

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	СТИМУЛИРУЮЩИЕ РОСТ РАСТЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ ЗАЩИТЫ ОТ ПАТОГЕНОВ (ОБЗОР) Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Пусенкова Л.И.	373-385	15
<input type="checkbox"/>	АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ АРОМАТИЧЕСКОГО РЯДА Потапович М.В., Курченко В.П., Метелица Д.И., Шадыро О.И.	386-396	1
<input type="checkbox"/>	ИДЕНТИФИКАЦИЯ В ЛУКЕ РЕПЧАТОМ (ALLIUM SEPA L.) НОВОГО БИОРЕГУЛЯТОРА, ДЕЙСТВУЮЩЕГО В СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ Куликова О.Г., Ямскова В.П., Ильина А.П., Маргасюк Д.В., Молявка А.А., Ямсков И.А.	397-401	3
<input type="checkbox"/>	ФРАГМЕНТ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК-ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА И ТРИПСИНА В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ Парфёнов И.А., Ревина Т.А., Пашковский П.П., Радюкина Н.Л., Валуева Т.А.	402-407	0
<input type="checkbox"/>	OVER-EXPRESSION, PURIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CELOSIA CLPS AS A FUSED PROTEIN IN ESCHERICHIA COLI Gholizadeh A.	408-414	0
<input type="checkbox"/>	АНАЭРОБНЫЙ СИНТЕЗ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ ESCHERICHIA COLI С АКТИВИРОВАННЫМ НАД <sup>+</sup> -ВОССТАНАВЛИВАЮЩИМ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНЫМ КОМПЛЕКСОМ Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Моржакова А.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г.	415-423	1
<input type="checkbox"/>	HETEROGENOUS EXPRESSION OF POLY- $\gamma$ -GLUTAMIC ACID SYNTHETASE COMPLEX GENE OF BACILLUS LICHENIFORMIS WBL-3 Wang N., Yang G., Che C., Liu Y.	424-428	0
<input type="checkbox"/>	ТРАНСФОРМАЦИЯ $\Delta^4$ -3-КЕТОСТЕРОИДОВ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ АКТИНОБАКТЕРИИ RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS Карпова Н.В., Андрюшина В.А., Ядерец В.В., Дружинина А.В., Стыценко Т.С., Шаскольский Б.Л., Лозинский В.И., Лью Дук Хи, Войшвилло Н.Е.	429-435	1
<input type="checkbox"/>	МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS ЭК-1 НА ГЕКСАДЕКАНЕ Пирог Т.П., Игнатенко С.В.	436-442	1
<input type="checkbox"/>	ХЕМИЛЮМИНОСЦЕНЦИЯ ЭКСТРАКТОВ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ACINETOBACTER CALCOACETICUS И ИХ ДЕЙСТВИЕ НА PSOXS-LUX БИОСЕНСОР Сазыкин И.С., Прокофьев В.Н., Чистяков В.А., Сазыкина М.А., Внуков В.В.	443-447	3
<input type="checkbox"/>	ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТенок МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА Андриянова Д.А., Сергеева Я.Э., Кочкина Г.А., Галанина Л.А., Усов А.И., Феофилова Е.П.	448-454	3
<input type="checkbox"/>	AN EXTRACELLULAR GLUCOAMYLASE PRODUCED BY ENDOPHYTIC FUNGUS EF6 Tangngamsakul P., Karnchanatat A., Sihanonth P., Sangvanich P.	455-461	0
<input type="checkbox"/>	АНТИОКСИДАНТНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ LAETIPORUS SULPHUREUS (BULL.: FR.) MURR Оленников Д.Н., Танхаева Л.М., Агафонова С.В.	462-468	2
<input type="checkbox"/>	ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРИБОВ РОДА PENICILLIUM ПРОДУЦЕНТОВ ЭРГОАЛКАЛОИДОВ И ХИНОЦИТРИНИНОВ Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Зеленкова Н.Ф.	469-473	1
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ POLYSCIAS FILICIFOLIA ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ТЕМПЕРАТУР Кириллова Н.В., Белых Ю.В., Спасенков А.И.	474-478	0
<input type="checkbox"/>	ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОТОНТРАНСЛОЦИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ Ладыженская Э.П., Кораблёва Н.П.	479-483	1
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ МЕЛАФЕНА НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АППАРАТ КЛЕТОК АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПРИ РЕГУЛЯЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ Платонова Т.А., Евсюнина А.С., Кораблёва Н.П.	484-489	0
<input type="checkbox"/>	ЭФИРНОЕ МАСЛО ОРЕГАНО КАК ИНГИБИТОР ОКИСЛЕНИЯ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ Теренина М.Б., Мишарина Т.А., Крикунова Н.И., Алинкина Е.С., Фаткулина Л.Д., Воробьёва А.К.	490-494	3



*ПОЗДРАВЛЯЕМ ЮБИЛЯРА. ЮРИЮ АЛЕКСАНДРОВИЧУ ТРОЦЕНКО 70 ЛЕТ*

*495-496*

*0*

УДК 579.64:57.017.3:57.047:632.93

## СТИМУЛИРУЮЩИЕ РОСТ РАСТЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК АЛЬТЕРНАТИВА ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ ЗАЩИТЫ ОТ ПАТОГЕНОВ (ОБЗОР)

© 2011 г. И. В. Максимов\*, Р. Р. Абизгильдина\*, Л. И. Пусенкова\*\*

\*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054  
e-mail: phyto@anrb.ru

\*\*Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН, Уфа, 450059

Поступила в редакцию 30.06.2010 г.

