторинге. Поэтому необходим дальнейший поиск возможностей создания твердофазного тест-объекта для разработки биосенсоров с целью определения токсичности не только в водной, но и в воздушной среде.

Таблица 3. Чувствительность люминесценции светящихся бактерий и грибов к действию химических веществ, мг/мл

Вещество	Чувствительность бактерий, мг/мл [19]	Чувствительность грибов, мг/мл*
HgCl ₂	2.7×10^{-8}	10^{-5}
CuSO ₄	1.2×10^{-2}	10^{-4} – 10^{-5}
Ацетат свинца	10^{-3}	10^{-5}
CoCl ₂	3×10^{-3}	10^{-5}
MnCl ₂	5×10^{-2}	10^{-3} – 10^{-5}
Бензохинон	4×10^{-8}	10^{-5}

* Результаты авторов данной работы.

Тем не менее, как следует из проведенных нами экспериментов, светящийся воздушный мицелий грибов на твердофазном носителе может быть использован в качестве тест-объекта биосенсоров. Более того, по чувствительности к воздействию модельных ТВ мицелиальные культуры исследованных грибов оказались близкими, а в некоторых случаях и более чувствительными по сравнению со светящимися бактериями (табл. 3).

Как известно, лиофилизированные светящиеся бактерии широко используются для обнаружения ТВ в водных источниках [4, 18]. Бактериальный биоломинесцентный биотест позволяет определить присутствие в пробах небольших количеств ТВ (табл. 3).

По полученным нами данным, светящийся грибной мицелий оказался более чувствительным по сравнению со светящимися бактериями к таким ТВ, как CuSO₄, ацетат свинца, CoCl₂ и MnCl₂ и менее чувствительным к воздействию бензохинона и хлорида ртути. Интересно отметить высокую чувствительность грибного свечения к присутствию солей алюминия и отдельных грибов к растворам солей вольфрама и цинка.

По данным зарубежных исследователей, сравнение чувствительности люминесценции светящихся грибов и рекомбинантных бактериальных люминесцентных биотестов к различным ТВ показало, что культура грибов *A. mellea* была более чувствительной к меди, чем бактериальные культуры *Pseudomonas fluorescence* 8866 и *Pseudomonas putida* F1, в то время как культура гриба *Mycena citricolor* оказалась менее чувствительной к этому ТВ [20, 21].

В настоящее время несколькими исследовательскими группами в мире предпринимаются попытки

создания биосенсоров на основе светящихся грибов. Так, бразильские исследователи использовали новый вид светящихся грибов *Gerronema viridilucens* в качестве тест-объекта биосенсора [22]. Светящийся глобулярный мицелий *A. mellea* и *M. citricolor* был использован в качестве тест-объектов британскими и новозеландскими исследователями [20–23]. При использовании биотестов на основе светящихся грибов для определения токсичности фенолов и солей тяжелых металлов показано, что для светящихся грибов падение люминесценции на 50% (EC₅₀) после действия фенолов и меди было того же порядка, что и для бактериальных биотестов [23]. Известны успешные попытки получить рекомбинантные светящиеся грибы *Neurospora* sp., and *Aspergillus* sp., содержащие гены люциферазы веслоногого рачка рода *Gaussia* и фотопротеина обелина для создания биосенсора [24]. Генетически модифицированные биолюминесцентные грибы *A. awamori* с геном рекомбинантного экворина были использованы для определения изменения концентрации ионов кальция под воздействием различных ТВ [25].

Таким образом, проведенные нами эксперименты показали, что воздушный мицелий светящихся грибов может быть использован в качестве тест-объекта биосенсора при соответствующей адаптации к условиям измерений. Для экспресс-тестирования достаточно воздействия ТВ на светящийся мицелий в течение 5 мин. Результаты наших экспериментов подтвердили и дополнили имеющиеся в литературе данные о том, что светящиеся грибы не уступают клеткам светящихся бактерий по чувствительности к воздействию модельных токсических веществ. Использование в качестве тест-объекта светящегося грибного мицелия на твердофазном носителе является перспективным направлением биотестирования, так как позволит использовать длительно светящийся тест-объект и проводить непрерывный мониторинг воздушной среды.

Авторы признательны сотрудникам Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН Псурцевой Н.В. и Беловой Н.В., а также Пашеновой Н.В. (Институт леса СО РАН) за предоставление культур светящихся грибов для проведения исследований.

Работа выполнена при частичной поддержке ФЦП (Государственный контракт № 02.512.11.2008).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuznetsov A.M., Rodicheva E.K., Medvedeva S.E. // *Luminescence*. 1999. V. 14. № 5. P. 263–265.
2. Gellert G. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000. V. 45. № 1. P. 87–91.
3. Ulitzur S., Lahav T., Ulitzur N. // *Environ. Toxicol.* 2002. V. 17. № 3. P. 291–296.
4. Родичева Э.К., Кузнецов А.М., Медведева С.Е. // *Вестник ОГУ*. 2004. Т. 5. С. 96–100.
5. Girotti S., Ferri E.N., Fumo M.G., Maiolin E. // *Anal. Chim. Acta*. 2008. V. 608. № 1. P. 2–29.
6. Bechor O., Smulski D.R., Van Dyk T.K., LaRossa R.A., Belkin S. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 94. № 1. P. 125–132.
7. Roda A., Pasini P., Mirasoli M., Michelini E., Guardigli M. // *TRENDS in Biotechnol.* 2004. V. 22. № 6. P. 295–303.
8. Wassink E.C. // *Bioluminescence in Action* / Ed. Herring P.J. London: Acad. Press, 1978. P. 171–197.
9. Herring P.J. // *Mycologist*. 1994. V. 8. № 4. P. 181–183.
10. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. N.Y.: World Sci. Publ. Co., 2006. 470 p.
11. Desjardin D.E., Capelari M., Stevani C.V. // *Mycologia*. 2007. V. 99. № 2. P. 317–331.
12. Desjardin D.E., Oliveira A.G., Stevani C.V. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. V. 7. № 2. P. 170–182.
13. Выдрякова Г.А., Псурцева Н.В., Белова Н.В., Пашенова Н.В., Гумельзон И.И. // *Микология и фитопатология*. 2009. Т. 43. № 5. С. 369–376.
14. Dunlap P.V., Kita-Tsakamoto K. *Luminous Bacteria* // *The Prokaryotes*, Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York, USA: Acad. Press, 2006. V. 2. P. 863–892.
15. O’Kane D.J., Lingle W.L., Porter D., Wampler J.E. // *Mycologia*. 1990. V. 82. № 5. P. 607–616.
16. Ячевский А.А. *Основы микологии* / Ред. Н.А. Наумов. М.-Л.: Ленсельхозгиз, 1933. 1035 с.
17. Decker H., Terwilliger N. // *J. Exp. Biol.* 2000. V. 203. № 12. P. 1777–1782.
18. Stom D.I., Geel T.A., Balayan A.E., Shachova G.I., Kuznetsov A.M., Medvedeva S.E. // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1992. V. 2. P. 203–208.
19. Родичева Э.К., Выдрякова Г.А., Медведева С.Е. *Каталог культур светящихся бактерий*. Новосибирск: Наука, 1997. 125 с.
20. Horswell J., Weitz H.J., Percival H.J., Speir T.W. // *Biol. Fertil. Soils*. 2006. V. 42. P. 569–576.
21. Weitz H.J., Colin D., Campbell C.D., Killham K. // *Environ. Microbiol.* 2002. V. 4. № 7. P. 422–429.
22. Mendes L., Prada S., Stevani C. // *Proceedings of the SET-AC 26th Annual Meeting in North America (USA)*. 2005. <http://abstracts.co.allenpress.com/pweb/setac2005/document/57331>
23. Paton G.I., Viventsova E., Kumpene J., Wilson M.J., Weitz H.J., Dawson J.J. // *Sci. Total. Environ.* 2006. V. 355. № 1–3. P. 106–117.
24. Патент Великобритании. 2004. № WO/2004/076685.
25. Kozlova O., Zwinderman M., Christofi N. // *BMC Microbiol.* 2005. V. 5. № 40. doi: 10.1186/1471-2180-5-40.

Effect of Organic and Inorganic Toxic Compounds on Luminescence of Luminous Fungi

G. A. Vydryakova, A. A. Gusev, and S. E. Medvedeva

Institute of Biophysics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia

e-mail: vydryakova@mail.ru

Received November 17, 2009

Abstract—The possibility of the development of the solid phase bioluminescent biotest using aerial mycelium of the luminous fungi was investigated. Effect of organic and inorganic toxic compounds (TC) at concentrations from 10^{-6} to 1 mg/ml on luminescence of aerial mycelia of four species of luminous fungi—*Armillaria borealis* (Culture Collection of the Institute of Forest, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences), *A. mellea*, *A. gallica*, and *Lampteromyces japonicus* (Fungi Collection of the Botanical Institute, Russian Academy of Sciences)—has been studied. Culture of *A. mellea* was shown to be most sensitive to solutions of the model TC. It was demonstrated that the sensitivity of the luminous fungi is comparable with the sensitivity of the bacteria that are used for environmental monitoring. Use of the aerial mycelium of the luminous fungi on the solid support as a test object is a promising approach in biotesting for the development of continuous biosensors for air monitoring.

УДК 582.284:547.99

МЕЛАНИН СТЕРИЛЬНОЙ ФОРМЫ *Laetiporus sulphureus*

© 2011 г. Д. Н. Оленников*, С. В. Агафонова**, А. В. Столбикова**, А. В. Рохин***

*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047
e-mail: oldaniil@rambler.ru

**Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

***Иркутский государственный университет, Иркутск, 664033

Поступила в редакцию 23.03.2010 г.

Из мицелия базидиального вида *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr получен меланиновый комплекс (выход 2.49% от массы сырья). С применением УФ-, ИК-спектроскопии, гель-хроматографии и щелочного расщепления установлено, что выделенный меланин был гетерогенен и относился к дигидронафталиновому типу. Данные ¹³C-ЯМР указывали на доминирование ароматических фрагментов в структуре меланина. В ходе исследования антиоксидантного действия методами *in vitro* установлено, что меланин *L. sulphureus* обладал антирадикальной активностью, а также обладал способностью к инактивации молекул пероксида водорода, оксида азота(II) и хелатированию ионов железа(II).

Меланины представляют собой широко распространенные в живом мире высокомолекулярные темноокрашенные пигменты, образующиеся в результате окислительной полимеризации фенольных соединений. В грибах меланины выполняют роль окислительно-восстановительных буферов, защищающих организм от воздействия УФ-радиации и свободных радикалов, вызывающих патологические последствия перекисного окисления липидов. Наличие данного вида активности у меланинов объясняется их способностью к связыванию и инактивации активных форм кислорода и хелатированию ионов переходных металлов, вызывающих процессы реакции Фентона, а также активизации ряда ферментов [1, 2].

Фармакологические исследования показали, что грибные меланины влияют на процессы клеточного метаболизма, регулируют окислительно-восстановительные процессы, гормональный обмен, а также защищают организм от воздействия агентов мутагенной и канцерогенной природы [3]. Для данного класса макромолекулярных соединений выявлено выраженное адаптогенное, стресс-протекторное и нейрорегуляторное действие при общей низкой токсичности [4]. Также установлено, что меланины, их предшественники и производные оказывают положительное влияние при лечении ряда нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, слабоумие и др.) [5].

Наличие меланиноподобных соединений в базидиомицетах характерно для их стерильных форм, среди которых наиболее известным примером является чага – стерильная форма *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. [6]. Наряду с другими соединениями именно присутствие меланина в чаге обуславливает ее широкое использование в современной терапевти-

ческой практике для лечения желудочно-кишечных и онкологических заболеваний [7]. Учитывая факт недостаточной в пределах России сырьевой базы *I. obliquus*, перспективными являются исследования по изысканию новых источников меланиновых соединений базидиальной природы.

Нами продолжено исследование химического состава базидиального вида *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr, в ходе которого изучен состав низкомолекулярных соединений и полисахаридов [8–10], а также установлено, что наибольшее накопление экстрактивных компонентов грибной клетки приходится на стерильные стадии развития базидиомицета [11, 12]. Более того, для стерильной формы данного вида характерна интенсивная темная пигментация, обусловленная наличием меланиновых соединений, природа которых ранее не изучалась.

Цель работы – определение химической природы и антиоксидантной активности меланина стерильной формы *L. sulphureus*.

МЕТОДИКА

Получение мицелия. Материалом для исследования являлся 21-суточный разросшийся мицелий *L. sulphureus* с зачатками плодовых тел (примордий). Мицелий выращивали в среде с сусло-агаром (8° по Баллингу) в чашках Петри при 23°C. На 18 сут проводили инокуляцию агаризированным мицелием древесных блоков *Larix sibirica* Ledb., которые термостатировали при 21°C. На 21 сут поверхностный мицелий с образовавшимися примордиями удаляли и высушивали.

Таблица 1. Характеристика фракций меланина *L. sulphureus*

Фракция	Содержание меланина, %	Молекулярная масса, кДа	E ₄₆₅ /E ₆₆₅
ЛМ-1	6.9 ± 0.2	63	3.18
ЛМ-2	11.3 ± 0.4	34	3.36
ЛМ-3	80.8 ± 2.4	9.1	9.75

Выделение меланина. Высушенное и измельченное сырье *L. sulphureus* (300 г) экстрагировали в аппарате Сокслета последовательно гексаном, хлороформом, этилацетатом и ацетоном. Обезжиренное сырье высушивали до полного удаления растворителей, после чего экстрагировали водой на кипящей водяной бане (модуль 1 : 50; 4-кратная экстракция по 60 мин). Водные извлечения центрифугировали (30 мин, 6000 г) и после объединения супернатантов подкисляли 6 М HCl до значения pH 2.0. Через 2 ч выпавший осадок центрифугировали (20 мин, 6000 г), суспендировали в 20%-ной HCl и оставляли на 5 сут при 5°C. Полученную смесь центрифугировали (30 мин, 6000 г), осадок промывали водой до нейтральной реакции, высушивали в вакуум-сушильном шкафу ШСВ-65 (Россия) при -0.09 МПа в течение 6 ч и хранили в эксикаторе над P₂O₅. Выход составил 7.47 г (2.49% от массы сырья).

Спектроскопические исследования проводили на спектрофотометре UV-Vis mini ("Shimadzu", Япония) в кварцевых кюветках 10 мм. Регрессионный анализ выполняли с применением пакета программ Advanced Grapher 2.11 ("Alentum Software Inc.", США). Элементный состав определяли на элементном анализаторе Flash EA 1112 ("Thermo Finnigan", Германия). Содержание карбоксильных и фенольных гидроксильных групп устанавливали потенциометрическим методом на pH-метре pH-410 ("Аквилон", Россия) [13]. Температуру плавления определяли на приборе IA-9100 ("Electrothermal", Великобритания).

Гель-хроматография. Использовали сефадекс G-100 ("Pharmacia", Швеция), элюент — 0.5%-ный NaHCO₃, скорость потока — 200 мкл/мин, объем элюатов — 1 мл, температура колонки — 20°C. Колонку градуировали с использованием стандартов декстранов с молекулярными масса-

ми 100, 70, 50, 20, 10 кДа ("Fluka", Швейцария). Внешний объем колонки определяли по синему декстрану (2000 кДа, "Pharmacia", Швеция). Концентрация раствора меланина — 10 мг/мл, стандартов декстранов — 1 мг/мл, объем вводимой пробы — 1.5 мл. Объем выхода определяли спектрофотометрическим методом при 280 нм, количественный анализ геле-хроматограмм — с использованием программы Leonardo 1.01 ("Наука плюс", Россия). Дополнительно элюаты обрабатывали 0.01%-ным раствором 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида ("MP Biomedicals Inc.", США) в метаноле в соотношении 1 : 1, после чего определяли оптическую плотность полученных растворов через 15 мин при 520 нм.

ИК-спектроскопия. Образцы для анализа растворяли в 1%-ном растворе KOH, раствор наносили на пластины из таллий-бром-йодного стекла (KPC-5) и высушивали в вакууме. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Spectrum 100 ("Perkin-Elmer", США) в пленке в интервале 4000–450 см⁻¹.

Щелочное расщепление меланина. Навеску меланина (20 мг) нагревали при 250°C в фарфоровом тигле со 100 мг тонко измельченного KOH в течение 4 мин. После охлаждения смесь растворяли в 5 мл воды, раствор нейтрализовали раствором 80%-ной H₂SO₄ до pH 4.0–5.0 и подвергали полученную смесь жидкофазной экстракции этилацетатом (3-кратно по 2 мл). Экстракты объединяли, концентрировали в вакууме досуха, сухой остаток растворяли в 100 мкл метанола и анализировали методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

Анализ ВЭТСХ. Использовали пластины Сорбфил ПТСХ-АФ-В ("Имид Ltd.", Россия) 15 × 10 см. По 2 мкл исследуемого раствора и 0.5%-ных растворов стандартных веществ наносили микрошприцем на стартовую линию пластины полосами 8 мм. Далее образцы хроматографировали в системе растворителей толуол–метанол–уксусная кислота (45 : 8 : 4) при 20°C в вертикальной камере на высоту 70 мм, после чего пластины высушивали, обрабатывали методом погружения 1%-ным раствором KMnO₄ в 80%-ном этаноле и просушивали на термостойке при 60°C течение 10 с. Денситограммы получали с использованием планшетного сканера Bear Paw

Таблица 2. Относительная интенсивность различных участков ¹³C-ЯМР-спектров грибных меланинов, % от общей интенсивности

Меланин	Участок спектра, м. д.						
	220–160	160–140	140–110	110–90	90–60	60–45	45–0
<i>L. sulphureus</i>	17	4	28	9	15	5	22
<i>Hendersonula toruloidea</i> [23]	15	8	16	9	18	11	20

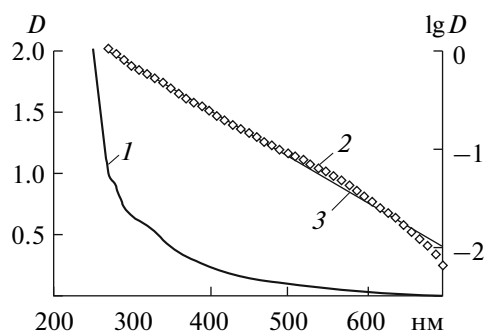


Рис. 1. Спектр поглощения 0.01%-ного раствора меланина *L. sulphureus* (1), зависимость логарифма оптической плотности от длины волны (2) и график линейной регрессии для зависимости $\lambda - \lg D$ (3).

2400CU Plus (“Mustek System Inc.”, Япония) и пакета программ Сорбфил ТСХ Видеоденситометр 2.0 (“Имид Ltd.”, Россия). В качестве стандартных образцов использовали пирогаллол, флороглюцин, бензойную, салициловую, вератровую, гентизиновую, ванилиновую, сиреневую, п-оксибензойную, протокатеховую и галловую кислоты (“Fluka”, Швейцария).

Продукты щелочного расщепления меланина.

Выделение продуктов проводили с применением препаративной тонкослойной хроматографии, для чего этилацетатные экстракты, полученные после щелочного расщепления меланина, хроматографировали в условиях, описанных выше. Зоны веществ вырезали, элюировали 80%-ным этанолом и перекристаллизовывали из метанола. Получено три вещества, идентифицированных с 4-гидроксибензойной ($C_7H_6O_3$, т. пл. $215^\circ C$; УФ-спектр: 207, 252 нм), 3,4-диметоксибензойной ($C_9H_{10}O_4$, т. пл. $180^\circ C$; УФ-спектр: 220, 271 нм) и 3,5-диметокси-4-гидроксибензойной кислотами ($C_9H_{10}O_5$, т. пл. $207^\circ C$; УФ-спектр: 210, 264 нм).

Спектроскопия ЯМР. Спектры ^{13}C -ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S (“Varian”, США), рабочая частота 125.7 МГц. Спектры получены для 1%-ного раствора в 5%-ном NaOD.

Антиоксидантная активность. Антирадикальную активность меланина *L. sulphureus* определяли с использованием радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила [14], исследование связывания супероксидных радикалов проводили в неэнзиматической системе с использованием феназин метасульфата и НАДН [15], определение инактивации молекул пероксида водорода осуществляли с использованием фенолового красного [16], определение связывания молекул оксида азота(II) проводили по реакции с нитропруссидом натрия и реактивом Грисса [16], хелатирование ионов Fe^{2+} — фенантролиновым методом [17]. В

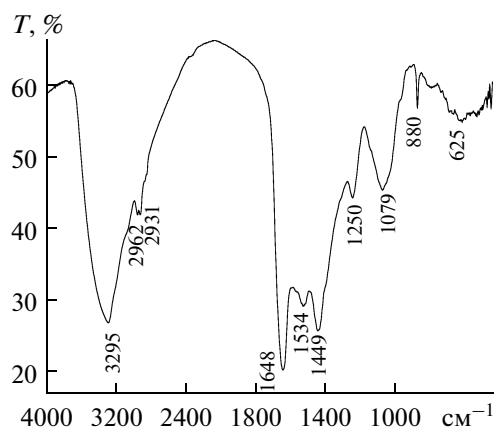


Рис. 2. ИК-спектр меланина *L. sulphureus*. Цифрами обозначены величины волновых чисел полос поглощения.

качестве стандартного соединения использовали галловую кислоту (“Fluka”, Швейцария).