В обзоре анализируются данные о физиолого-биохимических особенностях воздействия ризосферных и эндофитных микроорганизмов, стимулирующих рост растений (СРРМ, PGPR – plant growth promoting rhizobacteria), на механизмы индуцированной устойчивости растений и возможность использования этого явления в растениеводстве для защиты сельскохозяйственных культур от патогенов и фитофагов. Придаваемая СРРМ устойчивость растений, обусловленная их эндосимбиотическими взаимоотношениями, осуществляется непосредственно через продукцию ими пептидов-антибиотиков, гидролаз хитина и глюкана, клеточных стенок патогена, а также через формирование у растений собственной системной индуцированной устойчивости, сопровождающейся изменениями в балансе защитных белков, фитогормонов и про-/антиоксидантного статуса.

Во всех системах земледелия важнейшим условием получения высоких урожаев является защита посевов от вредителей и болезней, включающая организационно-хозяйственные, селекционные и агротехнические мероприятия, использование химических средств защиты (ХСЗР) и биопрепаратов. Главное место среди них принадлежит ХСЗР, прошедшим сложный путь использования от чисто эмпирических приемов до научно обоснованных комплексных мероприятий, таких, как протравливание семян и опрыскивание посевов [1].

Современные препараты для защиты растений от вредных организмов можно условно разделить на 3 группы. Первая – это пестициды с явным биоцидным эффектом, уничтожающие целевые, вредные организмы. Эффективность их применения достаточно высока. Однако они уничтожают и полезные в агроценозе виды, что является их основным минусом, имеют слабую степень утилизации в природных сообществах, накапливаются в продуктах питания и характеризуются высокой канцерогенностью. Согласно данным ФАО-ВОЗ, остатки пестицидов обнаруживаются почти в 40% используемых в пищу продуктах. В связи с этим в растениеводстве стали внедряться фунгициды системного действия, менее токсичные и быстро утилизирующиеся в растениях. Однако их использование сопряжено с материальными затратами, поскольку они дороги, и у патогенов к ним со временем формируется резистентность. Это вынуждает искать для защиты растений все более новые ХСЗР.

Ко второй группе средств защиты растений следует отнести низкомолекулярные вещества, способные стимулировать иммунный потенциал растений. По одной из классификаций [2], они условно делятся на следующие типы: 1) повышающие устойчи-

вость клеточных стенок растений к атаке патогена за счет накопления в инфицированных тканях кремния или лигнина; 2) активирующие фенольный метаболизм; 3) индуцирующие синтез фитоалексинов; 4) приводящие к сенсibiliзации растений, то есть подготавливающие их к атаке патогена; 5) усиливающие чувствительность клеток гриба к внешним воздействиям, в том числе со стороны гидролаз растений. Согласно О.Л. Озерецковской и Н.И. Васюковой [3], индуцирование системной болезнестойчивости растений с помощью природных элиситоров обладает рядом преимуществ перед ХСЗР, такими, как низкая степень опасности для людей, окружающей среды и организмов, не являющихся мишенями действия препарата; способность повышать устойчивость у растений-хозяев, лишенных генов устойчивости, к болезнетворным агентам; способность индуцировать устойчивость растений на горизонтальном уровне, создавая их более длительную защиту, чем при применении фунгицидов, и требующее более низких концентраций специфичных для хозяина веществ; полифункциональность, то есть формирование неспецифической устойчивости растений к комплексу патогенов и фитофагов.

К третьей группе относятся препараты, действующим началом которых являются живые культуры микроорганизмов – бактерии и грибы [4–10]. Их защитное действие обусловлено способностью продуцировать: 1) антибиотические соединения пептидной и низкомолекулярной природы; 2) различные сидерофоры и хелаторы, способствующие усилению усвояемости растениями макро- и микроэлементов, в том числе кальция, железа или, напротив, изолирующие тяжелые металлы или токсические органи-

ческие вещества, в том числе вырабатываемые и патогенными микроорганизмами; 3) вещества, переводящие фосфор из нерастворимого состояния в растворимое, а также, усиливающие способность других азотфиксирующих бактерий трансформировать атмосферный азот; 4) ферменты, деградирующие клеточные стенки патогенов (хитиназы,  $\beta$ -1,3-глюканазы), а также их токсины; 5) регуляторы роста и различные сигнальные молекулы (ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота, салицилаты и жасмонаты); 6) ферменты, способствующие синтезу этилена в растениях и др.

Принцип действия препаратов второго и третьего классов отличается от классических ХСЗР, поскольку преследует цель регулирования численности вредных микроорганизмов, формирования конкурентных отношений с аборигенной патогенной микро- и микрофлорой, индуцирования природной системной устойчивости [4, 11]. Многие из известных современных биопрепаратов, в особенности на основе эндофитов, как правило, сочетают в себе все отмеченные выше свойства [2, 12]. В растениях под влиянием СРРМ, а также элиситоров включаются свои механизмы защитной системы, обозначенные как системная индуцированная устойчивость (СИУ) (induced systemic resistance – **ISR**) и системная приобретенная устойчивость (СПУ) (systemic acquired resistance – **SAR**) [7, 13–15].

Еще на заре развития биометода было показано, что бактерии-антагонисты стимулируют рост растений и могут одновременно защищать их от стрессов как биотической, так и абиотической природы [16]. Эти работы сейчас нашли продолжение в довольно обширном потоке исследований, в том числе и обзорных работах, посвященных СРРМ [5, 13, 17–22]. Теоретическим обоснованием их использования является значительный удельный вес в составе микрофлоры ризосферы растений, их антагонизм к широкому кругу патогенов, синтез физиологически активных веществ, определяющих полезность их действия, долговременная эффективность, сохраняющаяся и в поствегетационный период, малая целевая концентрация. Кроме этого, желательно, чтобы биопрепараты были нетребовательны к средам роста, генетически стабильны, способны выживать в неблагоприятных условиях, готовиться в формах, удобных для хранения и внесения, не продуцировать вторичных метаболитов, вредных для людей и животных, устойчивы к пестицидам и не патогенны для растений.

СРРМ условно можно разделить на 3 группы. Первая – свободноживущие почвенные микроорганизмы, при благоприятных условиях вступающие в определенные взаимодействия с растениями. Вторая – ризосферные и филосферные виды, локализованные в близлежащих к корням зонах почвы или поверхности эпидермиса листьев растений, существование которых без наличия хозяина затруднительно. Третья – бактерии, способные формировать прочные ассоциации с определенными тканями и органами растений, проникая в них по межклеточным (эндофиты). Многие представители последней

группы СРРМ не могут существовать долговременно вне живых тканей хозяина, что говорит о формировании ими тесных симбиотических взаимоотношений с растениями.

Экологичность биопрепаратов способствует их активному внедрению в технологию использования в сельскохозяйственной практике. С одной стороны, и производители, и потребители заинтересованы в получении экологически чистой продукции, что инициируется как самим населением, приобретающим продукты питания, так и стимулируется дотациями со стороны органов власти. Так, в странах ЕС с 2007 г. официальные власти предлагают значительно ограничить содержание химических препаратов в среде обитания человека и использовать интегрированную систему защиты растений, сочетающую в себе химические и биологические методы борьбы. Анализ общего рынка биопрепаратов показал, что в 2004 г. он составлял 588 миллионов долларов, из которых на долю Северной Америки приходилось 240–260 млн. долларов [23, 24]. После США второе место в мире по производству биопестицидов занимает Китай, где 200 заводов производят 77 зарегистрированных биопестицидов, применяющихся на более чем 30 млн. га. С 1986 г. мировое производство биопрепаратов увеличилось в среднем с 5 до 20% от общего объема производимых средств защиты растений и составила (%): Америка – около 43,5, Европа – 20,7, Азия – 12,2, Океания – 11,2, Африка – 3,9. Хотя на современном этапе биологические меры борьбы с патогенами и фитофагами на посевах сельскохозяйственных культур в России мало используются, по заключению экспертов, они уже к 2012 г. должны стать конкурентоспособными по сравнению с химическими пестицидами [24].

Из ризосферы растений, а также их тканей были выделены штаммы СРРМ, идентифицированные как ризобияльные (*Rhizobia*), диазотрофные (*Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azviobria*), бациллярные (*Bacillus*), псевдомонадные (*Pseudomonas*), актиномицетные (*Streptomyces*). Кроме них прочные ассоциации с растениями формируют микоризные и эндофитные виды грибов.

Одними из наиболее привлекательных объектов для промышленного (коммерческого) производства препаратов, в том числе активно используемых в сельскохозяйственной практике, являются штаммы бактерий рода *Bacillus* [19, 25]. Среди выделенных из тканей здоровых растений хлопчатника (Душанбе, Таджикистан) 76 штаммов спорообразующих бактерий преобладал *Bacillus subtilis* [26]. Замечено снижение степени колонизации корней хлопчатника грибами рода *Fusarium* и, соответственно, ослабление вилта при обработке эндофитными штаммами *B. subtilis*, выделенными из этой культуры [26]. На основе одного из штаммов *B. subtilis* 26Д создан препарат Фитоспорин (таблица), эффективный против плесневения и гнилей семян различных культур, черной ножки, фитофтороза, альтернариоза картофеля [27]. Из здоровых тканей пшеницы были выделены 3 штамма *Bacillus* spp. и несколько видов грибов [28]. Исследователями из КНР выделены 221 бакте-

риальных, 34 грибных и 5 актиноризных изолята из листьев и корнеплодов сахарной свеклы [29]. На основе австралийской линии А-13 бактерии *B. subtilis*, получена новая перспективная линия GB03, зарегистрированная в 1985 г. фирмой “Uniroyal Agricultural Chemical” (США), проявляющая высокий антагонизм на посевах хлопчатника и арахиса по отношению к *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporium* sp. *vasinfectum*. На основе другой линии GB07 этого же штамма бактерии создан препарат, эффективный против патогенов рода *Pythium* на хлопчатнике. Защитная эффективность бактерии *B. subtilis* FZB-24 на растениях спаржи и картофеля была высокой по отношению к патогенам *F. oxysporium* Schlecht, *Streptomyces scabies*, *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* [30]. Препарат Бациспектин (БМ) на основе *B. subtilis* 739 использовался для подавления развития корневых гнилей, аэрогенных инфекций (желтая, бурая и стеблевая ржавчины) на посевах пшеницы, где его эффективность действия не уступала химическим пестицидам [19]. Применение препарата Бактофит на основе *B. subtilis* ИПМ-215 снижало развитие корневых гнилей озимой пшеницы до 4 раз и поражение мучнистой росой – до 10 раз. Обнаружена стимуляция роста растений и антагонизм в отношении *Meloidogyne incognita* при их обработке бактериальными штаммами *B. cereus* S-18, *B. subtilis* VM-1-32 и *Pseudomonas* sp. W-34. При обработке семян пшеницы биосредствами снижалась зараженность возбудителями корневых гнилей на 20.9–51.2%, а возбудителями листовых болезней – на 24.3–63.5%. Величина сохраненного урожая доходила, например, у пшеницы, томатов, яблоны до 20–25%, кукурузы и картофеля – до 20%, ячменя, люцерны и хлопчатника – до 15%, капусты – до 10%, а биологическая эффективность – до 50.5–96.4% [20].