Токсичность. Острую токсичность меланина *L. sulphureus* определяли на крысах линии *Wistar* по стандартной методике [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выделения из мицелия *L. sulphureus* был получен препарат меланина, представлявший собой аморфное вещество, темно-коричневого цвета, нерастворимое в воде, кислотах и органических растворителях, но хорошо растворимое в водных растворах щелочей. Известно, что процесс синтеза меланогенных продуктов происходит с участием различных фенолаз, которые могут ковалентно связываться с полимерными продуктами реакции и загрязнять выделяемый препарат меланина [19]. Поэтому для очистки выделенный меланин обрабатывали 20%-ным раствором HCl, которая разрушает аминные связи, не затрагивая основной меланиновый каркас.

Раствор меланина *L. sulphureus* проявлял реакции, используемые для качественной идентификации данного класса биополимеров: осаждение под действием кислот, $FeCl_3$, $AgNO_3$, обесцвечивание с H_2O_2 и $KMnO_4$, дитионитферрицианидный тест [20]. Исследование элементного состава меланина показало, что в нем содержится 49.0% C, 6.3% H, 2.3% N и 42.4% O, экстинкция 0.001%-ного раствора меланина при 465 нм составляла 0.038, содержание карбоксильных и фенольных гидроксильных групп 1.42 ± 0.04 и $2.26 \pm 0.07\%$ соответственно.

УФ-спектр щелочного раствора меланина *L. sulphureus* типичен для представителей данного класса соединений; в нем отсутствовали полосы поглощения в видимом диапазоне длин волн и

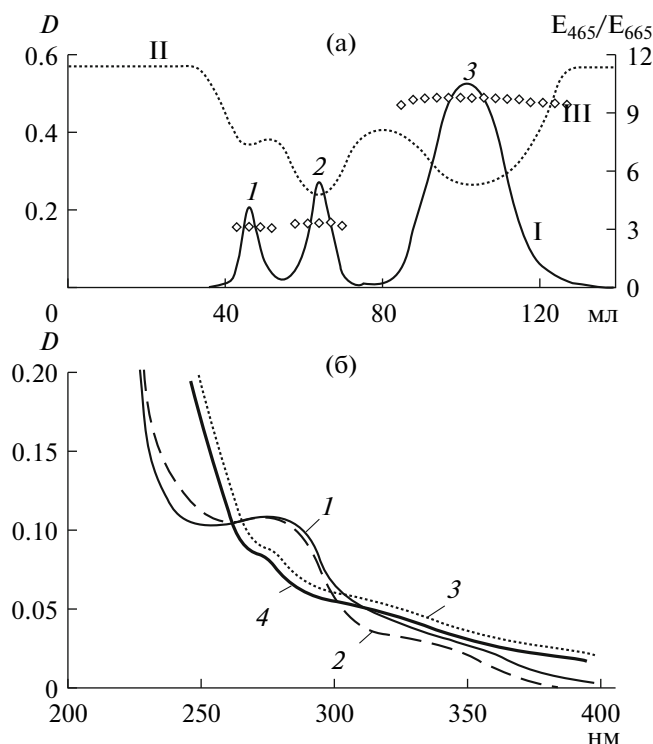


Рис. 3. Профиль элюции меланина *L. sulphureus* на сефадексе G-100 (а) и спектры поглощения в области 200–400 нм (б). I – при 280 нм, II – после обработки ДФПГ при 520 нм, III – хроматический коэффициент E_{465}/E_{665} элюатов. Фракции меланина: 1 – ЛМ-1, 2 – ЛМ-2, 3 – ЛМ-3, 4 – исходный препарат.

имелись два плеча в УФ-области (280 и 328 нм), обусловленные наличием в структуре комплекса конъюгированных фрагментов (рис. 1). В спектре поглощения обнаружена особенность, типичная для меланиновых пигментов: зависимость логарифма оптической плотности ($\lg D$) от длины волны (λ) носила линейный характер. Регрессионный анализ показал, что в уравнении данной зависимости ($\lg D = -0.0046\lambda + 1.2239$) величина коэффициента детерминации (r^2) составляла 0.993, а значение a в уравнении регрессии соответствовало ранее полученным данным [21]. Хроматический коэффициент E_{465}/E_{665} меланина *L. sulphureus* был равен 9.31, что свидетельствует о незначительном содержании в структуре алифатических фрагментов [13].

В ИК-спектре меланина присутствовали интенсивные полосы в области 1000–1800 см^{-1} , обусловленные наличием различно замещенных С–О- и С–N-функциональных групп (рис. 2). Поглощение в области 1600 см^{-1} появлялось вследствие влияния фенольных, аминных, амидных, высоко конъюгированных хиноидных и карбоксильных групп. Учитывая невысокое содержание азота в составе препарата, данная полоса вызвана, главным образом, влиянием системы ароматических колец

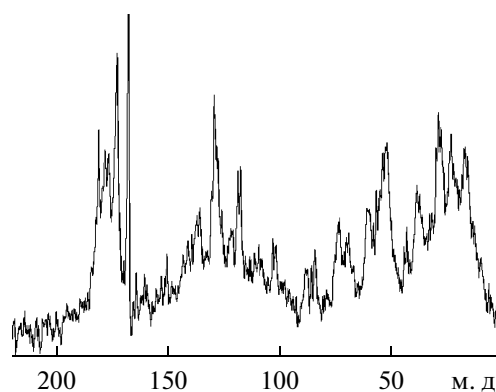


Рис. 4. ^{13}C -ЯМР-спектр меланина *L. sulphureus*.

и СООН-групп. Существование алифатических фрагментов подтверждалось полосами в области 2900 и 1449 см^{-1} ; появлению колебаний при 1050–1250 см^{-1} способствовали гидроксильные (спиртовые) и фенольные функциональные группы [22].

Гель-хроматография показала, что меланин *L. sulphureus* представляет собой смесь трех веществ: ЛМ-1, ЛМ-2 и ЛМ-3 с молекулярными массами 63, 34 и 9.1 кДа соответственно (рис. 3а). Доминирующим был низкомолекулярный компонент ЛМ-3, содержание которого составляло 80.8% (табл. 1). В УФ-спектрах ЛМ-1 и ЛМ-2 установлено наличие максимумов при 280 нм и плеча в области 340–360 нм, а величины хроматических коэффициентов E_{465}/E_{665} составляли 3.18 и 3.36 соответственно, что свидетельствует о значительном содержании алифатических фрагментов в структуре указанных компонентов (рис. 3б). Спектр ЛМ-3 повторял таковой исходного меланина, а значение $E_{465}/E_{665} = 9.75$ указывало на доминирование конденсированных фенольных остатков.

В продуктах щелочной деструкции меланина *L. sulphureus* методом ВЭТСХ обнаружено пять веществ, три из которых были выделены и идентифицированы по данным хроматографической подвижности, температуры плавления и УФ-спектрам с 4-гидроксibenзойной (85% от массы продуктов гидролиза), 3,4-диметоксибензойной (5%) и 3,5-диметокси-4-гидроксibenзойной кислотами (7%). Характер щелочного расщепления свидетельствует о том, что меланин *L. sulphureus* содержал в составе преимущественно фрагменты дигидронафталинового типа, дающие при щелочном расщеплении 4-гидроксibenзойную кислоту, с небольшими включениями остатков пирокатехинового и пирогаллового типов, распадающихся до 3,4-диметоксибензойной и 3,5-диметокси-4-гидроксibenзойной кислот соответственно.

Дальнейшее изучение меланина *L. sulphureus* проводилось с применением ^{13}C -ЯМР-спектроскопии; ^{13}C -ЯМР-спектр приведен на рис. 4.

Таблица 3. Антиоксидантная активность меланина *L. sulphureus*

Препарат	IC ₅₀ , мкг/мл				
	ДФПГ*	O ₂ ⁻	NO	H ₂ O ₂	Fe ²⁺
Меланин <i>L. sulphureus</i>	57.8 ± 1.5	50.4 ± 1.5	311.8 ± 9.4	21.3 ± 0.6	32.4 ± 0.9
Галловая кислота	4.4 ± 0.1	11.8 ± 0.3	192.4 ± 5.4	52.4 ± 1.1	> 5000

* ДФПГ – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил.

Исследования в области ¹³C-ЯМР-спектроскопии грибных меланинов немногочисленны и были проведены для небольшого числа полимеров. Наличие сложной нерегулярной структуры у меланинов приводит к тому, что их ¹³C-ЯМР-спектры содержат набор сложно идентифицируемых сигналов. Общая методология ¹³C-ЯМР-анализа заключается в определении вида спектра и интегральных интенсивностей определенных его участков [23]. В ¹³C-ЯМР-спектре меланина *L. sulphureus* наблюдалась большая интенсивность участков ароматических фрагментов (область 160–110 м. д., 32%) и меньшая для алифатических структур (60–0 м. д., 27%), что обусловлено содержанием компонента ЛМ-3 в составе препарата (табл. 2). Наличие максимумов в области спектра 220–160 м. д. (~17%) подтверждало присутствие карбоксильных групп.

При изучении антирадикальной активности меланина *L. sulphureus* с использованием свободного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила установлено, что величина 50%-ного связывания (IC₅₀) равна 57.8 мкг/мл, подтверждающая выраженное радикал-связывающее действие (табл. 3). В пересчете на доминирующий компонент ЛМ-3 это означает, что 1 молекула меланина может связывать до 6–7 молекул 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила. С применением постхроматографического проявления элюатов при гель-хроматографическом исследовании меланина *L. sulphureus* установлено, что наиболее эффективным компонентом был ЛМ-2 (рис. 3а). Процесс инактивации супероксидных радикалов происходил более активно, т.к. IC₅₀ = 50.4 мкг/мл. Связывание 50% молекул оксида азота(II) происходило при концентрации препарата 311.8 мкг/мл, т.е. исследуемый меланин является менее активным по отношению к данной молекуле. Наибольшие показатели эффективности отмечены при исследовании процессов инактивации молекул пероксида водорода и хелатирования ионов железа(II), величины IC₅₀ для которых составляли 21.3 и 32.4 мкг/мл соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у меланинового комплекса *L. sulphureus* выраженной антиоксидантной активности.

На модели острой токсичности у крыс показало, что меланин *L. sulphureus* являлся малотоксичным (LD₅₀ > 5000 мг/кг).

Таким образом, в результате проведенных исследований изучен меланиновый комплекс стерильной формы *L. sulphureus*, представляющий собой смесь трех полимеров фенольной природы ЛМ-1, ЛМ-2 и ЛМ-3 с молекулярными массами 63, 34 и 9.1 кДа соответственно; компонент ЛМ-3 был доминирующим. С применением химических и спектральных методов установлено, что меланин *L. sulphureus* относится к дигидронафталиновому типу и характеризуется доминированием конденсированных фенольных фрагментов.

К настоящему времени меланины дигидронафталинового типа были обнаружены в микромицетах классов дейтеромицетов (*Aspergillus carbonarius*, *Alternaria alternata*, *Paecilomyces variotti*) [24], аскомицетов (*Asperisporium caricae*, *Pleurophragmium* sp., *Tuber melanosporum*) [25], дотидеомицетов (*Phyllosticta capitata*) [26], леотиомицетов (*Sclerotinia sclerotiorum*) [27] и других. Следует отметить, что исследования меланинов базидиомицетов немногочисленны: известно, что они отличаются высокой степенью ароматичности (*Cerrena maxima*) [21] и могут принадлежать к пирокатехиновому (*Inonotus obliquus*, *Phellinus robustus*) [28] и γ-глутаминил-п-оксибензольному типам [1]. Присутствие меланина дигидронафталинового типа в базидиальном виде установлено впервые.

Результаты изучения биологической активности меланина *L. sulphureus* показали, что его можно рекомендовать для использования в качестве эффективного и безопасного пищевого или фармацевтического антиоксиданта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 08-04-98045) и Лаврентьевского конкурса молодых ученых СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bell A.A., Wheeler M.H. // Annu. Rev. Phytopathol. 1986. V. 24. № 3. P. 411–451.
2. Jacobson E.S. // Clin. Microbiol. Rev. 2000. V. 13. № 4. P. 708–717.
3. Борщевская М.И., Васильева С.М. // Вопросы мед. химии. 1999. Т. 45. № 1. С. 13–23.
4. Жеребин Ю.А. // Докл. АН УССР. Серия Б. 1984. № 3. С. 64–68.

5. Григорян Э.Н., Миташов В.И. // Онкогенез. 1979. Т. 10. № 2. С. 137–144.
6. Бабицкая В.Г., Шерба В.В., Иконникова Н.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 4. С. 439–444.
7. Shashkina M.Ya., Shashkin P.N., Sergeev A.V. // Pharm. Chem. J. 2006. V. 40. № 10. P. 560–568.
8. Agafonova S.V., Olennikov D.N., Borovskii G.B., Penzina T.A. // Chem. Natural Comp. 2007. V. 43. № 6. P. 687–688.
9. Оленников Д.Н., Агафонова С.В., Боровский Г.Б., Пензина Т.А., Рохин А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 5. С. 597–605.
10. Оленников Д.Н., Агафонова С.В., Боровский Г.Б., Пензина Т.А., Рохин А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 693–697.
11. Агафонова С.В., Боровский Г.Б., Пензина Т.А., Оленников Д.Н. // Успехи мед. микологии. 2007. Т. 9. С. 208–209.
12. Olennikov D.N., Agafonova S.V., Nazarova A.V., Borovskii G.B., Penzina T.A. // Chem. Natural Comp. 2008. V. 44. № 6. P. 762–763.
13. Королева О.В., Куликова Н.А., Алексеева Т.Н., Степанова Е.В., Давидчук В.Н., Беляева Е.Ю., Цветкова Е.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 61–67.
14. Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. // Phytochemistry. 2006. V. 67. № 18. P. 2058–2070.
15. Chen A.-S., Taguchi T., Sakai K., Kikuchi K., Wang M.-W., Miwa I. // Biol. Pharm. Bull. 2003. V. 26. № 9. P. 1326–1330.
16. Govindarajan R., Rastogi S., Vijayakumar M. // Biol. Pharm. Bull. 2003. V. 26. № 10. P. 1424–1427.
17. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н., Торопова А.А., Ибрагимов Т.А. // Химия растит. сырья. 2008. № 4. С. 95–100.
18. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Ред. Р.У. Хабриев. М.: Медицина, 2000. С. 18–24.
19. Metter J.M., Townsel M.E., Moore C.L., Williamson G.D., Soteres B.J., Fisher M.S., Willis I. // Pigm. Cell Res. 1990. V. 3. № 2. P. 90–97.
20. Modern Methods of Plant Analysis / Eds. K. Paech, M.V. Tracey. Berlin: Springer-Verlag, 1955. V. 4. P. 661–675.
21. Suryanarayanan T.S., Ravishankar J.P., Venkatesan G., Murali Th.S. // Mycol. Res. 2004. V. 108. № 8. P. 974–978.
22. Pierce J.H., Rast D.M. // Phytochemistry. 1995. V. 39. № 1. P. 49–55.
23. Knicker H., Almendros G., Gonzalez-Vila F.J., Lodemann H.-D., Martin F. // Org. Geochem. 1995. V. 23. № 11–12. P. 1023–1028.
24. Бабицкая В.Г., Шерба В.В., Филимонова Т.В., Григорчук Е.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 2. С. 153–159.
25. Paim S., Linhares L.F., Mangrich A.S., Martin J.P. // Biol. Fertil. Soils. 1990. V. 10. № 1. P. 72–76.
26. De Angelis F., Arcadi A., Marinelli F., Paci M., Botti D., Pacioni G., Miranda M. // Phytochemistry. 1996. V. 43. № 5. P. 1103–1106.
27. Butler M.J., Gardiner R.B., Day A.W. // Mycologia. 2009. V. 101. № 3. P. 296–304.
28. Бабицкая В.Г., Шерба В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 3. С. 286–291.

Melanin of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr Sterile Form

D. N. Olennikov^a, S. V. Agafonova^b, A. V. Stolbikova^b, and A. V. Rokhin^c

^a Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia
e-mail: oldaniil@rambler.ru

^b Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

^c Irkutsk State University, Irkutsk, 664033

Received March 23, 2010

Abstract—Melanin complex was isolated from mycelium of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr (with a yield of 2.49% of the fresh weight). UV and IR spectroscopies, gel chromatography, and alkaline cleavage assay demonstrated that the isolated melanin was heterogeneous and belonged to the dihydronaphthalene type. ¹³C-NMR data suggested that aromatic fragments were dominant in the melanin structure. In vitro study of the antioxidant action demonstrated that the *L. sulphureus* melanin displayed a radical-scavenging activity and the ability to inactivate hydrogen peroxide and nitrogen(II) oxide molecules and to chelate iron(II) ions.

УДК 579.262: 579.64:631.46

БИОИНЖЕНЕРИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ: СОЗДАНИЕ НОВЫХ АССОЦИАТИВНЫХ СИМБИОЗОВ С ПОМОЩЬЮ ЛЕКТИНОВ НА ПРИМЕРЕ ТАБАКА И РАПСА

© 2011 г. З. Р. Вершинина, Ан. Х. Баймиев, Д. К. Благова, А. В. Князев,
Ал. Х. Баймиев, А. В. Чемерис

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054
e-mail: zilyaver@mail.ru

Поступила в редакцию 18.04.2010 г.

С помощью дикого штамма *Agrobacterium rhizogenes* 15834, трансформированного плазмидой pSAMBA 1305.1, содержащей полноразмерный ген лектина гороха посевного *psl*, получены трансгенные по гену лектина “бородатые корни” на табаке и рапсе. Исследовано влияние экспрессии гена лектина на колонизацию трансгенных корней симбиотом гороха посевного *Rhizobium leguminosarum*. Численность адгезированных бактерий на трансформированных геном лектина корнях оказалась выше в ≈ 14 (табак) и ≈ 37 (рапс) раз, по сравнению с контролем, что доказывает взаимодействие *R. leguminosarum* с лектином гороха на поверхности трансформированных корней табака и рапса. Разработанный экспериментальный подход, основанный на симуляции процессов узнавания и ранних симбиотических взаимодействий с помощью лектинов бобовых растений, в перспективе может быть использован для получения стабильных ассоциаций экономически ценных несимбиотрофных видов растений с ризобиями.

К ассоциативным симбиозам относят многочисленные взаимодействия растений с разнообразными колонизирующими корень диазотрофами, например с бактериями родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Klebsiella*, некоторыми штаммами *Clostridium*, цианобактериями родов *Anabaena*, *Calothrix*, *Gloeothechia*, *Nostoc*, фотосинтезирующими бактериями родов *Chromatium*, *Rhodospirillum*, археями *Methanococcus* [1, 2]. Эффективность азотфиксации в подобных системах по сравнению с клубеньковыми симбиозами незначительна, однако ассоциативные азотфиксаторы помогают растению в его росте и развитии путем синтеза фитогормонов, улучшения минерального питания, защиты от фитопатогенов и разрушения токсических веществ [3].

Ризосфера, в отличие от азотфиксирующих клубеньков, не является структурно ограниченной симбиотической нишей и специфичность ее колонизации почвенными микробами относительно невелика. Однако состав ризосферной микрофлоры можно сделать гораздо более контролируемым путем придания растению способности синтезировать специфические вещества, распознаваемые определенными микросимбионтами. Использование подобной стратегии дает ключ к конструированию “искусственной ризосферы”, специфически колонизируемой только теми микробами, которые выполняют полезные для растений трофические, ростостимулирующие или защитные функции [4].

Лектины – белки, способные узнавать и избирательно связывать разнообразные углеводы. Как показали исследования последних лет, функции лектинов у растений чрезвычайно многообразны. Эти белки участвуют в межклеточных взаимодействиях, регулируют взаимоотношения с бактериями-симбионтами, защищают растения от патогенных бактерий и грибов и от растительноядных животных, участвуют в транспорте гормонов, белков и РНК, а также влияют на деление, рост и дифференцировку клеток. Накопленные за последние десятилетия данные свидетельствуют о том, что, по крайней мере, лектины злаковых и бобовых растений могут связываться с бактериями-симбионтами, в том числе и с ассоциативными, вызывая у них перестройки, значимые для формирования и функционирования симбиоза [5]. Таким образом, модификация процессов узнавания и ранних симбиотических взаимодействий с помощью лектинов – это интересный экспериментальный подход для получения новых симбиозов растений с азотфиксирующими микроорганизмами.

Вирулентные штаммы *Agrobacterium rhizogenes*, содержащие Ri-плазмиды, способны трансформировать клетки многих двудольных растений с образованием “бородатых корней”. Растения, которые регенерируют из такой трансформированной ткани, часто морфологически изменены из-за встраивания в геном растения дополнительного локуса *rol*. Это значительно ограничивает возможности коммерческого использования подобных растений [6].

Однако трансгенные “бородатые корни” — это замечательная модель для проведения различного рода экспериментов, в том числе и по созданию искусственных симбиотических систем [7–10]. В ряде работ показано, что “бородатые корни” способны к нормальному клубенькообразованию с различными микросимбионтами [11, 12].

Табак (*Nicotiana tabacum*) и рапс (*Brassica napus* L. var. *napus*) входят в число несимбиотрофных видов растений, которые не вступают в симбиоз ни с ризобиями, ни с актиномицетами [13], поэтому большой интерес вызывает создание искусственных ассоциативных симбиозов этих растений с клубеньковыми бактериями. Отметим, что табак — прекрасное модельное растение для генетических манипуляций, а рапс является одной из наиболее ценных и перспективных сельскохозяйственных культур.