Важно, что среди выделенных штаммов обнаруживались суперпаразиты микроорганизмов, непосредственно ингибирующие рост патогенов или, наоборот, “помогающие” симбиозу [31–33].

**Синтез СРРМ антибиотиков.** Важной составляющей защитного эффекта СРРМ является их способность продуцировать антибиотики пептидной природы [34–36]. Это олигопептиды, ингибирующие синтез клеточных стенок патогенов, действующие на мембранные структуры клеток, ингибирующие образование комплекса иницирования на малой субъединице рибосом, пептиды, действующие на функцию рибосом. Например, из продуцируемых бактериями рода *Bacillus* 167 видов антибиотиков более 12 синтезируются штаммами *B. subtilis* [37]. К ним относятся бацилломицин, микобацилин, фунгистатин, итурин, фенгицин, плипастатин, сурфактин, бацилизин и др. [19]. Все исследованные штаммы *B. subtilis* вырабатывают свой индивидуальный набор антибиотиков, значительно отличающийся даже среди близкородственных штаммов одного вида. Это предполагает относительную эволюционную “молодость” определяющего антибиотик локуса, что доказывается, например, высокой степенью гомологии ДНК, кодирующего субланцин *B. subtilis* с

локусом профага SP $\beta$ , инфицирующим эти бактерии [38]. Идентичность геномного локуса кластеров для биосинтеза субтилина и эрицина в штаммах *B. subtilis* ATCC 6633 и A1/3 и взаимозаменяемость генов, кодирующих микосубтилилин и фенгицин, предполагает их происхождение от общего прародителя [36]. С использованием искусственного РНК-сайлинга показана важная роль итурина в антипатогенной активности бактерий *B. licheniformis*, связанной с нарушением стабильности грибной плазмалеммы [39, 40]. Обнаружено одновременное образование некоторыми штаммами *B. subtilis* двух и более антибиотиков, например S499 и RB14 сурфактина и итурина, синергически усиливающих действие друг друга [41]. Бактерии *B. licheniformis* продуцируют вещество лихенизин, отличающееся от сурфактина заменой L-глутаминовой кислоты в положении одного лактонового кольца на L-глутамин или L-аспарагиновую кислоту в положении 5 на L-аспарагин, но по иммунохимической реакции подобный ему.

Среди антибиотиков СРРМ выделяют посттрансляционно модифицирующиеся пептиды лантионин и метиллантионин, содержащие остаточные тиоловые связи [41а, 42]. Самозащита (иммунитет) бактерий против таких антибиотиков основана на АТФ-связывающем переносчике соответствующих белков (LanFEG), выносящих лантибиотики из цитоплазматического пространства во внеклеточное [36]. Продуцируемый штаммами *B. subtilis* пентациклический антибиотик субтилилин, содержащий 32 аминокислоты [36, 43, 44], структурно гомологичен низину (E234) *L. lactis* [45], имеет макроциклическую структуру с тремя межостаточными связями, объединенными как мосты между молекулами цистеина и аминокислотными  $\alpha$ -углеродами. Он эффективен против различных грамположительных бактерий, включая и потенциально патогенные для человека. Штамм *B. subtilis* A1/3 продуцирует эрицин, гомологичный субтилину [36]. Генный кластер, кодирующий предшественник этого антибиотика, содержит 2 структурных гена *eriA* и *eriS*.

Большинство антибиотиков *Bacillus* ssp. проявляют активность в отношении и грамположительных, и грамотрицательных бактерий (например, полимиксин, циркулин и колистин), патогенных грибов *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Botryosphaeria ribis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium maydis*, *Phomopsis gossypii*. Обнаружено образование вздутий на кончиках растущих гиф *Sclerotinia sclerotiorum* (возбудитель белой гнили) под действием антибиотических веществ *B. subtilis*, у почвенных патогенных грибов *Alternaria alternata*, *Drechlera oryzae* и *Fusarium roseum* под контролем *B. megaterium* и у возбудителя ржавчины злаков *Puccinia graminis* под влиянием *B. pumilis* [46]. Антибиотики *Streptomyces* ингибировали появление клубеньков *Bradyrhizobium japonicum* на корнях бобовых [47]. Устойчивые к антибиотикам ризобияльные бактерии в тех же условиях характеризовались более высокой активностью образования клубеньков.

Современные биопрепараты, на основе микроорганизмов и их производители [21, 27]