На сегодняшний день существуют несколько работ по созданию ассоциаций каллусной ткани табака с различными азотфиксирующими микросимбионтами, в частности с ризобиями [14] и цианобактериями [15]. Также на корнях табака были получены азотфиксирующие псевдоклубеньки при использовании ассоциативных комплексов микроорганизмов, выделенных из природных синцианозов саговниковых растений и папоротников рода *Azolla* [16].

подавляющее большинство работ по ассоциативным микросимбионтам рапса посвящены улучшению минерального питания растений. *Delftia acidovorans* и *Achromobacter piechaudii* ускоряют рост растений и повышают урожайность, так как активно участвуют в метаболизме соединений серы [17]. Представители родов *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Bacillus* и *Azotobacter* могут выступать в качестве ассоциативных азотфиксирующих партнеров [18].

Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, фиксирующие азот в симбиозе с бобовыми растениями, могут выступать в качестве ассоциативных микросимбионтов для многих экономически ценных небобовых культур, таких, как рис, кукуруза, пшеница, рапс, подсолнечник и т.д. Эти бактерии способны колонизировать корневую систему и повышать урожайность растений, выделяя ростостимулирующие вещества и защищая от фитопатогенов. Как показали исследования последних лет, ризобии принимают активное участие в усвоении растениями труднорастворимых соединений фосфора и даже, проникая в надземную часть растения, могут усиливать процесс фотосинтеза [19–27]. Поэтому получение искусственных симбиотических ассоциаций этих бактерий является одним из наиболее перспективных направлений на пути создания экологически ориентированного сельского хозяйства.

В данной работе был использован ген лектина гороха посевного *psl*, так как этот лектин является

наиболее изученным по сравнению с лектинами других бобовых растений, и природный микросимбионт гороха посевного *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Цель работы — получение трансгенных по гену лектина гороха посевного (*psl*) “бородатых корней” на табаке и рапсе и анализ колонизации трансгенных корней симбионтом гороха посевного *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

МЕТОДИКА

Вектор для трансформации растений и бактериальные штаммы. В экспериментах был использован бинарный вектор pCAMBIA1305.1, любезно предоставленный фирмой “Cambia” (Австралия) [<http://www.cambia.org.au>]. Данный вектор, способный реплицироваться в клетках и *E. coli* и *Agrobacterium* sp., содержит в области T-ДНК репортерный ген *gus* с каталазным интроном, ответственный за расщепление β-D-глюкуронидов, и селективный ген *hptII* гигромицинофосфотрансферазы, придающей устойчивость к гигромицину. Для анализа симбиотических реакций в T-ДНК вектора был клонирован ген лектина гороха посевного *psl* [28] под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (рис. 1). Генетическая конструкция pCAMBIA1305.1-*psl* была перенесена методом электропорации в штамм *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834, полученный из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Санкт-Петербург).

Для экспериментов по получению “бородатых корней” использовали 2 сут культуры *A. rhizogenes* (pCAMBIA1305.1-*psl*) и *A. rhizogenes* (исходный), выращенные при 28°C на качалке (150 об/мин) в жидкой среде TY (состав %): дрожжевой экстракт — 0.1, бакто-триптон — 1, CaCl₂ — 0.1), с добавлением 100 мг/л канамицина и 200 мкМ ацетосирингона в первом случае, и только ацетосирингона во втором [29].

Перед инокуляцией культуры агробактерий центрифугировали (2054 g, 10 мин) и ресуспендировали в жидкой среде Min A [30]. Плотность суспензии агробактерий была доведена до 10⁸ КОЕ/мл с использованием спектрофотометра СФ-46 (Россия).

Получение “бородатых корней” на листовых пластинках табака. Для получения “бородатых корней” были использованы растения *Nicotiana tabacum* сорта SR-1 2 мес возраста. Срезались листья табака от здорового растения, росшего в стандартных условиях полива, температуры и освещения [31]. Листья промывали 70%-ным этанолом, затем стерилизовали с дальнейшей 5-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой. После этих процедур листья переносили в стерильные чашки Петри, отрезали побелевшие края и

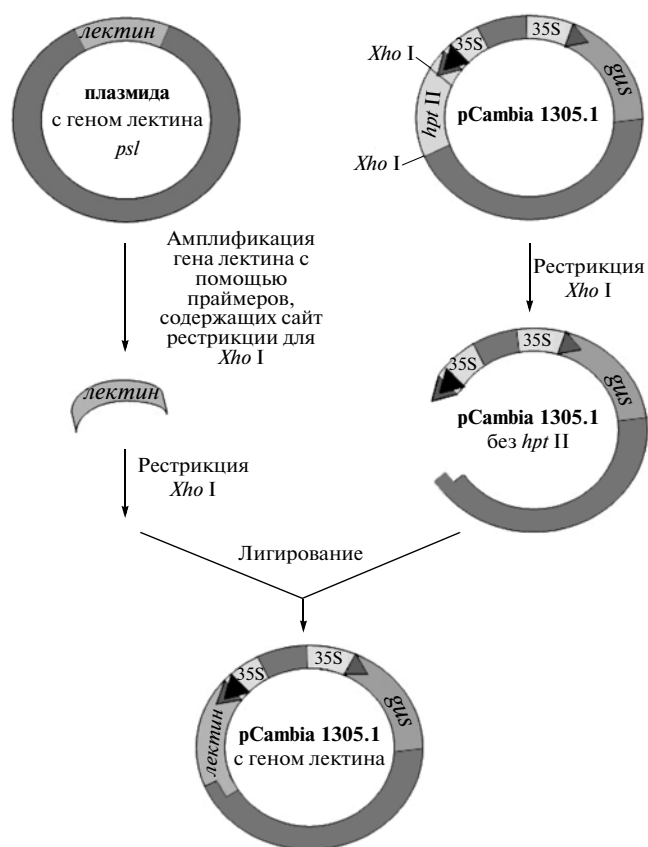


Рис. 1. Схема клонирования гена лектина *psl* семян гороха в составе вектора *pCambia 1305.1*.

стерильным скальпелем нарезали на экспланты размером примерно 0.5 см^2 . Далее экспланты выдерживали в течение 15 мин в суспензии агробактерий и переносили в чашки Петри, содержащие по 20–25 мл агаризованной среды MS [32]. Часть эксплантов оставляли в качестве контроля и переносили в чашки Петри без инокуляции агробактериями. После 4 сут совместного культивирования производилась отмывка эксплантов от агробактерий и их помещение на среду MS с добавлением аугментина и цефотаксима (по 250 мг/л). В дальнейшем тщательно следили за чашками, во избежание их зарастания агробактериями и при необходимости экспланты промывали антибиотиком.

После достижения “бородатыми корнями” длины 3–4 см проводили их гистохимический анализ на *gus*-активность и ПЦР-анализ ДНК на наличие гена лектина. В качестве контрольных “бородатых корней” выступали корни, полученные с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*.

Получение композитных растений рапса. Поверхность семян рапса сорта Hanna стерилизовали в течение 1 мин в 70%-ном спирте и затем 20 мин в 5%-ном растворе гипохлорита натрия с добавлением нескольких капель Твин-20. После 5-кратной промывки стерильной водой семена проращи-

вали на среде, содержащей половину дозы солей среды MS, 10% сахарозы, 8 г/л агарозы (pH 5.7), в течение 1 сут при 8°C в темноте, а затем в течение 4–5 сут при 25°C и 16-часовом световом дне в климатической камере KBW 240 (“Binder”, Германия).

Недельные проростки растений длиной 1–2 см инокулировали суспензией *A. rhizogenes* с помощью инсулинового шприца, делая укол в зоне гипокотыля. Для повышения эффективности инокуляции растения содержали в условиях высокой влажности. Для получения контрольных “бородатых корней” растения были инокулированы исходным штаммом *A. rhizogenes* (без *pCAMBIA1305.1-psl*).

После достижения “бородатыми корнями” длины 3–4 см проводили их гистохимический анализ на *gus*-активность и ПЦР-анализ ДНК на наличие гена лектина. У проростков с положительным результатом в обоих случаях отрезали настоящий корень и растения сажали “бородатыми корнями” в стакан со стерильным вермикулитом, насыщенным 1%-ной стерильной средой Хогланда–Арнона [33]. Таким образом, мы получили композитные растения, состоящие из трансгенного корня и нетрансгенной надземной части. В качестве контрольных композитных растений выступали проростки с “бородатыми корнями”, полученными с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*.

Анализ β -глюкуронидазной (*gus*) активности. Гистохимический *gus*-анализ проводили по методу, описанному Джефферсоном [34] с небольшими модификациями Касуги [35]. Кусочки “бородатых корней” инкубировали в реактиве X-Gluc (состав: 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-глюкуронид, 0.5% тритон X-100, 100 мМ Na_2EDTA , 20% метанола, 0.5 мМ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.5 мМ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ и 50 мМ натриевый фосфатный буфер с pH 7.0). Корни инкубировали при 37°C в течение ночи, выдерживали в 50%-ном растворе глицерина в воде и микроскопировали.

ПЦР-анализ ДНК и РНК из “бородатых корней”. ДНК выделяли фенольно-хлороформным методом. Выделение тотальной РНК и проведение ревертазной реакции осуществляли с использованием наборов TRizol Reagents (“Invitrogen”, США) и GenePak RT Core НПФ (“Галарт-Диагностикум”, Россия).

Наличие гена лектина *psl* в препаратах ДНК и кДНК проверяли с помощью ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок гена лектина [28] и стандартных наборов в амплификаторе Терцик МС2 (“ДНК-технология”, Россия) при оптимальной для каждой пары праймеров температуре отжига.

Обработка “бородатых корней” микросимбионтом *R. leguminosarum* и подсчет количества адсорбированных на поверхности корней ризобий. Для инокуляции “бородатых корней” использовали ри-

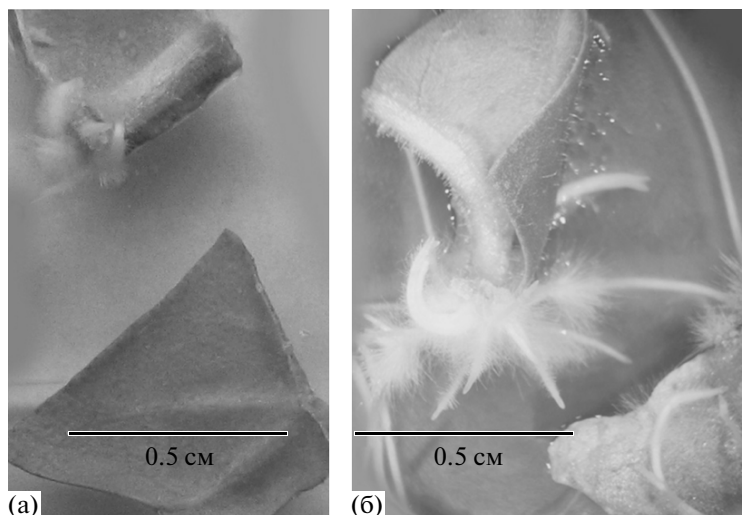


Рис. 2. Развитие “бородатых корней” на листовых пластинках табака: через 1 нед после инокуляции (а), через 2 нед после инокуляции (б).

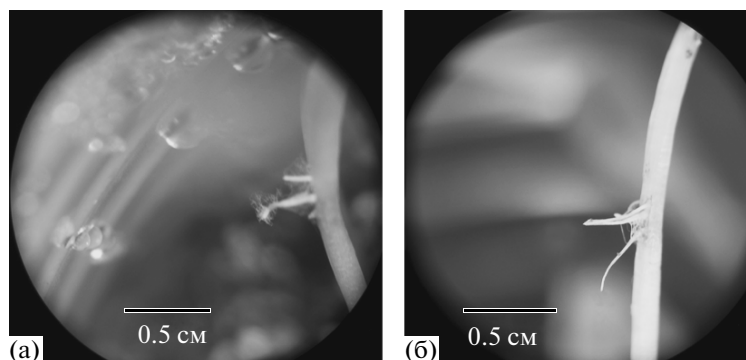


Рис. 3. Развитие “бородатых корней” на рапсе: через 2 нед после инокуляции (а), через 3 нед после инокуляции (б).

зобии *R. leguminosarum* bv. *viceae*, выделенные из клубеньков гороха посевного. Видовую принадлежность бактерий определяли секвенированием генов 16S рРНК. Для облегчения скрининга клубеньковые бактерии предварительно трансформировали плазмидой pSAMVIA1304 (несущей в области Т-ДНК ген *gus*, способный экспрессироваться в бактериальных клетках), что позволяло легко идентифицировать их по синему окрашиванию колоний, выросших на среде с X-Gluc. Бактерии наращивали при 28°C в течение 2 сут в жидкой среде ТУ до концентрации 10⁸ КОЕ/мл.

Колонизацию *R. leguminosarum* на поверхности корней оценивали следующим образом. “Бородатые корни” опытных, с геном лектина гороха, и контрольных эксплантов/композитных растений разрезали на сегменты длиной 1 см, и по 100 мг корней вносили в пробирки диаметром 20 мм, длиной 10 см, содержащие по 3 мл суспензии бактерий. Пробирки помещали на качалку (130 об/мин) при комнатной температуре (19–

21°C). После инкубации с бактериями в течение 1 ч корни трижды отмывали стерильной средой ТУ в течение 5 с на микрошейкере, гомогенизировали в ступке и довели объем стерильной средой ТУ до 10 мл. После этого 0.1 мл суспензии из последовательных десятикратных разведений рассеивали на чашки Петри с твердой средой ТУ и выращивали в термостате при 28°C в течение 2 сут. Количество адгезированных жизнеспособных клеток определяли по числу выросших колоний *R. leguminosarum*, которые идентифицировали по β-глюкуронидазной активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 1 нед после инокуляции у 100% листовых эксплантов табака по краям начинали появляться “бородатые корни” (рис. 2). На контрольных эксплантах (неинокулированные) появления корней не наблюдалось. Практически 50% всех “бородатых корней”, полученных с помощью

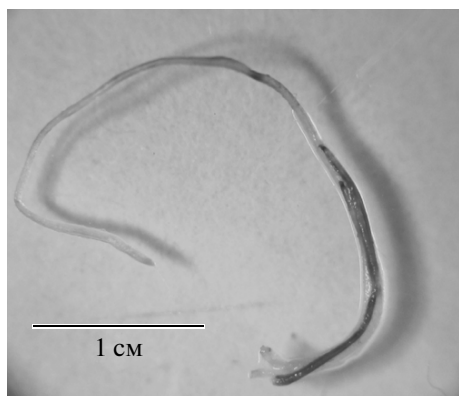


Рис. 4. Gus-анализ “бородатых корней”.

штамма *A. rhizogenes*, несущего конструкцию pSAMBA1305.1-*psl*, оказались одновременно трансформированными и *gus*, и *psl*, что подтвердили *gus*-анализ и ПЦР на наличие и конститутивную экспрессию на уровне мРНК гена лектина. В качестве контроля были использованы “бородатые корни”, полученные с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*. Гистохимический и ПЦР анализы в этом случае дали отрицательный результат.

В случае рапса у 25% проростков “бородатые корни” появлялись в течение 2 нед после введения суспензии агробактерий в гипокотиль (рис. 3). На растениях, проколотых инсулиновым шприцем со стерильной средой ТУ, появления корней не наблюдали. Трансгенная природа корней была подтверждена активностью *gus*-гена у 40% проростков, “бородатые корни” которых были получены с помощью штамма *A. rhizogenes*, трансформированного pSAMBA1305.1-*psl* (рис. 4). ПЦР-анализ этих корней показал присутствие гена лектина и на уровне мРНК его конститутивную экспрессию (рис. 5). В качестве контроля были использованы “бородатые корни”, полученные с помощью исходного штамма *A. rhizogenes*. ПЦР- и *gus*-анализы в этом случае дали отрицательный результат. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, где на летних культурах рапса Drakkar, Janetzki, Duplo, Andor и Topas были получены “бородатые корни” с помощью этого же агропинового штамма *A. rhizogenes* ATCC 15834 на 22% растений [36].

Котрансформированные геном лектина гороха и контрольные (без этого гена) “бородатые корни” композитных растений рапса и эксплантов табака были обработаны микросимбионтом гороха посевного *R. leguminosarum* (рис. 6). Подсчет количества адсорбированных на поверхности корней ризобий показал более чем на порядок увеличение численности бактерий на трансформированных геном *psl* корнях (в среднем ≈ 14 раз у табака и ≈ 37 раз у рапса), по сравнению с контрольными

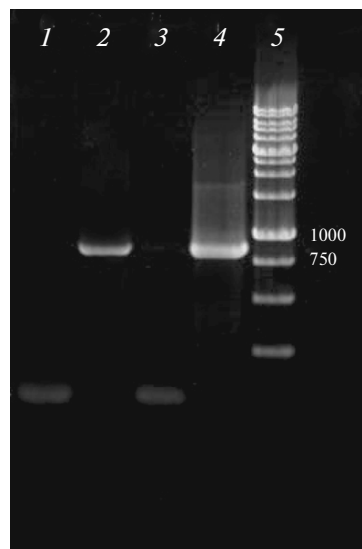


Рис. 5. Электрофореграмма ОТ-ПЦР-анализа экспрессии гена лектина в “бородатых корнях”: 1 – контроль на наличие ДНК в препарате мРНК, 2 – “бородатые корни”, в которых идет экспрессия гена лектина, 3 – отрицательный контроль без генетического материала, 4 – продукт ПЦР на наличие гена лектина в “бородатых корнях”, 5 – 1 Kb ДНК маркер (250–10000 п.н.).

“бородатыми корнями” (количества адгезированных бактерий представлены в таблице). При этом был обнаружен достаточно большой разброс результатов в опытах с трансгенными корнями. Возможно, данный факт объясняется разным уровнем экспрессии гена лектина гороха в “бородатых корнях” (эффект положения гена является характерным недостатком трансгенов, введенных с помощью агробактериальной трансформации).

Известно, что адсорбция ризобий на корневых волосках происходит за счет двойного специфич-

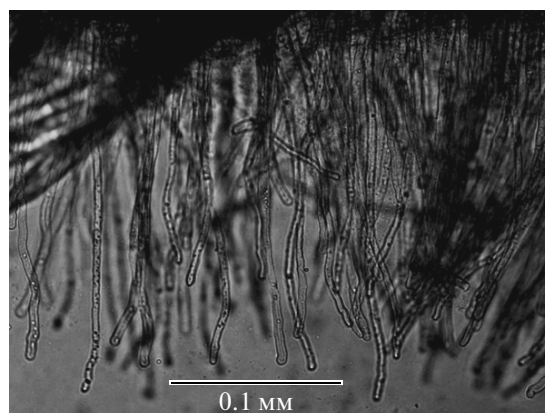


Рис. 6. Корневые волоски на “бородатых корнях”, обработанных *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Количество адгезированных на поверхности “бородатых корней” ризобий

“Бородатые корни”	Бактерии	Количество бактерий, адгезированных на корешках, кл./г × 10 ⁷		Повторность
		табак	рапс	
Контрольные (без <i>psl</i>)	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	2.01–2.25	3.76–3.81	10
Опытные (<i>psl</i>)		22.6–38.2	105–175	

ного связывания лектина и с бактериями, и с растительными клетками. По всей видимости, лектин индуцирует у ризобий синтез ряда факторов, которые могут специфично агглютинировать бактерии с корнями растений. Таким образом, на первом этапе бобово-ризобияльного симбиоза бактерии колонизируют ризоплану растения-хозяина, в результате которой их численность в прикорневой зоне возрастает на 3–4 порядка за счет взаимодействия их поверхностных липополисахаридов с растительными лектинами [7, 37, 38]. Разработанный нами подход к созданию искусственных корневых ассоциаций, основанный на использовании лектинов в качестве трансгенов, позволил более чем на порядок увеличить количество ризобий, колонизирующих трансформированные корни таких несимбиотрофных растений, как табак и рапс.

Хотя в природе табак не вступает в симбиоз с ризобиями, ранее были попытки получить искусственные ассоциации этих бактерий с каллусной тканью табака. Была показана даже некоторая нитрогеназная активность подобных систем [14]. В случае рапса при обработке целлюлазой и пектолиазой корневых волосков в присутствии ризобий происходило образование клубеньков, морфологически и структурно подобных клубенькам бобовых и обладающих незначительной нитрогеназной активностью [39]. Следовательно, если обеспечить специфическое взаимодействие ризобий с трансгенными по гену лектина корневыми волосками табака и рапса, то вполне возможно добиться, если не получения настоящих клубеньков, то хотя бы полноценных ассоциативных отношений между этими растениями и ризобиями.

Создание искусственных азотфиксирующих ассоциаций культурных растений с эндофитными микроорганизмами, которые выделены из природных симбиозов, является относительно новым направлением в биоинженерии симбиотических систем. На сегодняшний день уже выделены штаммы *Rhizobium*, которые успешно колонизируют в природе корни небобовых растений. Например, показано, что наиболее перспективными штаммами для создания азотфиксирующих ассоциаций риса являются ризобии клевера *R. leguminosarum* bv. *trifolii* R4, так как эти бактерии способны колонизировать корни и заселять межклетники, способствуя увеличению урожая [23–25]. В

случае кукурузы и латука в качестве подобного штамма можно использовать ризобии фасоли *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* P31 и R1, которые успешно колонизируют корни этих растений в почве [21, 22]. Использование лектинов бобовых растений в качестве трансгенов может стать следующим шагом к получению стабильных ассоциаций экономически ценных несимбиотрофных видов растений с ризобиями.