Микроорганизм, штамм	Препарат	Растение, болезнь, патоген	Компания-производитель
1	2	3	4
<i>Ampelomyces quisqualis</i> , M-10	AQ10	Мучнистая роса на яблонях, тыквенных, винограде, декоративных растениях, ягодах и томатах	“Ecogen” (Франция)
<i>Azospirillum</i> spp.	Biopromoter	Просо, семена масличной культуры, фрукты, овощи, сахарный тростник, банан	“Manidharma Biotech” (Индия)
<i>Bacillus pumilus</i> , GB34	YieldShield	Почвенные грибные патогены	“Gustafson” (США); “Bayer CropScience” (ЕЭС)
<i>B. subtilis</i> , FZB-24	FZB-24 li, TB, WG RhizoPlus	Картофель, овощи, декоративные растения, ягодные, луковичные, древесные. <i>F. oxysporium</i> , <i>Streptomyces scabies</i> , <i>Erwinia carotovora</i> csp. <i>atroseptica</i>	“AbiTer” (Германия)
<i>B. subtilis</i> , GB03	Kodiak	Рострегуляторы. <i>Rhizoctonia</i> и <i>Fusarium</i> spp.	“Gustafson” (США); “Bayer CropScience” (ЕЭС); “BioYield” <sup>®</sup>
<i>B. subtilis</i> , MBI 600	Subtilex	Рострегуляторы. <i>Rhizoctonia</i> и <i>Fusarium</i> spp.	“Becker Underwood” (США)
<i>B. subtilis</i> , QST716 <i>B. subtilis</i> , 26D	Serenade Фитоспорин-М	Томат, латук, шпинат Зерновые, овощные культуры, картофель; гнили, болезни листьев	“AgraQuest” (США) ООО НВП “БашИнком”, ГНУ БашНИИСХ РАСХН (Россия)
<i>B. subtilis</i> , ИПМ 215	Бактофит	Парша, мучнистая роса яблонь, огурцов	“ВНИИ производственных микроорганизмов» (Россия)
<i>B. subtilis</i> , 63-Z	Баксис	Картофель, свекла сахарная, огурцы томаты. Ризоктониоз, фитофтороз, корнед, фомоз, церкоспороз, мучнистая роса, корневые гнили, трахеомикозное увядание, бактериоз, пероноспороз	ООО “Иоформатек” (Россия)
<i>B. subtilis</i> , B-10 <i>B. subtilis</i> , M-22	Алирин-Б Гамаир,	Рассада цветочных культур, картофель, томаты, огурцы, капуста, смородина, земляника. Черная ножка, корневые гнили, увядание, корневые и прикорневые гнили, фитофтороз, мучнистая роса, серая гниль	ЗАО “Агробиотехнология”, ГНУ “Всероссийский НИИ защиты растений” (Россия)
<i>B. subtilis</i> , Ч-13	БисолбиСан,	Пшеница озимая и яровая. Фузариозная гельминто-спориозная корневые гнили, плесневение семян	ООО “БисолбиИнтер” (Россия)
<i>B. subtilis</i> , GB03 + <i>B. amyloloque-faciens</i> , IN937a	BioYield <sup>®</sup>	Овощные, картофель	“Gustafson” (США)
<i>B. subtilis</i> , GB03, + <i>B. licheniformis</i> и <i>B. megaterium</i>	Companion	Зерновые, картофель. <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> и <i>Phytophthora</i>	“Growth Products”
<i>B. licheniformis</i> , SB3086	EcoGuard	Зерновые, картофель. <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> и <i>Phytophthora</i>	“Novozyme” (Дания)
<i>B. nigrum</i> , 132	Бактрил, СП (900 г/кг, титр не менее 3 млрд. КОЕ/г)	Пшеница, ячмень. Плесневение семян, гельминтоспориозная корневая гниль, фузариозная корневая гниль, мучнистая роса, гельминтоспориоз листьев	ООО “Биоформатек” (Россия)
<i>Coniothyrium minitans</i>	Contans WG Intercept WG	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>S. minor</i>	“Biologischer Pflanzenschutz” (Германия)
<i>Delftia acidovorans</i>	BioBoost	Рапс	“Brett-Young Seeds Limited” (Канада)

Таблица. Окончание

Микроорганизм, штамм	Препарат	Растение, болезнь, патоген	Компания-производитель
1	2	3	4
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Bioact WG	Нематоды	“Prophyta Biologischer Pflanzenschutz” (Германия)
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Rotex	<i>Heterobasidium annosum</i>	“Biologischer Pflanzenschutz” (Германия)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Proradix	<i>Rhizoctonia solani</i>	“Sourcon Padena” (Германия)
<i>P. chlororaphis</i>	Cedomon	<i>Fusarium</i> sp., листовые пятнистости на ячмене и овсе	“BioAgri AB” (Швеция)
<i>P. auerofaciens RS1393</i>	Псевдобактерин-2	Корневые гнили огурцов и томатов, закрытый грунт	“Институт физиологии и биохимии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН” (Россия)
<i>P. auerofaciens H16</i>	Агат-25К	Зерновые, огурцы, томаты, сахарная свекла. Церкоспореллез, гельминтоспориозная и фузариозные корневые гнили, ржавчина бурая, септориоз	ТОО “Био БиЗ” (Россия)
<i>P. aureofaciens, ИБ51</i>	Елена	Пшеница озимая и яровая. Фузариозная и гельминто-спориозная корневые гнили, плесневение семян	ГУП “Опытный завод Академии наук Респ. Башкортостан” (Россия)
<i>P. aureofaciens, штаммы 7Г, 7Г2К, 17-2</i>	Бинорам	Пшеница, ячмень, картофель, капуста белокочанная. Фузариозная и корневые гнили, ризоктониоз, сосудистый и слизистый бактериозы	ООО “АЛСИКО-АГРОПРОМ” (Россия)
<i>P. fluorescens A506</i>	BlightBan	Устойчивость к <i>Erwinia amylovora</i> . Яблоня, косточковые, бобовые, и др.	“NuFarm” (Австралия)
<i>P. fluorescens AP-33</i>	Планриз	Зерновые культуры, картофель, лен-долгунец, огурцы, капуста. Корневые гнили, бурая ржавчина, септориоз, листовые пятнистости, антракноз, крапчатость, бактериоз, макроспориоз, фитофтороз, ризоктониоз	НПП “Агроген” НИИ генетики и цитологии АН Белоруссии (Беларусь)
<i>P. trivialis 3Re-27</i>	Salavida	Латук	“Sourcon Padena” (Германия)
<i>Serratia plymuthica HRO-C48</i>	RhizoStar	Ягодные культуры, рапс	“Prophyta Biologischer Pflanzenschutz” (Германия)
<i>Streptomyces griseoviridis K61</i>	Mycostop	<i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.	“Kemira Agro Oy” (Финляндия); <i>AgBio development</i>
<i>S. lavendulata</i> и <i>S. griseus</i>	Фитолавин-300	Томаты, капуста. Черная ножка, корневые гнили, бактериоз	НБЦ “Фармбиомед” (Россия)
<i>Trichoderma harzianum T22</i>	RootShield, T22, Planter box	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp.	“Bioworks” (США)
<i>T. harzianum, штамм 18 ВИЗР</i>	Глиокладин	Огурцы, томаты, цветочные растения. Корневые и прикорневые гнили	ЗАО “Агробiotехнология” (Россия)
<i>T. lignorum</i> (Tode) Harz.	Триходермин	Пшеница, ячмень, огурцы. Плесневение семян, гельминто-спориозная и фузариозная корневые гнили, темно-бурая гельминтоспориоз	ООО “Биофарматек” (Россия)
<i>Penicillium vermiculatum</i>	Вермикулен	Подсолнечник, виноград. Белая гниль, фомопсис, оидиум	ВНИИ масличных культур (Россия)