Данная работа проводилась при финансовой поддержке ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (госконтракт 02.518.11.7138), программы “Государственная поддержка молодых российских ученых и ведущих научных школ России” (гранты МД-43.2008.4 и НШ-649.2008.4) и гранта по инновационным исследованиям “У.М.Н.И.К.” З.Р. Вершининой (ГР 001200850086).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yemtsev V.T.* // Eurasian Soil Sci. 1994. V. 26. № 9. P. 42–57.
2. *Vallad G.E., Goodman R.M.* // Crop Sci. Soc. Amer. 2004. V. 44. № 6. P. 1920–1934.
3. *Игнатов В.В.* // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 9. С. 28–33.
4. *Тихонович И.А., Проворов Н.А.* // Вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 3. С. 295–305.
5. *Шакирова Ф.М., Безрукова М.В.* // Журн. общ. биологии. 2007. Т. 68. № 2. С. 109–125.
6. *Радчук В.В., Блюм Я.Б.* // Цитология и генетика. 2005. № 3. С. 13–29.
7. *Diaz C.L., Melchers L.S., Hooykaas P.J.J., Lugtenberg B.J.J., Kijne J.W.* // Nature. 1989. V. 338. № 6216. P. 579–581.
8. *Pheler M., Petit M., Martin L., Duhoux E., Tempe J.* // Lam. Biotechnol. 1991. V. 9. № 5. P. 461–466.
9. *Diouf D., Gherbi H., Prin Y., Franche C., Duhoux E., Bogusz D.* // Mol. Plant Microbe Interact. 1995. V. 8. № 4. P. 532–537.
10. *Akasaka Y., Mii M., Daimon H.* // Ann. Bot. 1998. V. 81. № 2. P. 355–362.
11. *Hirsch A.M., Brill L.M., Lim P.O., Scambray J., Van Rhijn P.* // Symbiosis. 1995. V. 19. № 2–3. P. 155–173.
12. *Diaz C.L., Spaink H.P., Kijne J.W.* // Mol. Plant Microbe Interact. 2000. V. 13. № 3. P. 268–276.

13. Diouf D., Diop T.A., Ndoye I. // Afr. J. Biotechnol. 2003. V. 2. № 1. P. 1–7.
14. Gibson A.H., Child J.J., Pagan J.D., Scowcroft W.R. // Planta. 1976. V. 128. № 3. P. 233–242.
15. Баулина О.И., Агафодорова М.Н., Корженевская Т.Г., Гусев М.В., Бутенко Р.Г. // Микробиология. 1984. Т. 53. № 6. С. 997–1002.
16. Горелова О.А., Лобакова Е.С., Корженевская Т.Г. // Вестн. МГУ. Сер. 16. Биология. 2004. № 3. С. 39–44.
17. Banerjee M., Yesmin L. US Patent. 2002. № 07491535.
18. Ковальская Н.Ю., Лобакова Е.С., Умаров М.М. // Микробиология. 2001. Т. 50. № 5. С. 701–708.
19. Chao W.L. // Lett. Appl. Microbiol. 1990. V. 10. № 5. P. 213–215.
20. Hoflich G., Wiehe W., Buchholz C.H. // Microbiol. Res. 1995. V. 150. № 2. P. 139–147.
21. Chabot R.H., Antoun H., Kloepper J., Beauchamp C. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 8. P. 2767–2772.
22. Gutierrez-Zamora M.L., Martinez-Romero E. // J. Biotechnol. 2001. V. 91. № 2–3. P. 117–126.
23. Chi F., Shen S.H., Cheng H.P., Jing Y.X., Yanni Y.G., Dazzo F.B. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 11. P. 7271–7278.
24. Perrine-Walker F.M., Prayitno J., Rolfe B.G., Weinman J.J., Hocart C.H. // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. № 12. P. 3343–3350.
25. Biswas J.C., Ladha J.K., Dazzo F.B., Yanni Y.G., Rolfe B.G. // Agron. J. 2000. V. 92. № 5. P. 880–886.
26. Тильба В.А., Бегун С.А., Якименко М.В. // Вестн. РАСХН. 2004. № 5. С. 28–30.
27. Черемных А.В., Егоров С.Ю., Куприянова-Ашина Ф.Г. // Казан. гос. ун-т. Ученые зап. Серия: Естеств. науки. 2007. Т. 149. С. 94–104.
28. Gatehouse J.A., Bown D., Evans I.M., Gatehouse L.N., Jobs D., Preston P., Croy R.R.D. // Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. № 18. P. 7642.
29. Henzi M.X., Christey M.C., McNeil D.L. // Plant Cell Rep. 2000. V. 19. № 10. P. 994–999.
30. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1972. 432 p.
31. Horsch R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eichholtz D., Rogers S.C., Fraley R.T. // Science. 1985. V. 227. № 4691. P. 1229–1231.
32. Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 3. P. 473–497.
33. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, 1973. 591 с.
34. Jefferson R.A. // Plant Mol. Biol. Rep. 1987. V. 5. № 1. P. 387–405.
35. Kosugi S., Ohashi Y., Nakajima K., Arai Y. // Plant Sci. 1990. V. 70. № 4. P. 133–140.
36. Menze A., Mollers C. // Proc. 10th Int. Rapeseed Congress. Canberra, Australia, 1999. P. 15–20.
37. Dazzo F.B., Truchet G.L. // J. Membr. Biol. 1983. V. 73. № 3. P. 4–11.
38. Kijne J.W., Diaz C.L., Pater S. // Adv. Lectin Res. / Eds. H. Franz, E. van Driessche, K.J. Kasai. Berlin: Ullstein Mosby, 1992. P. 15–50.
39. Cocking E.C., Davey M.R. // Chem. Industry. 1991. V. 22. № 6. P. 831–835.

Bioengineering of Symbiotic Systems: Creation of New Associative Symbiosis with the Use of Lectins on the Example of Tobacco and Colza

Z. R. Vershinina, An. Kh. Baimiev, D. K. Blagova, A. V. Knyazev,
Al. Kh. Baimiev, and A. V. Chemeris

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,

pr. Octyabrya 71, Ufa, 450054 Russia

e-mail: zilyaver@mail.ru

Received April 18, 2010

Abstract—“Barbate roots” in tobacco and colza transgenic on lectin gene were obtained with the use of a wild strain of *Agrobacterium rhizogenes* 15834 transformed with pCAMBIA1305.1 plasmid containing the full-size lectin gene (*psl*) from the *Pisum sativum*. Influence of expression of lectin gene on colonization of transgenic roots with symbiont of pea (*Rhizobium leguminosarum*) was investigated. The number of adhered bacteria onto the roots transformed with lectin gene was 14-fold and 37-fold higher in comparison with the control; this confirms the interaction of *R. leguminosarum* with pea lectin at the surface of the transformed roots of tobacco and colza. The developed experimental approach, based on the simulation of recognition processes and early symbiotic interactions with lectins of pea plants, may, in perspective, be used for obtaining stable associations of economically valuable, nonsymbiotic plant species with rhizobia.

УДК 577.11:579.841.21:577.14:579.663

БИОПОЛИМЕР АЛЬГИНАТНОЙ ПРИРОДЫ С ПРЕОБЛАДАНИЕМ L-ГУЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2011 г. Я. О. Логинов, Г. Г. Худайгулов, С. П. Четвериков, А. И. Мелентьев, О. Н. Логинов

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054

e-mail: che-kov@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2010 г.

Получен высоковязкий биополимер из *Azotobacter vinelandii* – полисахарид альгинатной структуры с преобладанием α -L-гулурановой кислоты ($M/G = 0.22$), молекулярная масса которого в интервале 250–350 кДа. При культивировании на среде с мелассой выход экзополисахарида составил 20.5 ± 0.5 г/л при вязкости культуральной жидкости свыше 30000 сСт. Биополимер стабилен в диапазоне pH 4.0–9.0 в широком интервале температур, хорошо растворяется в высокоминерализованной воде, сохраняя высокий уровень вязкости, и может использоваться в нефтяной промышленности для повышения нефтеотдачи.

Известно, что бактерии, принадлежащие к роду *Azotobacter vinelandii*, при глубинном культивировании образуют значительные количества экзополисахарида (ЭПС), который представлен как в виде капсул, окружающих бактериальные клетки, так и в виде аморфной слизи, распространяющейся в питательной среде [1]. Считается, что в природных условиях обитания формирование удерживающих влагу цист способствует выживанию клеток в неблагоприятных условиях [2], а полисахаридный гель, снижая диффузию молекулярного кислорода, защищает нитрогеназную систему от вредного воздействия [3].

В настоящее время химическая структура ЭПС *A. vinelandii* установлена. Это линейный полисахарид альгинатной природы, построенный из остатков D-маннурановой кислоты и ее C-5-эпимера, L-гулурановой кислоты в различной последовательности и соотношении [4, 5].

Благодаря способности воздействовать на реологические свойства водных систем при малых концентрациях бактериальные ЭПС могут найти применение в пищевой, медицинской, фармацевтической областях промышленности и сельском хозяйстве [6, 7]. Реологические свойства альгинатов и их способность формировать гели зависят от молекулярной массы полимера и соотношения остатков маннурановой и гулурановой кислот. Соотношение этих мономеров в бактериальных альгинатах варьирует в зависимости от вида (штамма) и условий культивирования [8].

Ранее было обнаружено, что штамм *A. vinelandii* ИБ 1 при культивировании в среде с мелассой продуцирует до 16 г/л экзополисахарида, отличающегося высокой вязкостью и стабильностью в высокоминерализованных водных растворах [9]. Однако химическая структура и другие характе-

ристики этого биополимера не были досконально исследованы.

Цель работы – установление химической природы ЭПС из *A. vinelandii* и оценка физических свойств образуемых им гелей.

МЕТОДИКА

Использовали штамм бактерии *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 из Коллекции микроорганизмов Института биологии Уфимского научного центра РАН, который первоначально был описан, как штамм бактерий для получения биопрепарата для борьбы с болезнями пшеницы, вызываемыми грибными фитопатогенами, и повышения урожая [10].

Для поддержания культуры, подготовки посевного материала и культивирования использовали питательную среду Федорова следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0.3, $CaHPO_4$ – 0.2, $MgSO_4$ – 0.3, K_2SO_4 – 0.2, $NaCl$ – 0.5, $FeCl_3$ – 0.01, $CaCO_3$ – 5.0, меласса – 60.0. Использовали мелассу (ООО “Карламанский сахар”, Россия), содержащую сахарозу (50–53%), микроэлементы, органические кислоты [11].

Культивирование проводили в периодических условиях в ферментерах АК-210 (“СКБ БП”, Пушкино, Россия) с рабочим объемом 6 л при 25°C с непрерывным перемешиванием, частотой вращения мешалки 300 мин^{-1} , аэрацией – 0.5 объема воздуха в 1 мин на 1 объем среды.

Определение содержания сахарозы в культуральной жидкости в процессе биосинтеза ЭПС проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в системе, состоящей из насоса высокого давления модели 572P (“Gasukuro Kogyo”, Япония), детектора-рефрактометра (“Du Pont”, США). Для разделения использовали колонку из нержавеющей стали с

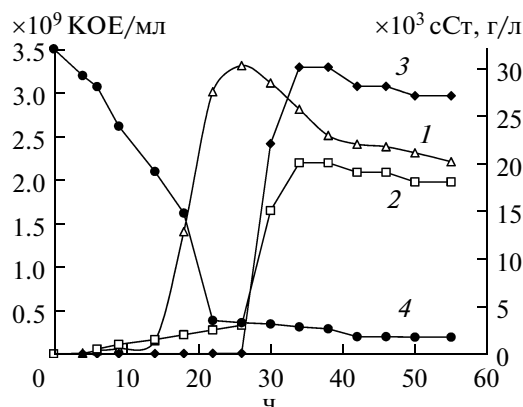


Рис. 1. Динамика биосинтеза ЭПС и изменения вязкости культуральной жидкости при периодическом культивировании *A. vinelandii* ИБ 1, 1 – титр клеток, $\times 10^9$ КОЕ/мл, 2 – ЭПС, г/л, 3 – вязкость, $\times 10^3$ сСт, 4 – сахароза, г/л.

сорбентом (размер зерна 5 мкм) НР – NH₂ (250 × 4.6 мм, “Hewlett Packard”, США). В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил–вода (75 : 25) с расходом 1 мл/мин.

Определение кинематической вязкости культуральной жидкости осуществляли при помощи стеклянного капиллярного вискозиметра Оствальда при 20°C (значения в сантистоксах (сСт) или мм²/с), динамической вязкости культуральной жидкости – с использованием ротационного вискозиметра ВСН-3 (ОАО “Азнефтьхиммаш”, Азербайджанская Республика) при 20°C, скорости вращения гильзы 600 мин⁻¹ и перемешивании исследуемой жидкости в течение 10 мин (значения в сантипуазах (сП) или Па с).

ЭПС выделяли из культуральной жидкости переосаждением изопропиловым спиртом (70% по объему). Осадок промывали чистым изопропиловым спиртом, холодной водой и сушили до постоянной массы [12].

Молекулярную массу (ММ) ЭПС оценивали методом гель-фильтрации в вышеописанной системе на колонке TSK G4000SW (300 × 7.8 мм, “Toyo Soda”, Япония) при элюировании 0.15 М хлоридом натрия с расходом 1 мл/мин. В качестве стандартов использовали декстраны.

ИК-спектры записывали на спектрофотометре Specord M 80 (“Carl Zeise”, Германия) в области 4000–600 см⁻¹ (толщина пленки 15–20 мкм).

Спектры ЯМР ¹H регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (“Bruker”, Германия) с рабочей частотой 300 МГц для 2%-ного раствора полисахарида при 80°C, растворитель – D₂O.

Спектры ЯМР ¹³C регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (“Bruker”, Германия) с рабочей частотой 75.47 МГц для 2%-ного раствора полисахарида, растворитель – D₂O.

Изучение термостабильности геля ЭПС проводили при 4-кратном нагревании до 100°C и охлаждении до 20°C. Влияние pH среды на стабильность ЭПС (динамическая вязкость) определяли при 20, 40, 60, 80°C в 0.05 М фосфатной буферной системе в соотношении ЭПС–фосфатная буферная система 3 : 1 в диапазоне pH 2.0–11.0. ЭПС выдерживали в этой системе в течение 30 мин. Влияние солей металлов на стабильность ЭПС исследовали при их концентрации 150 г/л. Использовали хлориды, нитраты и сульфаты калия, натрия, кальция, магния, марганца и железа. Результаты по исследованию стабильности представлены в процентах относительно исходной вязкости ЭПС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм *A. vinelandii* ИБ 1 при культивировании на среде с мелассой синтезировал высоковязкий ЭПС, его выход составлял 20.5 ± 0.5 г/л (рис. 1). Вязкость получаемой культуральной жидкости при этом была свыше 30000 сСт. Накопление ЭПС до 20 ч культивирования было незначительным, без увеличения вязкости. По завершении логарифмической фазы роста потребление сахарозы практически прекращалось, о чем свидетельствовало резкое снижение ее концентрации в среде к данному моменту. При переходе в стационарную фазу роста культуры (28 ч) происходил резкий, в течение 1 ч, скачок в образовании ЭПС и увеличение вязкости среды до 15000 сСт. Последующее увеличение вязкости (до 30000 сСт), возможно, связано с продолжением синтеза полисахарида, увеличением его молекулярной массы, а также с реструктуризацией образовавшегося ЭПС, как, например, на заключительной стадии биосинтеза альгиновых кислот, где D-маннуроновая кислота ферментативно эпимеризуется в L-гулурановую кислоту, отвечающую за свойства геля [13]. В целом, характер накопления ЭПС и возрастания вязкости среды согласуется с данными других авторов, отмечавших резкое повышение концентрации альгинатов *A. vinelandii* по завершении логарифмического роста [14, 15].

Посредством гель-фильтрации показано, что продуцируемый штаммом *A. vinelandii* ИБ 1 полисахарид выходит из колонки одним асимметричным пиком, ограниченными значениями молекулярных масс примерно от 250 до 350 кДа (рис. 2). Согласно данным, представленным в обзоре Галлиндо и др. [16], молекулярная масса альгинатов различных штаммов *A. vinelandii* варьирует в достаточно широких пределах – от 340 до 4000 кДа, кроме того, эта величина в определенной мере зависит от способа культивирования (колбы или ферментационный аппарат).

В ИК-спектре полисахарида обнаружены сигналы, характерные для полос поглощения ацетильных групп 1730, 1250 см⁻¹, полосы поглоще-

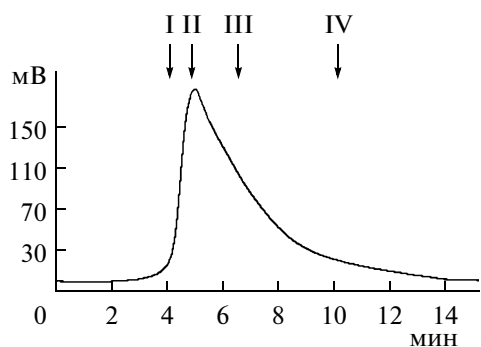


Рис. 2. Гель-хроматограмма ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1 на TSK G4000SW, 300x7.8 мм (“Тоуо Soda”, Япония) при элюировании 0.15 М хлоридом натрия, расход 1 мл/мин; кДа: I – 500, II – 300, III – 200, IV – 100.

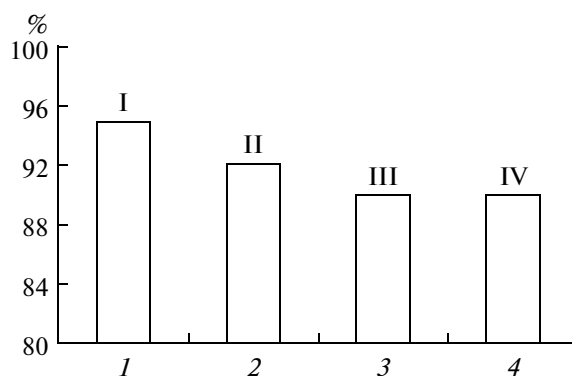


Рис. 3. Влияние кратности нагревания (I–4) до 100°C и охлаждения до 20°C на вязкость (% от исходной) ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1. I – 95, II – 92, III – 90, IV – 90.

ния валентных колебаний пиранозного кольца гулурановой кислоты (Г) 1290 и 787 см⁻¹, и полосы поглощения валентных колебаний пиранозного кольца маннурановой кислоты (М) 1320 и 808 см⁻¹.

Из спектров ЯМР ¹H и ¹³C полисахарида видно, что в его структуре содержится по 10 пиков (табл. 1, 2), типичных для спектров альгинатов. Таким образом, на основе данных ИК- и ЯМР-спектроскопии показано, что выделенный полисахарид построен из 1–4-связанных остатков β-D-маннурановой и α-L-гулурановой кислот.

Исходя из данных ИК-спектроскопии, представляется возможным рассчитать величину М/Г, как соотношение интенсивностей полос поглощения при 808 (М) и 787 см⁻¹ (Г) [13]. Для исследуемого полисахарида *A. vinelandii* ИБ 1 величина М/Г = 0.22. Это соотношение подтверждается и данными ЯМР-спектроскопии: отношение суммы интегральных интенсивностей сигналов С1–С5 остатков β-D-маннурановой кислоты к соответствующей сумме интегральных интенсивностей сигналов С1–С5 остатков α-L-гулурановой кислоты дает ту же величину.

Вязкость и способность к гелеобразованию альгинатных полисахаридов определяется, главным образом, высоким содержанием α-L-гулурановой кислоты (относительной длиной Г-блоков в полимерной цепи) и степенью наличия ацетильных групп. Имеющиеся в литературе данные различных авторов по вязкостным характеристикам альгинатов *A. vinelandii* трудно сопоставимы ввиду отсутствия полноты сведений по концентрации ЭПС, плотности культуральной жидкости, скоростей сдвига при определении кинематической вязкости и других параметров. Наиболее приемлемыми для сопоставления с нашими результатами можно считать данные Галиндо и др. [16], согласно которым вязкость культуральной среды (0.6% ЭПС), установленная при скоро-

сти сдвига 12 с⁻¹, составляла 560 сП. В наших экспериментах при концентрации ЭПС в среде 2.0%, кинематическая вязкость составила 9100 сП при скорости сдвига 10 с⁻¹, ММ ЭПС существенно ниже (250–350 кДа) против 1500–1900 кДа у цитируемых авторов [16], а уровень накопления ЭПС в культуральной среде выше примерно в 3 раза.

Известно, что бактериальные альгиновые кислоты обычно ацетилированы в положении 2 и (или) 3 остатков D-маннурановой кислоты. Причем содержание более чем 22% ацетильных групп характерно для альгинатов, состоящих из 55% остатков маннурановой кислоты, тогда как полимеры, содержащие до 4% ацетильных групп, состоят в основном из остатков L-гулурановой кислоты [17]. Данные ИК- и ЯМР-спектроскопии исследуемого полисахарида указывают на наличие 8% ацетильных групп, что, вкупе с уникально высоким содержанием α-L-гулурановой кислоты (82%), обуславливает его высокие вязкостные характеристики. Ранее считалось, что для бактериальных альгинатов максимальное содержание α-L-гулурановой кислоты находится на уровне 56% [18].