Обнаружено, что защитный эффект штамма PF-5 *P. fluorescens* связан с синтезом пиролнитрина и пиолотеорина, угнетающих рост грибов *R. solani* и *Phytophthora ultimum* [48]. Штамм 19 бактерии *P. fluorescens* — продуцент феназин-1-карбоновой кислоты использовали для защиты пшеницы от возбудителей корневой гнили *F. oxysporium* и *Graeciumannomyces graminis* var. *tritici* [20]. Важно, что мутанты *P. fluorescens*, неспособные синтезировать эту кислоту, теряли антифунгальные свойства. Охарактеризована генетическая система, контролирующая ее биосинтез у штамма *P. fluorescens* 2–79 [49].

Выработка алкалоидов эндозитными грибами *Acremonium coenophialum* у овсяницы тростниковой [50, 51] и возбудителя спорыньи *Claviceps purpurea* у пшеницы [52, 53] формирует практическую несъедобность растений для насекомых, а также животных. Причем усиление выработки эндозитом алкалоидов под влиянием жасмоновой кислоты повышало устойчивость растений овсяницы к насекомым [51]. Штамм *P. fluorescens* СНАО, эффективно подавляющий рост и развитие *Thielavopsis brassicola* на табаке, а также штамм *B. subtilis* B579 могут продуцировать цианистый водород [54].

Важным составляющим активного воздействия бактериальных антибиотиков является то, что они могут участвовать в регуляции защитных систем самого растения. Обнаружена способность сурфацина *B. subtilis* стимулировать СИУ через активацию таких компонентов, как липоксигеназы, липидпероксидазы, образование активных форм кислорода (АФК) [55, 56]. Сурфацин активировал в растениях табака фенилаланинаммиак-лиазу, подщелачивание среды, накопление  $H_2O_2$  [56].

**Синтез сидерофоров.** Много работ, связанных с изучением СРРМ, основывается на их способности, наряду с антибиотиками, вырабатывать вещества — сидерофоры, например, такие, как псевдобацин и пиовердин (желто-зеленый флуоресцирующий пигмент бактерий рода *Pseudomonas*), обладающие высокой антимикробной активностью и сродством к ионам трехвалентного железа [21, 57–59]. Это лишает патогены необходимого для их роста и развития элемента, снижая вероятность или масштабы заболевания растений [49]. Обнаружено, что пиовердин является одним из наиболее важных антимикробных соединений у *Pseudomonas putida*, и снижение их синтеза приводит к значительному падению антифунгальной активности препарата. Синтез сидерофоров индуцируется у бактерий низким уровнем ионов  $Fe^{3+}$  и в кислых почвах, где растворимость и доступность возрастает, подавляя их защитный эффект. Эффективность связывания железа в этих условиях можно повысить путем получения мутантных штаммов, способных к синтезу сидерофоров, не зависящему от концентрации железа в почвенном растворе [49].

На растениях риса показана роль псевдобацина *P. fluorescens* WCS374r в запуске СИУ и обнаружен явный антагонизм между путями трансдукции системной устойчивости псевдобацином и салицила-

тами, хотя сами салицилаты тоже являются эффективными сидерофорами [15]. Псевдобацин участвовал в индукции локального накопления  $H_2O_2$ , фенольных соединений и укрепления клеточной стенки растений риса в зоне инфицирования.

**Улучшение фосфорного и азотного питания растений.** Известно, что фосфор — один из важных и необходимых соединений для функционирования жизни на Земле. Однако не более 5% от общего его объема в природе находится в относительно доступном состоянии. Растения, используя эндозиты бактериального и грибного происхождения, решили проблему фосфорного голодания, растворяя недоступный фосфор фосфатазами и органическими кислотами [19, 59, 60]. Так, *B. subtilis* секретирует во внеклеточную среду фитазы, гидролизующие фитаты — соли гексафосфорного эфира инозитола. Де Верра с сотр. [61] показали, что эффективность растворения фосфатов под влиянием *P. fluorescens* СНАО зависит от способности бактерий продуцировать глюконовую кислоту. Обнаружен синергизм между интенсивностью метаболизма глюконовой кислоты в бактериях и их антагонистической активностью против патогенов.

Ризосферные свободноживущие СРРМ, например азоспириллы и некоторые псевдомонады, могут фиксировать азот [62]. Доля азотфиксирующих видов *B. azotfixans*, *B. coagulans*, *B. polymixa*, *B. macerans* может достигать до 18.8% от общего количества спорообразующих бактерий почвенного покрова [19]. Доказано, что ризобактерии *Pseudomonas* и *Bacillus* индуцируют фиксацию азота другими свободноживущими и ассоциативными диазотрофами родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium* и *Bradirhizobium*, что в большей степени проявляется в холодных климатических зонах [49].

**Синтез гидролитических ферментов.** В начале развития биометода было обнаружено, что некоторые бактерии, в особенности родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, подавляют рост и развитие мицелиальных грибов как *in vitro*, так и *in vivo*. Способность бактерий угнетать рост и развитие корневых гнилей и некрозов на листьях, вызываемых, например, *Helminthosporium teres* Sacc. [63] или *F. oxysporium* [59], сопровождалась лизисом грибного мицелия, что предполагает существование у бактерий и других факторов, помимо антибиотиков, подавляющих рост патогенных грибов на растениях. Так, установлена способность бактерий *Bacillus* выделять в культуральную среду хитиназы и глюканазы [19, 59, 64–66]. Полагают, что для биологической защиты культур от патогенов, в особенности содержащих в составе клеточной стенки хитин и глюканы, применение бактерий, продуцирующих хитиназы, представляется наиболее оптимальным подходом [19, 67–69].

С использованием двух видов СРРМ *Serratia marcescens* GPS 5 и *Pseudomonas aeruginosa* GSE 18, различающихся по хитиназной активности, показана возможность защиты растения от патогена *Phaeoisariopsis personata* [70]. Причем, если в контроле и



при бактериализации *P. aeruginosa* GSE 18, неспособной к синтезу хитиназ, защитный эффект обработки хитина значительно не проявлялся, то в варианте с обработкой растений *S. marcescens* GPS 5, секретирующей хитиназы, происходило многократное снижение степени развития патогена. Можно предположить, что во втором варианте гидролиз высокополимерного хитина штаммом *S. marcescens* GPS 5 происходил более активно. Соответственно, наблюдалась более интенсивная выработка под влиянием эндофита олигомеров хитина, дополнительно стимулирующих защитную реакцию у растений, в том числе и синтез хитиназ.

Основные характеристики бактериальных хитиназ и источники их получения обобщены в монографии А.И. Мелентьева [19]. Среди них наиболее полно охарактеризованы 6 изохириназ штамма *B. circulans* WL-12 [71]. Определена их изоэлектрическая точка, молекулярная масса, оптимум pH и температуры. Важное преимущество бактериальных хитиназ в том, что они, в отличие от растительных, в равной мере могут разрушать и хитозан.

**Синтез фитогормонов и сигнальных молекул.** Способность активно влиять на рост растений является уникальным свойством СРРМ. Как полагают, такое их действие связано с синтезом различных метаболитов гормональной и сигнальной природы, таких, как ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая, салициловая и жасмоновая кислоты [21, 59, 72–75]. Это стимулирует у растений формирование лучшей корневой системы, активирование метаболических функций клеток и, повышая коэффициент поглощения воды и питательных веществ с большей площади, повышает не только устойчивость растений к болезням, но и позволяет им ускоренно проходить наиболее чувствительные к патогенам стадии своего раннего развития [30]. Бактериальные мутанты со сниженным уровнем, например, ауксинов, не могли влиять на ростовые показатели растений [13, 59, 76, 77], что доказывало важность участия гормонов в ростиндуцирующей активности СРРМ. Использование нечувствительных к ауксину растений арабидопсиса доказало их важность в формировании ими ассоциаций с растениями. Отечественные исследователи создали геномодифицированные формы псевдомонад, синтезирующие ауксины, обладающие способностью стимулировать рост растений и высокой конкурентной активностью по отношению к другим ризосферным бактериям [78]. При идентификации цитокининов в культуральной среде, выделяемых бактериями штамма *B. subtilis* ИБ-22, обнаружено преобладание конъюгатов зеатинподобных гормонов с полисахаридами молекулярной массой 250 кДа [79]. Поскольку действующим началом препарата BioYield является смесь живых штаммов *B. subtilis* GB03 и *B. amyloliquefaciens* IN937 [80], можно предположить, что зависимое от фотопериодического освещения активирование роста также тесно связано с регуляцией бактериальными цитокининами стабильности хлоропластов.

Наличие гиббереллинов в культуральной жидкости *B. cereus* и *B. subtilis* установили еще в 1965 г. Кац-

нельсон и Коли [19]. С тех пор исследователями обнаружены штаммы бактерий рода *Bacillus*, способные к синтезу этого фитогормона [81, 82]. В условиях взаимодействия бактерий с растениями накопления бактериальных гиббереллинов пока не наблюдали.

Важно, что воздействие СРРМ на гормональный статус не ограничивается синтезом ими неких фитогормонов. Под влиянием как самих бактерий, так и вырабатываемых ими гормоноподобных соединений, происходит системный сдвиг эндогенного гормонального баланса растений [83]. Соответственно, СРР-микроорганизмы, синтезируя гормоны в высоких концентрациях, экзогенно способствуют регулированию процессов роста и развития растений, а также формируют у них устойчивость к ряду абиотических и биотических факторов внешней среды [74, 84].