Для возможного практического использования ЭПС важной характеристикой является их вязкость в зависимости от условий среды. Из рис. 3 видно, что 4-кратное нагревание до 100°C с последующим охлаждением до 20°C не оказывало

Таблица 1. Характерные химические сдвиги спектра ЯМР ¹H ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1

Кислота	Химический сдвиг, м. д.				
	H1	H2	H3	H4	H5
D-маннурановая кислота	4.79	4.74	4.69	4.72	4.67
L-гулурановая кислота	4.84	4.72	4.74	4.76	4.82

Таблица 2. Характерные химические сдвиги спектра ЯМР ^{13}C ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1

Кислота	Химический сдвиг, м.д.				
	C1	C2	C3	C4	C5
D-маннуоновая кислота	105.82	70.84	71.31	78.70	77.56
L-гулуоновая кислота	106.51	65.72	68.83	82.61	68.83

существенного деструктивного влияния на гель ЭПС, то есть его вязкость падала незначительно и была обратима. Это свойство ЭПС может иметь решающее значение при использовании в условиях нефтяных месторождений с высокой пластовой температурой для обеспечения более полного извлечения нефти из нефтяных пластов.

Оценка влияния pH среды на стабильность биополимера (рис. 4) показала, что экзополисахарид при 20°C сохранял стабильную вязкость в диапазоне pH 4.0–8.0 с незначительным снижением вязкости при pH 9.0. Повышение температуры до 40°C изменяло этот диапазон pH до уровня 5.0–9.0, до 60°C – диапазон pH 5.5–9.0. При 80°C вязкость ЭПС стабильна в диапазоне pH 6.0–8.0. Анализируя данные результаты, можно сделать вывод о том, что повышение температуры сужало диапазон pH, в котором гель ЭПС сохранял стабильность.

Важной характеристикой стабильности товарного биополимера является его устойчивое гелеобразование в солевых растворах. С этой целью

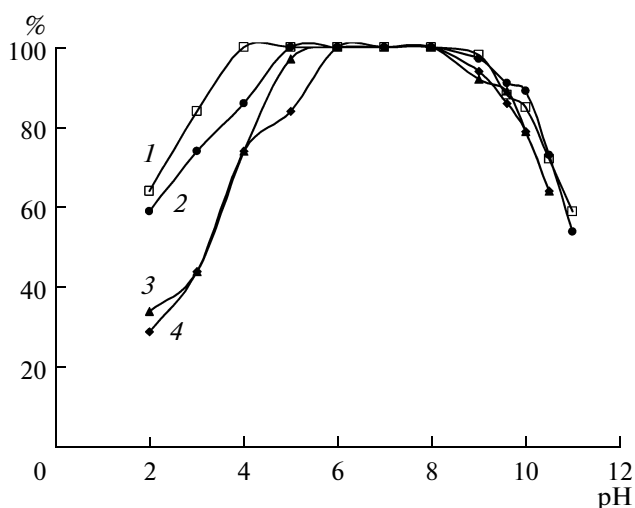


Рис. 4. Влияние pH и температуры среды на вязкость (% от исходной) ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1: 1 – 20, 2 – 40, 3 – 60, 4 – 80°C.

была изучена вязкость ЭПС в средах, где в качестве солей использовали хлориды, нитраты и сульфаты K, Na, Ca, Mg, Mn и Fe. Выбор этих солей обусловлен их наличием в компонентном составе пластовых вод. Полученные результаты по стабильности полисахарида, продуцируемого *A. vinelandii* ИБ 1, свидетельствуют о том, что его вязкостные свойства не терялись в присутствии данных солей (рис. 5).

При добавлении сульфатов в раствор ЭПС его вязкость возрастала до 146% по отношению к исходной без добавления солей. Повышение вязкости в большей степени наблюдалось под воздействием сульфатов натрия и марганца. Влияние хлоридов на вязкостную стабильность экзополисахарида отличалось от влияния сульфатов. Так, хлориды металлов понижали вязкость ЭПС до 61–84%. Хлорид железа(III), обладая сильно выраженными свойствами кислоты Льюиса, оказывал отрицательное действие на вязкость геля полисахарида, фактически высаживая его из раствора. Нитраты щелочных и щелочноземельных металлов понижали вязкость ЭПС до уровня 60–70% от исходной.

Таким образом, новый высоковязкий биополимер представляет собой экзополисахарид альгинатной структуры с преобладанием α -L-гулуоновой кислоты ($M/G = 0.22$) с молекулярной массой в интервале 250–350 кДа. Биополимер стабилен при pH 4.0–9.0 в широком интервале температур, хорошо растворяется в высокоминерализованной воде, сохраняя высокий уровень вязкости. Положительные результаты испытаний позволяют утверждать о перспективности даль-

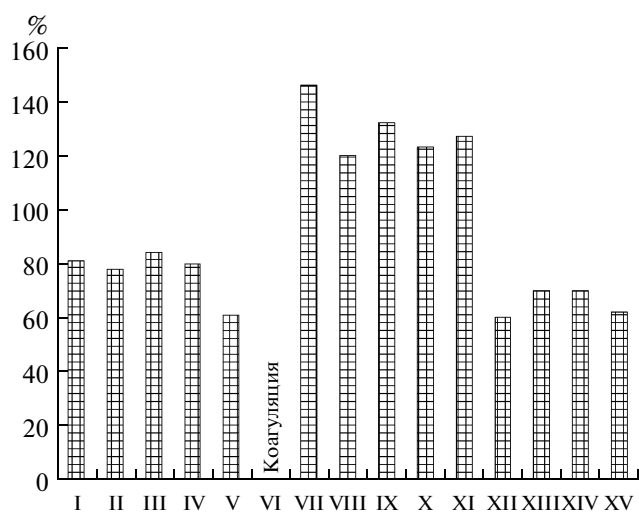


Рис. 5. Влияние солей металлов на вязкость (% от исходной) ЭПС *A. vinelandii* ИБ 1. I – NaCl, II – CaCl₂, III – MnCl₂·4H₂O, IV – MgCl₂·4H₂O, V – KCl, VI – FeCl₃·6H₂O, VII – MnSO₄·5H₂O, VIII – FeSO₄·5H₂O, IX – Na₂SO₄, X – K₂SO₄, XI – MgSO₄·7H₂O, XII – KNO₃, XIII – NaNO₃, XIV – Mg(NO₃)₂·6H₂O, XV – Ca(NO₃)₂.

нейшего использования нового биополимера при проведении опытно-промышленных работ для повышения нефтеотдачи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cohen G.H., Johnstone D.B.* // J. Bacteriol. 1964. V. 88. № 2. P. 329–338.
2. *Campos M., Martinez-Salazar J.M., Lloret L., Moreno S., Nunez C., Espin G., Soberon-Chaves G.* // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 7. P. 1793–1799.
3. *Sabra A., Zeng P., Lonsdorf H., Deckwer W.D.* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 9. P. 4037–4044.
4. *Gorin P.F.J., Spenser J.F.T.* // Canad. J. Chem. 1966. V. 44. № 9. P. 993–998.
5. *Сливкин А.И.* // Вестник ВГУ. Серия химия, биология. 2000. С. 30–46.
6. *Гринберг Т.А., Смоляр С.И., Малашенко Ю.Р., Пирог Т.П., Капиловская Е.Д.* // Микробиол. журнал. 1991. Т. 53. № 5. С. 82–96.
7. *Ботвинко И.В.* // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 79–122.
8. *Smidsrod O., Draget K.I.* // Carbohydr. Eur. 1996. V. 14. № 2. P. 6–13.
9. Патент РФ. 2005. № 2266324.
10. Патент РФ. 2005. № 2245918.
11. *Артюхов В.Г., Гарбаренко В.Г., Гайворонский Я.С.* Переработка мелассы на спирт и другие продукты по безотходной технологии. М.: Агропромиздат, 1985. 287 с.
12. *Захарова И.Я., Косенко Л.В.* Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наукова думка, 1982. 192 с.
13. *Усов А.И.* // Успехи химии. 1999. Т. 68. № 11. С. 1051–1061.
14. *Chen W.P., Chen J.Y., Chang S.C., Su C.L.* // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 49. № 3. P. 543–546.
15. *Pena C., Campos N., Galindo E.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. № 4. P. 510–515.
16. *Galindo E., Peña C., Núñez C., Segur D., Espín G.* // Microb. Cell Fact. 2007. V. 6. № 7. P. 1–16.
17. *Skjak-Braek G., Crasdalen H., Larsen B.* // Carbohydr. Res. 1986. V. 154. № 1. P. 239–250.
18. *Sutherland I.W.* // FEMS Microbiol. Rev. 1995. V. 16. № 4. P. 323–347.

Biopolymer of Alginate Nature with a Predominance of L-Guluronic Acid

Ya. O. Loginov, G. G. Khudaigulov, S. P. Chetverikov, A. I. Melent'ev, and O. N. Loginov

Institute of Biology, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

e-mail: che-kov@mail.ru

Received April 8, 2010

Abstract—Highly viscous polysaccharide (250–350 kDa) of an alginate nature with a predominance of α -L-guluronic acid (M/G = 0.22) was obtained from *Azotobacter vinelandi*. The yield of polysaccharide was 20.5 ± 0.5 g/l when cultured in a medium containing molasses at a viscosity of the cultural liquid of over 30000 cSt. The biopolymer is stable at pH 4.0–9.0 in a wide temperature range and well soluble in highly mineralized water; it retains a high viscosity level and can be used in the petroleum industry for enhanced oil recovery.

УДК 577.151

ВЛИЯНИЕ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ СЕМЯН СОИ НА ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ СВОЙСТВА ПШЕНИЧНОЙ МУКИ

© 2011 г. М. Д. Пермякова, В. А. Труфанов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

e-mail: gluten@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 14.04.2010 г.

Исследовано изменение хлебопекарных свойств пшеничной муки при действии липоксигеназы семян сои и полиненасыщенных жирных кислот. Показано положительное влияние соевой муки, добавленной при замесе пшеничного теста в количестве 2%. Рекомендован способ ферментации теста, приводящий к увеличению объема хлеба, улучшению органолептических показателей и общей хлебопекарной оценки.

Формирование клейковины пшеницы и вязко-эластичной структуры теста происходит после добавления воды к муке, в результате чего разобщенные молекулы запасных белков эндосперма — глиадина и глютеина образуют сплошную гомогенную трехмерную сеть. Важнейшим фактором укрепления белкового комплекса клейковины является окисление SH-групп с образованием межмолекулярных и внутримолекулярных S—S-связей [1, 2]. Было показано, что действием окислителей и восстановителей можно изменять функциональные свойства клейковинных белков в процессе замеса теста [1, 3].

Для улучшения реологических свойств муки в хлебопекарном производстве используются быстродействующие окислители: бромат калия, пероксид бензоила, аскорбиновая кислота и другие. Более перспективным способом улучшения теста в технологии хлебопечения является применение окислительных ферментов, таких, как пероксидаза, глюкозооксидаза и липоксигеназа [4].

Липоксигеназа (линолеат: кислород оксидоредуктаза, ЛОГ, КФ 1.13.11.12) катализирует присоединение молекулярного кислорода к полиненасыщенным жирным кислотам с образованием пероксидов и гидропероксидов жирных кислот. Эти супероксидные радикалы способны окислять SH-группы запасных белков пшеницы, образуя дисульфидные сшивки, укрепляющие клейковину.

Исследование влияния соевой ЛОГ на качество пшеничного теста показало, что добавленный фермент (в виде соевой муки или частично очищенной соевой ЛОГ) действовал как обесцвечивающий агент, увеличивал устойчивость теста к замесу и улучшал его реологические свойства [5, 6]. Была показана также положительная роль ЛОГ при производстве хлеба с добавлением отрубей [7, 8].

Цель работы — изучение влияния на хлебопекарные параметры пшеничной муки добавления

минимального количества соевой липоксигеназы и ее субстрата — полиненасыщенных жирных кислот в процессе замеса теста и поиск оптимальных условий для их положительного действия.

МЕТОДИКА

При определении хлебопекарного качества пшеницы для замеса теста использовали 50 г продажной муки низкого качества, 31.5 мл воды, 2 г дрожжей, распущенных в 5 мл воды, 32°C, 0.5 г соли.

Показатель качества пшеничного теста, характеризующий его формоустойчивость, определяли по отношению высоты H к диаметру D (H/D).

В опыте по действию очищенных фермента и субстрата на H/D шарика теста через 60 мин расстойки при замесе теста вносили 0.004 г стандартного препарата кристаллической соевой липоксигеназы (тип 1-S), содержащие 4680 единиц активности и 0.1 мл линолевой кислоты (“Sigma”, США).

Экстракты ЛОГ из муки семян пшеницы (сорт Тулунская 12) и продажной сои получали экстрагированием в течение 30 мин 0.1 М трис-HCl-буферным раствором, содержащим 1 мМ ЭДТА в соотношении 1 : 10 с последующим центрифугированием при 8000 г в течение 30 мин. Супернатант использовали для определения содержания белка по Лоури и активности фермента. Активность ЛОГ определяли спектрофотометрически по методике [9] с модификациями [10]. Удельную активность выражали в единицах активности Е/мг белка в мл экстракта.

В эксперименте по определению условий для действия минимального количества экзогенных фермента и субстрата источником ЛОГ служила соевая мука с высокой активностью фермента, а в качестве субстрата применяли нерафинированное подсолнечное масло, богатое ненасыщенными

жирными кислотами. Было использовано 4 варианта приготовления теста. **Вариант 1** – контроль, без добавок. **Вариант 2** – добавление при замесе теста 1 мл подсолнечного масла. **Вариант 3** – добавление в тесто 1 г соевой муки. **Вариант 4** – внесение при замесе теста предварительно приготовленного соево-дрожжевого гомогената. Для этого соевую муку (1 г) и подсолнечное масло (1 мл) гомогенизировали в 20 мл воды при 150 об/мин в течение 1 мин на лабораторном гомогенизаторе (тип Р-216, Польша). Затем вносили 15 г пшеничной муки, 2 г дрожжей в 5 мл воды, 0.5 г соли и гомогенизировали еще дважды (4 и 1 мин) с интервалом 15 мин. После чего в полученную массу добавляли еще 35 г пшеничной муки, 11.5 мл воды и замешивали тесто вручную.

Для активации фермента тесто интенсивно перемешивали, насыщая кислородом. В отдельных случаях дополнительно активировали тесто кислородом в течение 1 мин.

Для брожения и расстойки тесто помещали в термостат при температуре 32°C. Время брожения составляло 120 мин. Перебивки теста производили вручную каждые 60 мин брожения. Затем тесто делили на 2 равные части, формировали подовые микрохлебцы и оставляли на 120 мин для расстойки. Показатели Н, D и Н/D определяли через 60 и 90 мин расстойки. Пробные выпечки микрохлебцев делали в термостате при 230°C в течение 20 мин.

Хлебопекарные параметры определяли по стандартным методам [11]. Измеряли объем теста через 60, 90 и 120 мин брожения, определяли показатели Н, D и Н/D через 60 и 90 мин расстойки. Параметры готовых хлебцев Н, D, Н/D измеряли в абсолютных значениях и Н/D в баллах. Объем хлеба определяли в мл, в пересчете на 100 г муки и в баллах. Также проводили органолептическую оценку по 5-бальной системе и общую хлебопекарную оценку как среднее арифметическое из оценок объемного выхода, внешнего вида, пористости, цвета мякиша, эластичности, вкуса и формоустойчивости подового хлеба.

Эксперименты проводили в 3–4-кратных повторностях. Рассчитывали выборочные средние значения и ошибку среднего. Достоверность различий средних значений по отношению к контролю оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие стандартных препаратов линолевой кислоты и соевой ЛОГ на показатель Н/D теста. При внесении линолевой кислоты в тесто в процессе его приготовления показатель Н/D увеличивался по сравнению с контролем в 1.3 раза (рис. 1). Вероятно, добавление субстрата активировало эндогенные ЛОГ пшеницы, действующие на двойные связи полиеновых жирных кислот, что приводило к небольшому увеличению показателя Н/D.

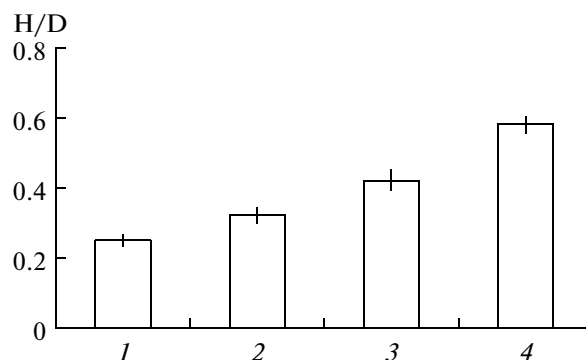


Рис. 1. Действие линолевой кислоты и соевой ЛОГ на формообразующую способность (Н/D) пшеничного теста. Контроль (1, без добавок), внесение линолевой кислоты (2), препарата соевой ЛОГ тип I–S (3), фермента и субстрата (4).

Внесение в тесто препарата кристаллической соевой ЛОГ приводило к увеличению показателя Н/D в 1.7 раза по отношению к контрольному варианту опыта. Вероятно, добавление ЛОГ заметно устраняло дефицит в пшеничной муке SH-оксидантной активности и окислительное действие экзогенного фермента на эндогенные полиненасыщенные жирные кислоты пшеничной муки приводило к определенному увеличению показателя Н/D.

И наконец, при совместном внесении фермента и его субстрата показатель Н/D возрастал в сравнении с контролем в 2.3 раза, то есть достигался наибольший эффект в повышении устойчивости теста к расплыванию. Очевидно, что это происходило за счет превращения ферментативно окисленными продуктами ненасыщенных жирных кислот свободных SH-групп цистеиновых остатков запасных белков пшеничной муки и белков соевой муки в S–S-связи, стабилизирующие структурный остов клейковинного комплекса.

Сравнение ферментативной активности ЛОГ пшеничной и соевой муки. Известно о высоком содержании ЛОГ у растений сои. В семенах сои этот фермент может составлять до 2% общего белка [12]. На рис. 2 продемонстрирована более высокая активность ЛОГ в экстракте соевой муки в сравнении с экстрактом из пшеничной муки. Среднее значение единиц активности ЛОГ в семенах сои было на 371.9% выше, чем в семенах пшеницы. Содержание белка в экстракте соевой муки было больше, чем у пшеницы в 4 раза. Удельная активность ЛОГ соевых бобов превышала удельную активность ЛОГ зерна пшеницы на 140%.

Определение оптимальных условий для действия экзогенных фермента и субстрата. Известно, что ферментативно активная соевая мука, как источник ЛОГ, используется различными производителями в составе коммерческих препаратов для улучшения пшеничного теста. В нашей работе для по-

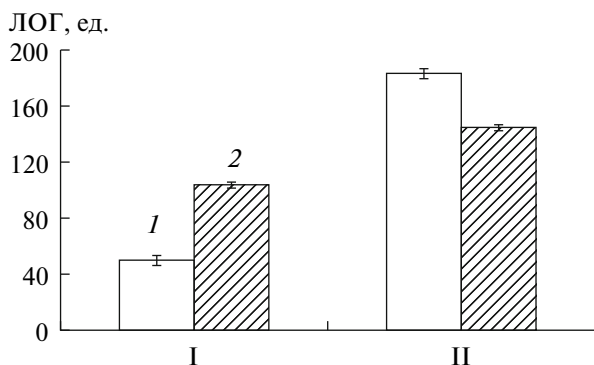


Рис. 2. Ферментативная активность ЛОГ в экстрактах пшеничной (I) и соевой (II) муки: 1 – активность, ед., 2 – удельная активность.

иска условий ее положительного влияния в минимальном количестве, мы использовали различные варианты замеса теста (табл. 1).

Показатели на стадии брожения теста во всех вариантах опыта достоверно не отличались от контроля. Параметры расстойки теста и органолептическая оценка хлебцев в вариантах 2 и 3 мало отличались от контрольного варианта, а показатели объема хлеба оказались ниже контроля. Параметры хлебцев во 2 варианте достоверно не отличались от контрольного варианта, а в 3 варианте ухудшались. Общая хлебопекарная оценка в вариантах опыта 2 и 3 была низкой, как и в контроле. Положительное влияние внесения в тесто фермента и субстрата в составе соево-дрожжевого гомогената (вариант 4) проявилось в достоверном увеличении параметра Н/D на стадии расстойки теста и у готовых хлебцев, а также в увеличении объема хлеба и всех параметров органолептической оценки. Общая хлебопекарная оценка в этом варианте опыта оказалась высокой.

В связи с тем, что для действия ЛОГ требуется молекулярный кислород, тесто дополнительно интенсивно перемешивали в течение 1 мин, насыщая кислородом. Результаты перечисленных выше вариантов опыта, но с дополнительным активированием теста кислородом, представлены в табл. 2. Сравнение данных табл. 1 и 2 показало, что при дополнительном активировании теста кислородом все хлебопекарные параметры, за исключением объема хлеба, значительно увеличивались как в контроле, так и во всех вариантах опыта. Это связано с тем, что насыщение теста кислородом способствует активации не только экзогенного фермента, но и эндогенных пшеничных ЛОГ, а также других оксидоредуктаз пшеничной муки.

Тем не менее по отношению к контролю во всех вариантах наблюдалось некоторое увеличение показателей на стадии брожения теста и значительное увеличение параметров хлебцев. Наиболее высокими эти показатели оказались в варианте 3 при

добавлении соевой муки непосредственно в тесто. В этом варианте опыта, а также в варианте 4 улучшались и основные параметры органолептической оценки, а в варианте 2 при добавлении растительного масла ухудшались. Сочетание дополнительного активирования теста кислородом с внесением в тесто соево-дрожжевого гомогената (вариант 4) показало такие же результаты на стадии брожения и расстойки теста, параметры хлебцев и органолептическую оценку, как и при непосредственном добавлении соевой муки в тесто. Однако в этом случае значительно увеличивались показатели объема хлеба, в то время как отдельное внесение фермента или субстрата (варианты 2 и 3) на объем хлеба влияния не оказывало. Общая хлебопекарная оценка в варианте 4 была высокой.

Таким образом, добавление непосредственно в тесто при замесе небольшого количества (2%) соевой муки с высоким содержанием ЛОГ или растительного масла, содержащего субстрат фермента – полиненасыщенные жирные кислоты, не улучшало хлебопекарных показателей и уменьшало объем хлеба. Дополнительное насыщение теста кислородом в течение 1 мин приводило к значительному увеличению всех показателей, за исключением объема хлеба, увеличивая общую хлебопекарную оценку до среднего значения. Ферментация, происходящая в соево-дрожжевом гомогенате, значительно увеличивала все изучаемые параметры по отношению к контролю, повышая общую хлебопекарную оценку до высокого значения как при дополнительном активировании теста кислородом, так и без него. Однако наиболее высокие хлебопекарные показатели были получены при сочетании внесения в тесто соево-дрожжевого гомогената и дополнительного активирования теста кислородом. При этих условиях параметры готовых хлебцев увеличивались на 185%, а показатели объема хлеба – на 23.7%.

Обесцвечивающий эффект фермента и его влияние на объем хлеба. Известно, что разные изоформы ЛОГ играют различную роль в хлебопечении. Например, среди 3 изоферментов зерновки пшеницы изоформа L-3 значительно увеличивала объем хлеба, а изоформы L-1 и L-2 мало влияли на объем хлеба, но осветляли его мякиш и корочку [13]. Действие изоферментов ЛОГ сои на физические свойства теста может быть подобно пшеничным.

Обесцвечивающее действие связано со способностью некоторых ЛОГ разрушать каротиноидные пигменты муки [14, 15]. В нашем исследовании осветляющее действие ЛОГ соевой муки можно проследить по изменению параметра “Цвет мякиша” в варианте с добавлением соевой муки на 0.3 балла и в варианте с дополнительной ферментацией на 0.6 балла (табл. 1). Дополнительное активирование теста кислородом, вероятно, способствует интенсивному обесцвечиванию каротиноидов эндогенными пшеничными ЛОГ, поэтому в данном случае этот эффект проявился уже в контрольном варианте опыта (табл. 2).

Таблица 1. Хлебопекарные свойства теста при различных вариантах замеса без дополнительного активирования кислородом

Хлебопекарный параметр	Вариант			
	1	2	3	4
Брожение				
V, мл 60 мин	81.8 ± 4.2	—	—	86.5 ± 1.0
90 мин	102.8 ± 3.5	87.0 ± 6.7	97.5 ± 2.5	96.0 ± 1.0
120 мин	108.2 ± 4.8	110.0 ± 7.0	120.0 ± 5.0	104.7 ± 4.3
Расстойка				
60 мин, Н	18.0 ± 1.0	17.0 ± 0.7*	20.0 ± 1.0	24.3 ± 0.3***
D	63.6 ± 2.3	58.5 ± 3.2***	65.5 ± 2.5	55.3 ± 0.4***
H/D	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.01***
90 мин, Н	19.5 ± 1.0	17.0 ± 0.1	—	23.6 ± 0.5
D	67.0 ± 0.9	57.5 ± 0.5	—	58.1 ± 4.1
H/D	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.05	—	0.4 ± 0.04*
Хлебцы				
Вес, г	25.9 ± 0.4	27.4 ± 0.3*	27.2 ± 0.5	26.4 ± 0.2
H	25.7 ± 2.1	24.5 ± 1.9	15.5 ± 0.5**	37.6 ± 2.3***
D	63.6 ± 1.8	63.3 ± 3.0	70.5 ± 3.5	56.3 ± 3.3
H/D	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.03	0.2 ± 0.02***	0.7 ± 0.1***
Балл	2.7 ± 0.02	2.7 ± 0.05	2.0 ± 0.01***	4.7 ± 0.1***
Объем хлеба				
мл	77.3 ± 5.6	68.3 ± 0.8	75.0 ± 5.0	88.0 ± 5.8
на 100 г муки	359.0 ± 7.6	311.0 ± 3.5***	341.0 ± 23.0	403.0 ± 19.1*
Балл	1.2 ± 0.07	0.3 ± 0.08***	0.8 ± 0.05**	2.0 ± 0.1***
Органолептическая оценка				
Внешний вид	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.1	2.8 ± 0.02	4.3 ± 0.1***
Поверхность	3.4 ± 0.2	4.0 ± 0.1*	3.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1*
Форма	3.1 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.0 ± 0.04	4.5 ± 0.1***
Цвет корки	3.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1**	2.5 ± 0.02*	4.3 ± 0.1**
Пористость	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.0 ± 0.01	3.9 ± 0.1**
Эластичность	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.02
Цвет мякиша	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.3 ± 0.1*
Вкус, запах	3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.02	4.0 ± 0.3
Общая хлебопекарная оценка				
Балл	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.9 ± 0.1***
Оценка	Низкая	Низкая	Низкая	Высокая

Примечание к табл. 1 и 2. Варианты: 1 – контроль, 2 – добавление растительного масла, 3 – добавление соевой муки, 4 – добавление соево-дрожжевого гомогената.

Даны средние значения ± ошибка среднего. Прочерк – нет данных.

H – высота, мм; D – диаметр, мм. Параметры органолептической оценки указаны в баллах.

Достоверность различия с контролем: $P < 0.05^*$, $P < 0.01^{**}$, $P < 0.001^{***}$.

Таблица 2. Хлебопекарные свойства теста при различных вариантах замеса с дополнительным активированием кислородом

Хлебопекарный параметр	Вариант			
	1	2	3	4
Брожение				
V, мл 60 мин	77.3 ± 2.0	89.2 ± 2.1**	81.5 ± 1.5	88.3 ± 1.4**
90 мин	90.0 ± 5.1	96.3 ± 2.7	90.0 ± 0.1	99.7 ± 2.6
120 мин	101.8 ± 2.4	109.7 ± 5.2	109.0 ± 1.0*	109.0 ± 2.9
Расстойка				
60 мин, Н	23.7 ± 1.4	21.7 ± 1.2	25.5 ± 0.5	21.7 ± 0.7
D	57.0 ± 1.8	54.3 ± 4.4	47.0 ± 1.0***	52.5 ± 2.0
H/D	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.54 ± 0.01***	0.4 ± 0.01
90 мин, Н	24.3 ± 1.0	26.3 ± 1.6	25.0 ± 0.1	24.3 ± 0.2
D	60.0 ± 3.5	51.3 ± 1.3*	48.5 ± 0.5**	58.0 ± 2.6
H/D	0.4 ± 0.04	0.5 ± 0.02*	0.5 ± 0.01*	0.4 ± 0.03
Хлебцы				
Вес, г	26.0 ± 0.5	27.5 ± 0.4	29.1 ± 1.4	26.4 ± 0.3
H	35.5 ± 2.3	39.3 ± 1.6	44.0 ± 1.0**	41.3 ± 2.7
D	56.0 ± 1.8	56.7 ± 2.7	53.0 ± 0.1	53.0 ± 4.9
H/D	0.6 ± 0.04	0.7 ± 0.04	0.8 ± 0.02***	0.8 ± 0.08***
Балл	4.0 ± 0.04	4.7 ± 0.3*	5.0 ± 0.1***	5.0 ± 0.2***
Объем хлеба				
мл	80.0 ± 6.4	81.8 ± 1.4	77.5 ± 2,5	95.6 ± 2.5*
на 100 г муки	359.0 ± 26.4	372.0 ± 6.5	362.0 ± 11.0	426.0 ± 10.2*
Балл	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.2	2.5 ± 0.3
Органолептическая оценка				
Внешний вид	4.1 ± 0.1	3.7 ± 0.04***	4.3 ± 0.01***	4.3 ± 0.01***
Поверхность	3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.1*
Форма	4.2 ± 0.3	4.7 ± 0.1	5.0 ± 0.1*	4.7 ± 0.1**
Цвет корки	4.2 ± 0.1	2.7 ± 0.1**	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.1
Пористость	4.0 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.0 ± 0.01***	4.0 ± 0.01
Эластичность	4.0 ± 0.01	4.2 ± 0.03	4.5 ± 0.01***	4.3 ± 0.1*
Цвет мякиша	4.3 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.5 ± 0.1**	4.3 ± 0.1
Вкус, запах	4.0 ± 0.01	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1
Общая хлебопекарная оценка				
Балл	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.1 ± 0.1**
Оценка	Средняя	Средняя	Средняя	Высокая

Увеличение объема хлеба в нашем исследовании происходило только при внесении соевого дрожжевого гомогената. Очевидно, в этом случае

происходит более длительная ферментация теста, что создает наиболее благоприятные условия для действия экзогенной ЛОГ.

Добавление в тесто полиеновых жирных кислот. Изменения реологических свойств во время ферментации теста являются следствием окисления сульфгидрильных групп пероксидами и гидропероксидами жирных кислот, образованными при действии ЛОГ на липиды. Для ферментативной функции ЛОГ требуются свободные липиды. Это подтверждается тем, что ЛОГ не изменяла свойств обезжиренной муки, а добавление к обезжиренной муке линолевой кислоты восстанавливало ее действие [5, 6]. В нашей работе отдельное внесение ненасыщенных жирных кислот при замесе теста в соотношении 1 : 50 не изменяло значительно параметры хлеба, а в некоторых случаях даже ухудшало их (табл. 1). Однако в случае дополнительного активирования теста кислородом происходило улучшение отдельных хлебопекарных показателей, достоверно отличающихся от контроля, а при совместном внесении в тесто полиеновых жирных кислот и фермента в составе соево-дрожжевого гомогената наблюдался большой положительный эффект (табл. 2).

Добавление ЛОГ соевой муки к пшеничной муке действует подобно добавлению химических оксидантов, но действие ЛОГ более мягкое. Вероятно, связывание продуктов окисления ЛОГ приводит к уменьшению поверхностной гидрофобности растворимых глютелинов, структурным изменениям в белках теста и укреплению клейковины и теста.

Ранее нами было показано, что активность эндогенной ЛОГ зерновки пшеницы связана с такими технологическими параметрами, как сила муки, упругость, растяжимость, смесительные свойства теста, а фермент действует на клейковину и тесто, уменьшая параметр растяжимости теста [10]. По этой причине ЛОГ может применяться только для улучшения муки и теста низкого качества с высокой растяжимостью.

Кроме того, для хорошего качества клейковины необходим оптимальный диапазон уровня активности ЛОГ [10]. Как и при применении химических оксидантов, чрезмерное количество фермента и его высокая активность могут стать причиной образования слишком большого числа дисульфидных связей, уменьшения растяжимости теста и очень сильного укрепления клейковины и теста, приводящего к их ухудшению.

В данной работе было подтверждено положительное влияние ЛОГ соевой муки на хлебопекарные свойства пшеницы низкого качества и были найдены условия, при которых это влияние проявлялось при добавлении 2% соевой муки при замесе пшеничного теста.

По механизму и результатам действия ферментативно активная соевая мука прекрасно подходит для целенаправленной корректировки муки низ-

кого качества с высокой растяжимостью клейковины и с успехом может заменить дорогостоящие окислительные улучшители и препараты сухой клейковины известных производителей. Более того, она может быть более эффективна, чем препараты сухой клейковины при переработке муки из пшеницы с примесью зерна, поврежденного клопом-черепашкой, когда действие клейковины будет снижено, так как протеолитические ферменты клопа дезагрегируют как собственные белки муки, так и внесенной клейковины.

Продемонстрированное нами достоверное увеличение показателей на стадии брожения и расстойки теста, параметров хлебцев, объема хлеба и органолептической оценки при добавлении 2% соевой муки и подсолнечного масла в составе соево-дрожжевого гомогената в тесто из пшеничной муки при дополнительном активировании его кислородом, позволяет применить этот экономичный способ улучшения теста в хлебопекарном производстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Труфанов В.А. Клейковина пшеницы: проблемы качества. Новосибирск: Наука, 1994. 166 с.
2. Shewry P.R., Tatham A.S. // J. Cereal Sci. 1997. V. 25. № 3. P. 207–227.
3. Békés F., Grass P.W., Gupta R.B. // Cereal Chem. 1994. V. 71. № 1. P. 44–50.
4. Dunnewind B., van Vliet T., Orsel R. // J. Cereal Sci. 2002. V. 36. № 3. P. 357–366.
5. Hosoney R.C., Rao H., Faubion J., Sighu J.S. // Cereal Chem. 1980. V. 57. № 3. P. 163–166.
6. Faubion J.M., Hosoney R.C. // Cereal Chem. 1981. V. 58. № 3. P. 175–180.
7. Lai C.S., Davis A.B., Hosoney R.C. // Cereal Chem. 1989. V. 66. № 3. P. 224–246.
8. Nelles E.M., Randall P.G., Taylor J.R.N. // Cereal Chem. 1998. V. 75. № 4. P. 536–540.
9. Zimmerman D.C., Vick B.A. // Plant Physiol. 1970. V. 3. № 3. P. 445–453.
10. Пермьякова М.Д., Труфанов В.А., Пшеничникова Т.А., Ермакова М.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 96–102.
11. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М.: Госагропром, 1988. 122 с.
12. Siedow J.N. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. V. 42. № 1. P. 145–188.
13. Shiiba K., Negishi Y., Okada K., Nagao S. // Cereal Chem. 1991. V. 68. № 2. P. 115–122.
14. McDonald C.E. // Cereal Chem. 1979. V. 50. № 4. P. 292–302.
15. Lomnitski L., Bar-Natan R., Sklan D., Grossman S. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1167. № 3. P. 331–338.

Effect of Soybean Lipoxygenase on Baking Properties of Wheat Flour

M. D. Permyakova and V. A. Trufanov

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Irkutsk, 664033 Russia*

e-mail: gluten@sifibr.irk.ru

Received April 14, 2010

Abstract—Changes in bread-baking properties of wheat flour caused by soybean lipoxygenase and polyunsaturated fatty acids were studied. A positive effect of soybean flour added during dough kneading in an amount of 2% was demonstrated. A method for dough fermentation increasing the loaf volume and improving organoleptic characteristics and total bread-baking estimate is recommended.

УДК 619.611:636.06

РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕПРЯМОГО КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОМИЦИНА В МОЛОКЕ

© 2011 г. М. А. Буркин, И. А. Гальвидис

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, 105064
e-mail: burma68@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.02.2010 г.

В результате иммунизации кроликов неомицином В (НМ), конъюгированным с окисленным периодатом трансферина, были получены поликлональные антитела, на основе которых создан непрямой конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). При использовании полимеризованного глутаровым альдегидом (ГА) НМ, желатины-рибостамицин(пи) и желатины-НМ(га) в качестве твердофазных антигенов были разработаны ИФА-системы для количественного определения антибиотика в молоке с различным рабочим диапазоном измерения и пределами определения – 1.0, 0.1 и 0.01 нг/мл, соответственно. Без специальной пробоподготовки максимально допустимый уровень (МДУ) этого антибиотика в молоке, установленный в странах ЕС, мог выявляться в наименее чувствительном варианте при 100-кратном разведении образца. Средний показатель извлечения при анализе молока 1.5–10% жирности составил 111.7% при общем диапазоне 84–125.2%. При анализе 106 проб молока уровень НМ был выше 100 нг/мл в 57 образцах. В 10% случаев остаточное содержание препарата превышало 500 нг/мл. Превышение МДУ было зарегистрировано в 1 случае (1690 нг/мл). Разработанный метод специфичен, не подвержен влиянию со стороны других используемых в ветеринарии аминокликозидов, обладает большим запасом чувствительности и может служить эффективным инструментом определения содержания НМ в молочном сыре.

Неомицин – комплекс аминогликозидных антибиотиков (неомицины А, В, С), продуцируемый *Streptomyces fradiae*, из которых более 90% приходится на неомицин В (НМ) – наиболее активный и практически значимый компонент, а содержание неомицина А (неамин) не превышает 1%. В таком же соотношении эти соединения представлены в коммерческих препаратах антибиотика. Бактерицидная активность неомицина распространяется на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, находящиеся как в стадии размножения, так и в стадии покоя. К нему чувствительны стафилококки, пневмококки, листерии, эшерихии, сальмонеллы, возбудитель сибирской язвы и др. В ветеринарии НМ используют для лечения и профилактики желудочно-кишечных инфекций, легочных, гнойно-септических и кожных заболеваний. Как и другие аминогликозиды НМ нейро- и нефротоксичен [1]. Для регламентации остаточных количеств антибиотика в продуктах питания, провоцирующих формирование резистентности и селекцию устойчивых к данному препарату микроорганизмов, во многих странах установлен максимально допустимый уровень (МДУ) его содержания в продуктах животного происхождения. Так, в странах ЕС этот показатель, определяемый по маркерному соединению неомицину В, составляет 500 мкг/кг для мяса, жира, печени и яиц, 1500 мкг/кг для моло-

ка и 5000 мкг/кг – для почек [2]. В Российской Федерации нормирование по данному антибиотику не установлено, рекомендуемая экспертами ФАО/ВОЗ остаточная концентрация препарата в молоке не должна превышать 500 мкг/кг [3].

Микробиологические тесты, обычно используемые для выявления антибактериальной активности в объекте и основанные на подавлении роста чувствительной к антибиотику культуры микроорганизма, позволяют регистрировать НМ до 500 мкг/кг. Однако, они длительны, неспецифичны и непригодны в случаях сочетания нескольких антибактериальных препаратов. Аналитические методы, рекомендованные для идентификации этого препарата в продуктах животного происхождения, основаны на ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией или жидкостной хроматографии с пределом определения 100 мкг/кг (www.emea.europa.eu; www.codexalimentarius.net). Трудоемкость и дороговизна хроматографических методов ограничивает их применение для массового анализа образцов. Привлекательность иммуноферментного анализа (ИФА) для определения НМ наряду с простотой, специфичностью и чувствительностью, значительно превышающей вышеупомянутые методы [4–6], обусловлена также удобством его использования для скрининговых исследований.

Цель работы — создание непрямого конкурентного ИФА как простого и удобного метода, пригодного для выполнения скрининговых исследований с целью выявления остаточных количеств НМ в молоке.

МЕТОДИКА

В работе использовали трисульфат неомидина В (“Huashu Pharmaceutical Corporation”, Китай), сульфаты амикацина (АМ, “Eczacibasi Ilac San ve Tic A.S.”, Турция), канамицина (КМ), сизомицина (СЗМ), гентамицина (ГМ), стрептомицина (СМ), рибостамицина (РС) и апрамицина (АП), трансферин человека (ТР), пероксидазу хрена (КФ 1.11.1.7) и *o*-фенилендиамин, (“Sigma”, США), неамин (неомицин А — НА, “European Pharmacoceia”), сухое молоко (70166, “Fluka”, Швейцария), нетилмицин (НТМ, “Schering-Plough Labo N.B.”, Бельгия), тобрамицин (ТМ, “Lilly France S.A.”, Франция), антисыворотку осла к иммуноглобулинам кролика, бычий сывороточный альбумин (БСА) и желатин (Жел) отечественного производства. Объектом исследования служило молоко (106 образцов) из розничной торговой сети с различным содержанием жира (0.1–35%), произведенное на территории европейской части России и ближайшего зарубежья в 2008–2009 гг.

Синтез конъюгированных антигенов. ТР(ну)-НМ × 30, ТР(ну)-НМ × 100. К 3 мл водного раствора, содержащего 20 мг ТР (2 × 130 нмоль), добавляли 17 мг кристаллического периодата натрия (ПИ) и перемешивали на магнитной мешалке в течение 15 мин. Окисленный гликопротеин диализовали против 10 мМ ацетатного буфера (рН 5.0) в течение 1 сут при 4°C. Объем полученного диализата делили на 2 равные порции, к которым добавляли 3.6 и 11.8 мг НМ в 1.2 мл 0.05 М карбонат-бикарбонатного буфера, рН 9.5 (КББ), что соответствовало 30- и 100-кратному мольному избытку, и инкубировали при перемешивании в течение 2 ч. Затем в реакционные смеси вносили по 100 мкл раствора боргидрида натрия (2 мг/мл) и перемешивали еще 2 ч. Полученные конъюгаты подвергали исчерпывающему диализу против 0.15 М фосфатного буфера, рН 7.0.

Поли-НМ-0.3(га), Поли-НМ-1(га), Поли-НМ-3(га). К трем порциям по 36.4 мг НМ (40 мкмоль) в 1 мл 0.015 М КББ добавляли 53, 160 и 480 мкл 2.5%-ного раствора глутарового альдегида (ГА, 0.3-, 1- и 3-кратные мольные избытки по отношению к НМ) и перемешивали в течение ночи при 4°C. В реакционные смеси, приобретшие желтоватый оттенок, интенсивность которого была пропорциональна количеству внесенного ГА, добавляли 50, 100 и 300 мкл NaBH₄ (4 мг/мл) и перемешивали в течение 2 ч. Не вступившие в реакцию ингредиенты были удалены в результате исчерпывающего диализа при порозности мембраны порядка 12000 Да (“Sigma”,

США). Полученный полимерный антиген разбавляли вдвое глицерином и хранили при –15°C.

Жел-НМ × 5(га), Жел-НМ × 15(га), Жел-НМ × 25(га). К водным растворам, содержащим по 4 мг Жел (0.025 мкмоль) в 1 мл, добавляли 22.7, 68.2 и 113.6 мкл (125, 375 и 625 нмоль) раствора НМ (5 мг/мл) 5-, 15- и 25-кратные мольные избытки, соответственно и по 30 мкл свежеприготовленного 2.5%-ного раствора ГА. Через 2 ч перемешивания при комнатной температуре в каждую реакционную смесь вносили по 100 мкл боргидрида натрия в концентрации 1 мг/мл, перемешивали еще 2 ч и подвергали диализу в течение 2 сут против 5 л дистиллированной воды.

Жел-РС × 30(ну), Жел-РС × 100(ну). К водному раствору РС, содержащему 4.2 мг в 0.5 мл (9.25 мкмоль), добавляли 4.1 мг NaIO₄ (19 мкмоль) в 1 мл воды и перемешивали 15 мин при комнатной температуре. К водным растворам, содержащим по 4 мг Жел (0.025 мкмоль) в 1 мл, добавляли 30- и 100-кратный мольные избытки окисленного РС (0.75 и 2.5 мкмоль) — 120 и 300 мкл соответственно. Через 1 ч перемешивания при комнатной температуре в каждую реакционную смесь вносили по 100 мкл боргидрида натрия в концентрации 2 мг/мл, и спустя 1 ч диализовали. В диализаты добавляли равный объем глицерина и сохраняли при –15°C в виде растворов с концентрацией 1 мг/мл (по белку).

Иммунизация и получение антисыворотки. Кроликам темной масти массой 2.5–3 кг инъецировали подкожно в 10–15 точек области спины эмульгированный в полном адьюванте Фрейнда ТР-НМ × 100(пи) в дозе 100 мкг. Повторные введения иммуногена осуществляли в той же дозе водными растворами. Через 7 сут после каждой повторной инъекции у животных из краевой вены уха отбирали кровь, отделяли сыворотку, добавляли равный объем глицерина и хранили до использования при –15°C.

Изучение иммунного ответа и оптимизация ИФА. Развитие иммунного ответа у животного оценивали по взаимодействию антисывороток в непрямом ИФА с адсорбированными на 96-луночных планшетах (“Costar”, США) конъюгированными антигенами. Для этого ячейки заполняли 0.2 мл раствора конъюгата в диапазоне концентраций 0.05–1.5 мкг/мл (1/1000–1/30000 для Поли-НМ(га)) в КББ и инкубировали 16 ч при 4°C. Затем планшеты отмывали 4–5 раз 0.15 М фосфатно-солевым буфером, рН 7.5, содержащим твин 20 (ФСБ-т), и в ячейки вносили по 0.1 мл ФСБ-т и антисыворотку в серийных разведениях в том же буфере с 1% БСА. Через 1 ч инкубации ячейки планшетов вновь отмывали и заполняли 0.2 мл раствора конъюгата антител к IgG кролика с пероксидазой хрена. После 1 ч инкубации и отмывки в ячейки помещали по 0.2 мл субстратного раствора, содержащего 0.4 мг/мл *o*-фенилендиамина и 0.005% H₂O₂ в 0.15 М цитрат-фосфатном буфере, рН 5.0. Через

45 мин ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 4 М серной кислоты и проводили фотометрию при 492 нм.

Соотношения концентраций иммунореагентов, полученные в результате такого “шахматного” титрования и обеспечивающие оптическую плотность реакции в диапазоне от 0.8 до 1.2, использовали в конкурентном анализе.

Непрямой конкурентный ИФА. Условия проведения анализа не отличались от описания, приведенного выше. Для иммобилизации на твердой фазе использовали растворы конъюгированных антигенов в подобранных концентрациях. После инкубации и отмывки соответствующие разведения антисыворотки в ФСБ-т, содержащем 1% БСА, вносили в лунки по 0.1 мл вместе с растворами антибиотика (1000–0.1 и 0 нг/мл) в ФСБ-т или образца, разведенного в том же буфере. Завершающие этапы реакции проводили согласно описанной выше процедуре.

Уровень связывания антител в лунках с нулевой концентрацией НМ принимали за 100% и по отношению к этому показателю вычисляли процент связывания антител для каждой концентрации вещества.

Из серии твердофазных антигенов с различной гаптенной нагрузкой для дальнейших исследований отбирали вариант, обеспечивающий наибольшую чувствительность определения НМ.

Перекрестное взаимодействие антител определяли как процентное отношение концентрации НМ к соответствующим концентрациям РС, НА, ГМ, СЗМ, ТМ, КМ, СМ и АП, вызывающим половинное ингибирование связывания (IC_{50}). Графическую и статистическую обработку результатов осуществляли по программе Origin 8.0.

Подготовка образцов и тест на извлечение. В связи тем, что ингредиенты, входящие в состав молока, оказывали довольно заметно влияние на взаимодействие антител с антигеном, выражающееся в снижении уровня сигнала, так называемый “матрикс-эффект”, для имитации подобных помех нами было использовано сухое молоко. Раствор этого реактива, приготовленный в соответствии с рекомендациями производителя и соответствующий по степени матричного эффекта нормальному молоку, служил средой для приготовления калибровочных растворов.

В шесть различных НМ-негативных по предварительному тестированию образцов молока с 1.5–10%-ным содержанием жира вносили НМ в конечной концентрации 10000, 1000 и 100 нг/мл. При пробоподготовке образцы разводили в 100 раз ФСБ-т, и соответствие содержания антибиотика уровню в 100, 10 и 1 нг/мл определяли с помощью ИФА. По отношению усредненного для различных образцов значения к внесенной концентрации определяли степень извлечения.

Для выяснения влияния температурного воздействия при стерилизации или пастеризации на содержание НМ в молоке ряд образцов с известным содержанием препарата подвергали 5-минутной инкубации в кипящей водяной бане и последующему иммуноферментному тестированию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие характерной картины в УФ-спектре НМ не позволило оценить синтезированный иммуноген спектрофотометрически. Убедительных различий в электрофоретической подвижности между ТР(пи)-НМ \times 30 и ТР(пи)-НМ \times 100, свидетельствующих об увеличении плотности гаптена на носителе получено не было (данные не приведены). Тем не менее, для иммунизации кроликов использовали иммуноген с большим соотношением гаптен/носитель при синтезе – ТР(пи)-НМ \times 100. Периодатный метод, используемый нами для приготовления иммуногена, альтернативный, описанным другими авторами (глутаральдегидному и карбодимидной конденсации) [4, 6], также основывался на реакции между белком и шестью возможными аминогруппами НМ или четырьмя в случае НА. Поэтому расположение гаптена на носителе, как и в указанных работах, могло быть мультивариантным.

Наличие более, чем одной NH_2 -группы в молекуле НМ позволило нам рассмотреть возможность полимеризации молекулы посредством перекрестного сшивания диальдегидом. Причем от соотношения ГА : НМ зависел вид полимера – линейный или разветвленный. Взаимодействие антител с Поли-НМ-0.3(га) было заметно слабее, чем с двумя другими полимерными антигенами. По-видимому, данный препарат имел недостаточную степень полимеризации, и часть олигомеров была элиминирована в ходе диализа. Трехкратный избыток ГА по отношению к НМ в случае Поли-НМ-3(га) должен был приводить к ветвлению полимера и соответственно к большему экранированию детерминант молекулы антибиотика. Однако это незначительно повлияло на эффективность его связывания с антителами. Наилучшими же характеристиками анализа обладал вариант с иммобилизованным Поли-НМ-1(га). Эквимолярное соотношение кросслинкера и НМ является условием для образования скорее линейного полимера, а степень полимеризации (n) могла быть представлена формулой:

$$n \geq 12000 \text{ Да/Мм[НМ-ГА]},$$

где 12000 Да – порозность диализной мембраны; Мм[НМ-ГА] – молекулярная масса пентанала НМ – 699. Таким образом, расчетная степень полимеризации – $n \geq 17$.

В результате подбора оптимальных концентраций иммунореагентов и конкурентных исследований из серии остальных конъюгатов с различным соотношением реагентов при синтезе были отобра-

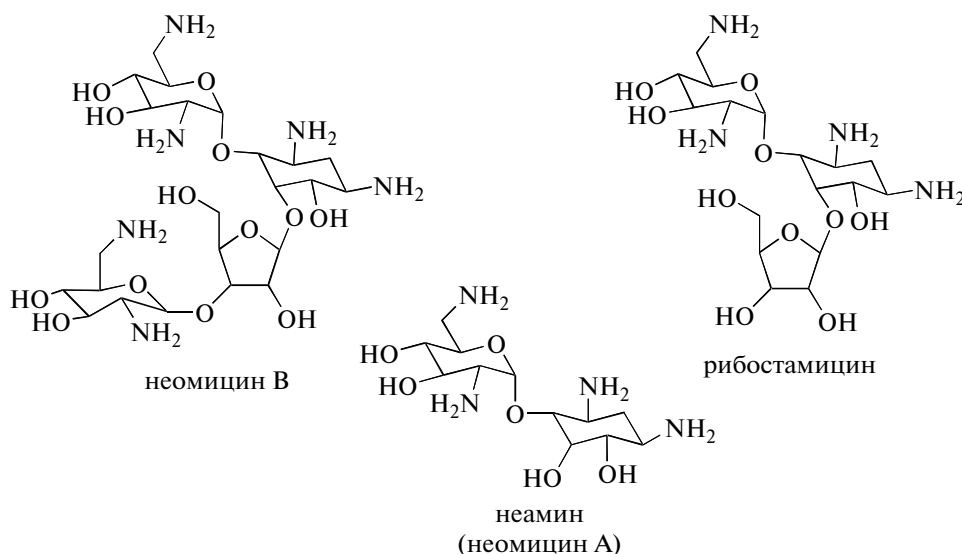


Рис. 1. Химическая структура аминогликозидов группы НМ.

ны твердофазные антигены, обеспечивающие более чувствительное определение НМ. Таковыми оказались Жел-НМ $\times 5$ (га) с наименьшей гаптенной нагрузкой и Жел-РС $\times 100$ (пи). Особенность последнего конъюгата в отличие от предыдущих заключается в гетерологичности гаптена, имеющего три из четырех гликозидных остатков НМ (рис. 1), и строго определенной его ориентации на носителе. Воздействие NaIO_4 на РС приводило к окислению vicинально расположенных гидроксильных на рибозильном фрагменте молекулы и их последующему взаимодействию с аминок группами белка.

Анализ динамики иммунного ответа показал, что к третьему взятию крови титр сыворотки возрос, и она могла обеспечивать достаточно высокий уровень чувствительности анализа. Так, рабочее разведение антисыворотки при использовании (га)-конъюгатов соответствовало 1/3000–1/7500. Использование Жел-РС $\times 100$ (пи) требовало более высокой концентрации антител – 1/300–1/500.

Калибровочные кривые иммуноферментных систем анализа, сконструированных на основе подобранных пар иммунореагентов, представлены на рис. 2. Как показано в работе [4], существенное влияние на чувствительность анализа может оказывать структурная гетерологичность (вид гаптена и способ его конъюгирования с носителем) иммобилизованного антигена по сравнению с иммуногеном. Настоящее исследование, использующее альтернативные подходы к созданию иммунореагентов, не является исключением из этого наблюдения. Так предел детекции НМ для варианта Жел-РС $\times 100$ (пи) – ИФА составил 0.1 нг/мл, а рабочий диа-

пазон – 0.1–100 нг/мл, на порядок меньшую чувствительность обеспечивал полимерный антиген (1–1000 нг/мл), а иммобилизованный Жел-НМ $\times 5$ (га) позволял выявлять до 0.01 нг/мл при диапазоне 0.01–10 нг/мл.

Перекрестное взаимодействие различных аминогликозидов с полученными антителами оценивалось по отношению концентраций половинного ингибирования связывания – IC_{50} (НМ)/ IC_{50} (аминогликозид) $\times 100\%$. В таблице приведены значения, отражающие конкурентоспособность этих препаратов в условиях рассмотренных ИФА-вариантов и свидетельствующие об избирательности анализа в отношении НМ.

Слабое распознавание НА и РС, аналогов, являющихся фрагментами молекулы НМ, в Поли-НМ-1(га)-ИФА и Жел-НМ $\times 5$ (га)-ИФА было, вероятно, следствием блокирования аминок групп (четырех из шести) неаминовой части НМ в составе иммуногена в результате конъюгирования. Таким образом, основная часть пула антител сыворотки вероятно направлена к фрагменту НМ, отсутствующему у НА и у РС. Использование же твердой фазы с иммобилизованным Жел-РС $\times 100$ (пи), позволило, благодаря определенной ориентации гаптена на носителе, задействовать в реакции только часть антител из пула, которые направлены к фрагменту молекулы, общему для НА, РС и НМ. При этом значительно возросла конкурентоспособность этих соединений, которая достигла 36.2% для НА и 74.1% для РС. По сравнению с двумя предыдущими вариантами ИФА также несколько увеличилось перекрестное взаимодействие и других 2-дезоксистрептаминовых

аминогликозидов – КМ, ТМ и ГМ, СЗМ, однако, его уровень оставался по-прежнему незначительным (не более 0.4%). Таким образом, количественное определение НМ во всех рассмотренных системах анализа было селективным и не подвержено помехам со стороны других используемых в ветеринарной практике аминогликозидных препаратов ГМ, КМ, СМ и АП, активность которых по сравнению с НМ была слабее более, чем в 100 раз. Подобная строгая специфичность антител, т.е. отсутствие перекрестных взаимодействий со структурными аналогами, отмечалась и в других работах [4, 5] и объясняется особенностями дизайна иммуногена, при котором общие для некоторых аминогликозидов детерминанты оказывались экранированными.

В связи с тем, что МДУ НМ в молоке достаточно высок (1500 мкг/кг), а разработанные нами системы позволяли выявлять до 0.01–1 нг/мл, для удобства тестирования образцов молока во всех последующих экспериментах мы использовали менее чувствительный вариант Поли-НМ-1(га)-ИФА. При этом образцы разводили в 100 раз ФСБ-т буфером, при таком разведении МДУ приходился на середину калибровочной кривой (15 нг/мл) и соответствовал 50%-ному связыванию (рис. 2). Таким образом, при данных условиях степень контаминации молока можно было регистрировать в широком диапазоне, как на порядок выше, так и ниже установленного максимального значения. Другие же, более чувствительные варианты могут быть полезными для анализа объектов с ярко выраженным матрикс-эффектом, устранение которого возможно при дополнительном разведении образца.

Тестирование проб с искусственным внесением антибиотика проводилось на образцах с нулевым содержанием НМ по данным предварительной проверки. Кроме того, оценивали необходимость обезжиривания молока как этапа пробоподготовки в экспериментах на молоке 1.5-, 2.5-, 3.2-, 4.0- и 10%-ной жирности. При иммуноферментном те-

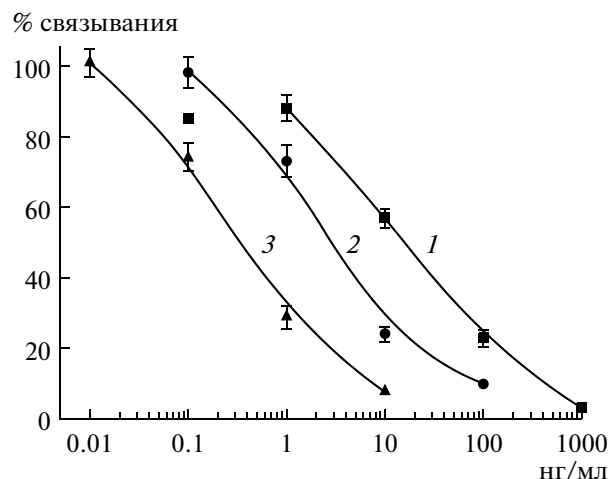


Рис. 2. Калибровочные кривые определения НМ в иммуноферментных системах на основе антител к ТР(пи)-НМ и различных иммобилизованных конъюгатов: 1 – Поли-НМ(га), 2 – Жел-РС(пи), 3 – Жел-НМ(га). Каждая точка представляет среднее значение ($n = 3$), величина ошибки соответствует стандартному отклонению.

стировании указанных проб молока ($n = 6$), содержащих 10000, 1000 и 100 нг/мл НМ, существенных различий между образцами с разным содержанием жира выявлено не было. Таким образом, без специальной пробоподготовки при 100-кратном разведении молока независимо от степени его жирности достигнуто 111.7%-ное извлечение анализа при общем диапазоне значений 84–125.2%.

Проверка термостабильности НМ была предпринята из-за использования в исследовании не сырого молока, а прошедшего пастеризацию или стерилизацию. Термическое воздействие в виде 5-минутной инкубации в кипящей водяной бане не отразилось на уровне выявления препарата, то есть иммунохимическая активность НМ не претерпела

Перекрестное взаимодействие антител в различных вариантах ИФА

Иммобилизованный антиген	IC ₅₀ , нг/мл	Относительная перекрестная активность, %								
		НМ	НА	РС	ГМ	СЗМ	ТМ	КМ	СМ	АП
Поли-НМ-1(га)	15.4	100	1.3	3.6	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
Жел-РС × 100(пи)	2.9	100	36.2	74.1	0.1	0.2	0.3	0.4	<0.07	<0.07
Жел-НМ × 5(га)	0.3	100	0.4	0.2	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02

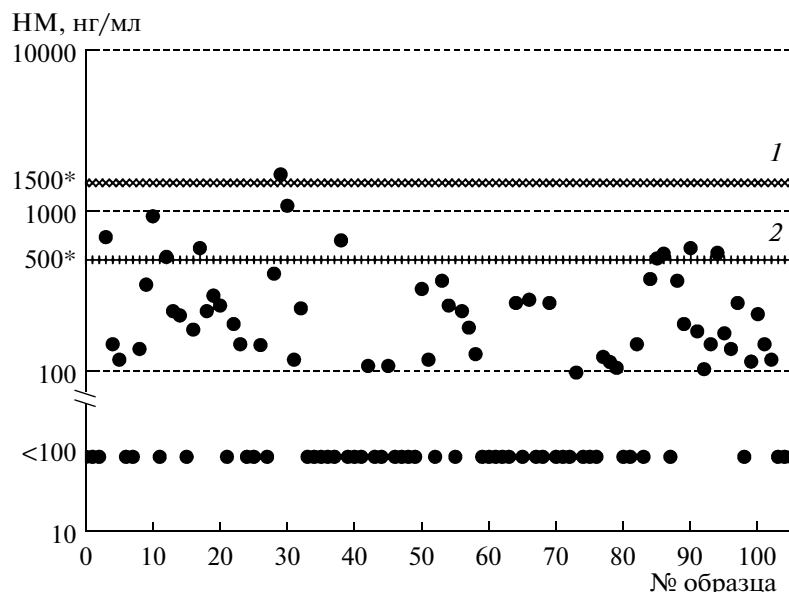


Рис. 3. Содержание НМ в образцах молока по результатам ИФА: 1 – МДУ НМ в молоке, регламентированный в странах ЕС (1500 мкг/кг); 2 – МДУ НМ в молоке, рекомендованный экспертами ФАО/ВОЗ (500 мкг/кг).

изменений. Следовательно, деградации антибиотика в ходе обработки сырого молока не происходило, и проведение иммунохимического определения НМ в молоке осуществимо как до, так и после термообработки.

Значительная выборка образцов ($n = 106$), которая представлена самым разнообразным молоком как по степени содержания жира, термической обработке и другим пищевым критериям, так и по срокам и месту производства, явилась полноценным реальным объектом для оценки актуальности создания теста и проверки его аналитических характеристик. Использование анализа позволило обнаружить НМ более чем в половине образцов (57/106) в концентрациях выше 100 нг/мл (рис. 3). При этом уровень контаминации НМ за исключением единственной пробы (1690 нг/мл) был ниже МДУ, установленного для стран ЕС (1500 мкг/кг). Однако, превышение рекомендуемого ВОЗ порога (500 мкг/кг) [3] отмечалось в 10% случаев (11/106). Немаловажным преимуществом разработанного теста является возможность анализировать подпороговое содержание препарата. Так, в 46 пробах из общей выборки уровень НМ (100–500 нг/мл) оказался ниже чувствительности микробиологического теста.

Таким образом, на основе антител, специфичных к НМ, и ряда антигенов, адсорбированных на полистироловых планшетах, были разработаны иммуноферментные тест-системы для количественного определения антибиотика. Благодаря значительному запасу чувствительности и пределу детекции (до 0.01 нг/мл), сравнимому и даже пре-

восходящему некоторые описанные разработки [4–6] и коммерческие тест-системы [7; www.biokit.com], без специальной пробоподготовки при 100-кратном разведении молока максимально допустимый уровень НМ мог выявляться даже в наименее чувствительном варианте. Исследование контаминации молока этим аминогликозидом с помощью разработанного теста позволило получить первые результаты, которые требуют обратить более пристальное внимание к этой проблеме и могут служить ориентиром для рассмотрения вопроса о введении регламентации НМ в РФ, а предложенный анализ – инструментом для проведения подобных измерений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалёв В.Ф., Волков И.Б., Виолин Б.В. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии. М.: Агропромиздат, 1988. 223 с.
2. Council Regulation (EEC) No. 2377/90 // Official J. European Union 1990. L 224. P. 26–27.
3. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. М.: ФГУП “Интер СЭН”, 2002. 168 с.
4. Chen Y., Shang Y., Wu X., Qi Y., Xiao X. // Food Agric. Immunol. 2007. V. 18. № 2. P. 117–128.
5. Jin Y., Jang J.W., Lee M.H., Han C.H. // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 364. № 1–2. P. 260–266.
6. Loomans E.M.G., van Wiltenburg J., Koets M., van Amerongen A. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 3. P. 587–593.
7. Diana F., Paleologo M., Persic L. // Food Addit. Contam. 2007. V. 24. № 12. P. 1345–1352.

Development and Application of Indirect Competitive Enzyme Immunoassay for Detection of Neomycin in Milk

M. A. Burkin and I. A. Gal'vidis

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 105064 Russia
e-mail: burma68@yandex.ru

Received February 9, 2010

Abstract—As a result of immunization of rabbits with neomycin B (NM) conjugated to periodate-oxidized transferrin, polyclonal antibodies were generated and used to develop an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of NM. Several heterologous conjugates, namely, glutaraldehyde (GA)-polymerized NM, gelatin–ribostamycin (sp), and gelatin–NM (ga) were used as coating antigens in different ELISA variants for quantification of NM in milk. These variants were characterized by different dynamic ranges and detection limits of 1.0, 0.1, and 0.01 ng/ml, respectively. Maximum residue level (MRL) of this antibiotic in milk accepted in the EU can be detected without any special pretreatment at a 100-fold sample dilution in the least sensitive assay variant. The mean recovery rate from NM-spiked milk containing 1.5–10% fat was 111.7% and ranged from 84 to 125.2%. We found that 57 of 106 tested milk samples contained NM at concentrations higher than 100 ng/ml. In ten percent of cases (11/106), the residual level of this antibiotic was greater than 500 ng/ml. In one case, the MRL was exceeded (1690 ng/ml). The assay developed in this study is specific shows no cross-reactivity with other veterinary aminoglycosides, has a good sensitivity reserve, and can serve as an effective tool to monitor the NM content in milk stuff.

Ю.А. ТРОЦЕНКО, Н.В. ДОРОНИНА, М.Л. ТОРГОНСКАЯ
“АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ”.
ПУЩИНО: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.

В рецензируемой книге, состоящей из 7 глав, заключения, приложения и списка литературы (839 ссылок), впервые проанализированы и обобщены новейшие сведения об особенностях биологии аэробных метилотрофных бактерий (метилобактерий), использующих широкий спектр окисленных и замещенных производных метана в качестве источников энергии и углерода.

Краткое введение в проблему метилотрофии — специализированного типа питания микроорганизмов, и исторический очерк, в котором рассмотрены основные этапы развития представлений о таксономии, экофизиологии, жизненно важной биосферной роли аэробных метилобактерий, их уникальной метаболической и генетической организации, проанализированы гипотезы, объясняющие причины облигатной зависимости от C_1 -соединений.

Далее суммированы современные данные о повсеместном распространении, таксономическом и физиолого-биохимическом многообразии аэробных метилобактерий, использующих в качестве источников углерода и энергии метанол, метилированные амины, галометаны и метилсернистые соединения, а также метилацетат и метил-третбутиловый эфир. Детально рассмотрены множественные пути первичного окисления этих субстратов и ключевые гены/ферменты, ответственные за соответствующие реакции.

Специальный раздел посвящен описанию биоразнообразия и основных свойств экстремофильных/толерантных аэробных метилобактерий, проанализированы основные механизмы адаптации и выживания гало(алкало)фильных метилобактерий в условиях высокой солености — биосинтез и аккумуляция осмопротекторов (эктоина, глутамата, сахарозы), в том числе генетические и регуляторные аспекты синтеза доминирующего осмопротектора — эктоина.

В отдельной главе рассмотрены физиолого-биохимические особенности и роль аэробных метилобактерий в качестве фитосимбионтов, их распространение, способность стимулировать рост и развитие растений, механизмы взаимодействия с растениями и адаптации к мультистрессовым условиям эпифитного роста.

Авторами впервые суммированы и проанализированы данные генопротеомных исследований аэробных метилобактерий, отмечены эволюционные связи различных метилотрофов между собой и с другими группами микроорганизмов, а также возможность предсказания способности бактерий к метилотрофии на основе наличия в геномах полного набора генетических детерминант метилотрофных модулей.

В монографии отражено современное состояние и перспективы реализации уникального метаболического потенциала аэробных метилобактерий в различных сферах биотехнологии для получения биополимеров, ферментов, биопротекторов (эктоин), деградации различных токсичных одно- и полиуглеродных соединений, биоремедиации загрязненных экосистем.

В заключении подведены основные итоги проведенных в последние десятилетия работ, особо выделены достижения, которые привели к лучшему пониманию экологии, метаболизма, генетики и филогении аэробных метилобактерий, а также намечены ключевые направления будущих исследований.

В приложении кратко описаны современные подходы, используемые при изучении аэробных метилобактерий в природных экотопах, включая классические микробиологические, биохимические и новейшие молекулярные методы детекции и идентификации, основные праймерные системы и зонды, дана оценка их специфичности. Приведены диагнозы известных и новых валидированных родов аэробных метилобактерий.

Книга написана и оформлена на высоком профессиональном уровне, хорошо иллюстрирована наглядными цветными схемами, что облегчает понимание достаточно сложных аспектов метаболической и генетической организации аэробных метилобактерий. Монография адресована специалистам, преподавателям вузов, аспирантам и студентам, изучающим фундаментальные и прикладные аспекты метилотрофии, а также представляет безусловный интерес для широкого круга читателей.

В.И. Тишков

РЕЦЕНЗИИ

Ю.Е. КОЛУПАЕВ, Ю.В. КАРПЕЦ “ФОРМИРОВАНИЕ АДАПТИВНЫХ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ НА ДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОРОВ”. КИЕВ: “ОСНОВА”, 2010. 352 с.

Авторы д.б.н. Ю.Е. Колупаев и к.б.н. Ю.В. Карпец (Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Украина) посвятили монографию важнейшей проблеме современной биологии – изучению реакций организмов на действие стрессовых факторов, связанных с адаптацией растений к экстремальным условиям среды. Следует отметить, что фундаментальность исследований по данной проблеме тесно связана с прикладными аспектами – растениеводством, селекцией, биотехнологией и др. С общебиологических позиций рецензируемая монография обобщает научные достижения по проблеме за последнее десятилетие и развивает аспекты исследований по концепции стресса и адаптационного синдрома и сигнальных систем применительно к растительным организмам. Достоинством книги является не только критическое рассмотрение авторами данных литературы, но и изложение собственных многолетних исследований по проблеме и их интерпретация на основе последних достижений в этой научной области.

Книга включает введение, заключение и 5 глав. Каждая глава имеет разделы и подразделы, что существенно облегчает понимание и логику излагаемого материала. Во Введении авторы подчеркивают важность проблемы адаптации (устойчивость) растений в сельскохозяйственном и природно-экологическом аспектах. Отмечается, что познание адаптационных механизмов у растений в последние годы стимулировалось изучением сигнальных систем и молекул, связанных с трансдукцией стрессовых сигналов, идентификацией генов и белков. Однако до сих пор не ясно, какие защитные реакции “запускаются” теми или иными сигнальными молекулами.

По мнению авторов, “в настоящей монографии предпринята попытка описать картину восприятия растением абиотических стрессоров, трансдукции внешних сигналов и формирования адаптивных реакций”. С этой целью авторы монографии, на наш взгляд, успешно справились. Однако столкнулись со сложностью обобщения не всегда сопоставимых результатов, обусловленной разными подходами, применяемыми методами и часто их несовершенством.

В главе 1 монографии рассматривается понятие стресс по Г. Селье (G. Selye) и отмечается, что

определение стресса у растений по сути не отличается от известной “триады” Г. Селье, который выделял при стрессе у животных организмов 3 фазы: тревоги, адаптации и истощения. Анализируя роль стрессовых реакций в адаптации растений, авторы приходят к выводу, что физиологическая роль стресса, по-видимому, заключается прежде всего в активации и функционировании сигнальных систем и многие метаболиты, возникающие при стрессе, являются посредниками в цепи обеспечения передачи сигнала в геном, вызывающего переход организма на новый уровень организации метаболизма в изменившихся условиях среды обитания.

Глава 2 посвящена обзору данных о рецепторной способности растения к абиотическому воздействию. Этот вопрос в настоящее время является наиболее сложным и мало понятным. Авторы правы, считая, что значительная роль в этом может принадлежать плазматической мембране и клеточной стенке. Однако при многообразии комплексов и соединений, которые могут претендовать на роль сенсоров, однозначных доказательств еще не получено. Большое внимание уделено анализу роли G-белков, участие которых в передаче сигналов хорошо изучено на животных объектах. Авторы отмечают, что за последние 10–15 лет получен большой научный материал о функционировании G-белков в растительных клетках и сейчас не вызывает сомнения участие этих белков в формировании реакций растений на действие патогенов, их элиситоров, а также на ряд абиотических факторов. В целом же вопрос о роли этих белков в функционировании сигнальных систем и в трансдукции сигналов в геном остается открытым.

Глава 3 “Посредники передачи стрессовых сигналов в геном” обобщает данные о молекулах–посредниках передачи стрессовых сигналов в геном. Авторы отмечают, что “запуск” систем трансдукции сигналов после восприятия сенсором (рецептором) внешнего “раздражителя” происходит с участием G-белков и протеинкиназ. Каскад реакций вызывает образование новых посредников и активацию факторов транскрипции. В результате этого экспрессируются соответствующие гены и синтез защитных веществ. Авторы отмечают, что универсальными участниками пе-

редачи сигналов в настоящее время признаны ионы Ca^{2+} и активные формы кислорода (АФК), а также оксид азота (NO), циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), салициловая и жасмоновая кислоты. Наиболее изученным в этом аспекте являются ионы Ca^{2+} . В монографии подробно проанализированы литературные данные о Ca^{2+} как универсальном внутриклеточном переносчике сигналов, Ca^{2+} -сигнальной системе, о кальциевых каналах и их регуляции, о Ca^{2+} -связывающих белках и регуляции концентрации Ca^{2+} в цитозоле клетки, об изменении кальциевого баланса в растительных клетках при стрессовых воздействиях. На основе собственных данных рассматривается роль Ca^{2+} в регуляции содержания АФК в растительной клетке и делается заключение, что Ca^{2+} и АФК являются ключевыми компонентами единой сигнальной системы, взаимно усиливающие свое действие. Подчеркивается, что ионы Ca^{2+} участвуют в регуляции про-антиоксидантного равновесия в клетке, вызывая активацию образования АФК и усиление активности антиоксидантных ферментов. Рассмотрена зависимость баланса Ca^{2+} в клетке от посредников различных сигнальных систем, которые могут изменять активность Ca^{2+} -каналов или быть Ca^{2+} -ионофорами. Это продукты превращений липоксигеназной, аденилатциклазной, NO-синтазной, НАДФН-оксидазной сигнальных систем.

В следующем разделе этой главы обобщены данные о роли АФК как компонентов окислительного стресса у растений и сигнальных молекул: образование и утилизация, баланс между их деструктивным действием и сигнальными функциями, природа возможных сенсоров АФК, участие их в адаптации растительного организма к экстремальным условиям. Авторы делают вывод, что АФК не только сигнальные посредники, но и возможные факторы регуляции экспрессии генов при ответе растения на абиотическое воздействие за счет модификации факторов регуляции транскрипции и протеинкиназ. Особую роль при этом может выполнять H_2O_2 , как наиболее стабильная молекула из ряда АФК.

Другим высокоактивным стрессовым метаболитом, сочетающим в себе свойства сигнального посредника и фитогормона, является салициловая кислота (СК) — полифункциональная сигнально-регуляторная молекула, индуцирующая системную приобретенную устойчивость у растений. Подчеркивается, что активность СК связана с накоплением АФК и подавляется антиоксидантами. Рассмотрены пути синтеза СК, изменение ее содержания в клетке и возможные механизмы повышения устойчивости растений с участием СК. Большой материал получен авторами по изучению СК в собственных экспериментах. Подтверждено взаимовлияние СК и АФК и в то же

время зависимость их сигнальных функций от Ca^{2+} .

Подробно анализируются данные о роли NO в трансдукции сигналов в растительных клетках при действии стрессоров. Рассмотрены еще не совсем ясные в настоящее время пути синтеза NO в растениях, данные о NO как сигнальной молекуле и участие ее в формировании устойчивости растений. По данным авторов, экзогенный оксид азота активировал защитные реакции в клетках колеоптилей пшеницы. Однако этот эффект нивелировался антагонистами Ca^{2+} и кальмодулина. Последнее говорит об участии АФК и Ca^{2+} в эффектах NO.

Следующий раздел главы посвящен жасмоновой кислоте (ЖК) — основному компоненту липоксигеназной сигнальной системы. ЖК и ее производные участвуют в регуляции многих физиологических процессов у растений, в т.ч. и в защитных реакциях. Широкий спектр сигнально-регуляторных функций жасмонатов позволяет отнести их к естественным регуляторам роста и развития растений. Авторами детально рассмотрены функции ЖК: пути ее биосинтеза в растениях, трансдукция сигнала ЖК в геном, физиологические эффекты ЖК при действии абиотических стрессоров. Основным выводом авторов состоит в том, что жасмонаты задействованы в активации целого комплекса защитных реакций растений. Однако не понятна специфичность этих соединений, поскольку их действие сопровождается увеличением содержания в клетках других сигнальных посредников: АФК, Ca^{2+} , NO. Наименее исследованной у растений является аденилатциклазная сигнальная система, хотя значение ее в иницировании защитных реакций у растений, по-видимому, весьма существенно (Ломоватская и др., 2010). Основная роль в этой системе принадлежит цАМФ, образующегося в результате активации фермента аденилатциклазы. Авторы анализируют данные о присутствии у растений этой молекулы, осуществляющей преобразование и трансдукцию внешнего сигнала в геном клетки, обеспечивая своевременный ответ растения на стрессовые воздействия.

Глава 3 заканчивается анализом литературных данных о сигнальных посредниках, которые участвуют в реализации действия фитогормона — абсцизовой кислоты (АБК). Подчеркивается, что стрессоры самой различной природы ведут к накоплению АБК. Одним из основных эффектов действия АБК на растительные клетки является угнетение синтеза большинства конститутивных белков и синтез стрессовых белков. Авторы приводят схему связи между работой сигнальных и гормональных систем при стрессах и делают вывод, что сигнальные системы участвуют в передаче в геном клетки как первичного (стрессового) сигнала, так и вторичного (гормонального).

Глава 4 посвящена протеинкиназам, протеинфосфатазам и факторам регуляции транскрипции (ФРТ) и их роли в процессах формирования адаптивных реакций. Протеинкиназы и протеинфосфатазы под влиянием сигнальных посредников изменяют свою активность и усиливают фосфорилирование или дефосфорилирование различных белков, в т.ч. ФРТ. В настоящее время получены сведения об участии протеинкиназ практически на всех этапах восприятия клетками растений стрессовых сигналов и передаче их в ядерный геном. Подчеркивается, что ФРТ играют фундаментальную роль в биологических процессах, в т.ч. и в реализации стрессовых ответов. Авторы констатируют, что фосфорилирование ФРТ с помощью протеинкиназ ведет к активации этих белков и взаимодействию с ДНК-зависимыми РНК-полимеразами и промоторными участками генов. Приводятся сведения о ряде ФРТ, задействованных при ответе на абиотические воздействия и выявленных у арабидопсиса и др. видов растений. Авторы констатируют, что механизмы активации ФРТ с помощью сигнальных посредников во многом остаются не ясными; также недостаточно изучены конкретные реакции, регулируемые с помощью ФРТ.

Рассмотрению адаптивных реакций и обсуждению классической схемы стресса по Г. Селье применительно к растениям посвящена глава 5. Следует, по-видимому, согласиться с мнением авторов о том, что стресс-реакция необходима для оперативной защиты растения от гибели при действии стрессового фактора и “запуску” механизмов передачи в геном сигнала(ов) о неблагоприятном воздействии. После этого растением формируется физиолого-биохимический адаптивный ответ и как следствие повышение устойчивости растения на различных уровнях организации: клеточном, органном, организменном и др. Приводятся эффекты индукции различными сигналами универсальных защитных реакций растений: антиоксидантной системы, синтеза низкомолекулярных протекторных веществ и стрессовых белков. Подробно рассмотрены реакции, которые участвуют в детоксикации АФК и др. высокореакционных молекул. Особое внимание уделено ферментам супероксиддисмутазе (СОД) и каталазе. Отмечается противоречивость данных о влиянии АФК и др. активных молекул на антиоксидантную систему: с одной стороны, умеренные стрессовые воздействия различной природы, вызывая накопление АФК, ведут и к активации антиоксидантных систем, а с другой – экзогенные АФК (H_2O_2) ингибируют антиоксидантные ферменты у растений. Авторы считают, что окислительный стресс у растений при действии H_2O_2 является сигналом для активации генов антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза). Однако, увеличение активности СОД может нивелироваться антагонистами Ca^{2+} .

Доказано, что ионы Ca^{2+} прямо или опосредованно активируют АФК-генерирующие ферменты и вызывают повышение активности антиоксидантных ферментов. Кратковременное воздействие гипертермии приводило не только к повышению активности СОД, каталазы и пероксидазы, но и к увеличению термостабильности этих ферментов у проростков пшеницы. В активации антиоксидантной системы могут принимать участие ЖК и СК. Но не ясно, каким образом осуществляется их участие – через АФК или другими путями.

В разделе о защитной роли низкомолекулярных соединений, образующихся в клетках растений при стрессах, анализируются данные о растворимых углеводах и разнообразных азотсодержащих соединениях (свободные аминокислоты, пептиды, полиамины, бетаины). Эти соединения могут накапливаться в клетках растений как за счет индуцированного стрессом синтеза, так и при гидролизе соответствующих биополимеров и могут выполнять при стрессах различные функции: антиоксидантную, антиденатурационную, мембранопротекторную, сигнально-регуляторную. Накопление указанных соединений в клетках является следствием перехода организма на новый уровень обменных процессов, происходящего в результате активации стрессорами сигнальных систем. С другой стороны, эти соединения могут сами выступать в роли сигналов, оказывающих влияние на экспрессию генов.

В последнем разделе главы 5 приводятся данные о синтезе растениями основных групп стрессовых белков (СБ) и участии внутриклеточных соединений в экспрессии их синтеза. Отмечается, что одни и те же СБ могут накапливаться при разных видах стрессового воздействия. По мнению авторов, неспецифичность действия неблагоприятных факторов на синтез СБ может объясняться, в частности, участием одних и тех же сигнальных посредников, вызывающих изменения в экспрессии соответствующих генов. Внешние стрессовые воздействия могут быть стимулами для синтеза СБ. В качестве посредников в этом процессе участвуют ионы Ca^{2+} и АФК. Однако сведений об индукции с помощью АФК, Ca^{2+} , а также NO, СК, ЖК синтеза СБ при действии на растения абиотических стрессоров явно недостаточно для однозначных выводов.

В Заключении авторы констатируют, что адекватный ответ растения на стрессовое воздействие определяется, в первую очередь, восприятием сенсором этого действия и последующей передаче полученного сигнала в геном с участием сигнальных систем. Однако проблема состоит в специфичности или неспецифичности сенсоров. Современные данные позволяют предположить, что внешние “раздражители” воспринимаются комплексом малоспецифических сенсоров (различ-

ные сенсорные киназы, Ca^{2+} -каналы и окислительные комплексы). Авторы отмечают множественность путей передачи стрессовых сигналов, сравнивая функционирование сигнальной системы с паутиной, в которой импульс механического раздражения передается к центру не только по радиальным нитям (аналог отдельных сигнальных систем), но и по связывающим их поперечным нитям (аналог сигнальных посредников). Представление о “сигнальной паутине” хорошо согласуется с неспецифичностью многих реакций, эффектами перекрестной устойчивости и полифункциональности ответов растения на стрессовые воздействия. Авторы подчеркивают, что более ранние (стрессовые) и более поздние (адаптационные) реакции, возможно, формируются с участием различных сигналов и систем их передачи, в т.ч. и гормональной. Однако вопросы взаимоотношений между стрессовыми реакциями и процессами долговременной адаптации остаются еще малоизученными.

В целом, следует отметить своевременность обобщения данных по проблеме сигналинга и адаптивных реакций растений на русском языке. Несом-

ненным достоинством книги является широта рассматриваемых вопросов, большой список цитируемой литературы (842 источника) и иллюстрация излагаемого материала многочисленными схемами как собственными, так и заимствованными из литературных источников. Хотя заглавие книги подразумевает рассмотрение действия на растение только “абиотических стрессоров”, спектр рассматриваемых стрессовых факторов не ограничивается этим. Из упущений авторов при написании книги, на наш взгляд, следует отметить следующие. Была бы уместна обобщающая гипотетическая схема, объясняющая участие рассмотренных сигнальных систем и молекул в формировании адаптивных реакций растений. Может быть в заглавие книги следовало бы добавить: “Сигнальные молекулы и формирование...”. Прикладное значение научных исследований по проблеме было бы показано лучше, если в монографии была бы глава: “Адаптивные реакции и продуктивность растений”.

Книга будет интересна широкому кругу специалистов соответствующего профиля.

А. К. Глянько