Недавно обнаружено, что ряд микроорганизмов-сапротрофов, составляющих обычную микрофлору, способны синтезировать  $H_2O_2$  в бактерицидных концентрациях и посредством этого конкурировать с патогенной микрофлорой за питательные ресурсы. Правда, следует заметить, что  $H_2O_2$ -продуцирующая активность таких штаммов может быть обусловлена синтезом ими ряда оксидаз органических кислот, например оксалаксоксидаз [85].

СРРМ могут воздействовать на защитную систему растений посредством синтеза салициловой кислоты [15, 86, 87]. Это позволяет растению активировать в защитной системе некоторые гены, участвующие в СПУ, и таким образом СРРМ проявляют свою универсальность. Так, синтезирующие салициловую кислоту штаммы *P. fluorescens* ЧАО [88] и *P. aeruginosa* 7NSK2 [89] запускали реакцию СПУ табака, а в мутантных растениях NahG, характеризующихся способностью быстро деградировать ее, не проявляли такого эффекта [89]. Интересно, что штамм *P. aeruginosa* 7NSK2 сохранял подобную способность и на растениях риса, защищая их от *Magnaporthe oryzae* [15]. Однако использование штаммов *Pseudomonas*, гиперсинтезирующих салициловую кислоту, было не эффективным [90].

**Активация защитной системы растений.** Исследования по индуцированию фитоиммунитета под влиянием СРРМ являются важной составляющей для последующего обоснования эффективности их применения в сельскохозяйственной практике. В 1991 г. 3 исследовательские группы [91–93], независимо друг от друга, обнаружили, что устойчивость растений, вызываемая бактериями рода *Pseudomonas* к патогенам, является специфической и отличается от СПУ, вызываемой салициловой кислотой и элиситорами. Причем в некоторых растениях при совместном развитии и СПУ, и СИУ под влиянием бактерии часто наблюдают их взаимовлияние, что проявляется в низкой эффективности применяемого биопрепарата [5, 15].

Инокуляция эндофитами повышала устойчивость растений к различным заболеваниям [94–96] и абио-

тическим стрессовым факторам [9, 97–100]. На 15 видах растений доказана возможность развития СИУ под влиянием ризобактерий и описаны основные признаки проявления такой реакции, формирующейся на долговременный период против грибов, бактерий, вирусов, нематод и насекомых [13].

СРРМ дифференцированно повышали чувствительность генов (сенсibiliзировали), вовлеченных в СПУ или СИУ, при последующем инфицировании патогенами [13, 101–104]. В работах по отбору наиболее чувствительных к СРРМ генов обнаружили быстрое реагирование около 200 растительных генов, среди которых часть снижала, а часть (в соотношении 1 : 1) напротив, многократно повышала свою активность [103–105]. Причем экспрессия 70% генов под влиянием СРРМ была связана с СИУ, 13% зависима как от СИУ, так и СПУ, а 17% генов регулировались дифференцированно. Например, в формировании устойчивости растений перца к бактериальной гнили *Xantomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* под влиянием штамма *B. cereus* BS107 вовлекались гены защитных белков (PR – Pathogen Related), часть которых, например, PR-1 индуцируется салициловой кислотой, часть (PR-4, PR-10) – жасмоновой кислотой и этиленом, а часть –  $H_2O_2$  [103]. Обнаружен ключевой транскрипционный фактор MYC2, чувствительный к жасмоновой кислоте, включающийся в повышение чувствительности тканей против ряда патогенов и насекомых [105].

Штаммы *B. subtilis* GB03 и *B. amyloloquefaciens* IN937a, а также выделенный из тканей пшеницы штамм *Streptomyces* sp. EN28 индуцировали СИУ арабидопсиса против бактериального патогена *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* [13, 77, 101]. Штамм *B. subtilis* BEB-DN индуцировал в растениях томатов экспрессию генов, связанных с СИУ, и формировал устойчивость растений к насекомым [104]. Под влиянием штамма *P. fluorescens* WCS417г происходила активация генов СИУ и усиливалась устойчивость растений к *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, *X. campestris* pv. *armoraciae*, *E. car.* subsp. *caratovora*, *F. oxysporum* sp. *raphani*, *Alternaria brassicola*, *Botritis cinerea* и *Hyaloperonospora parasitica* [5]. Подобное развитие событий происходило в растениях арабидопсиса под влиянием эндофитного гриба *Penicillium simplicissimum* GP17-2 и его культурального фильтрата при формировании защитной реакции против патогенной бактерии *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 [106]. В то же время индукция устойчивости к оомицету *Hyaloperonospora parasitica* к двум аскомицетам *B. cinerea*, *A. brassicicola* и бактерий *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 под влиянием эндофитного гриба *P. chrysogenum* не зависела как от салициловой кислоты, так и жасмонат-этиленового сигнального пути [107]. Штаммы *P. fluorescens* СНАО и *P. aeruginosa* 7NSK2 индуцировали СИУ в растениях винограда к *B. cinerea*, иницируя механизмы окислительного взрыва и синтеза фитоалексинов [119]. В серии работ лаборатории Ван Луна (Utrecht, Нидерланды) с использованием мутантных по синтезу жасмоновой кислоты и этилена растений арабидопсиса было доказано, что фор-

мирование СИУ под влиянием СРРМ опосредовано этиленом [5, 13]. Причем, если в корнях этиленовый сигнал вызывал локальное развитие защитных реакций в зоне инфицирования, то в надземной части происходила системная сенсibiliзация генов СИУ [13]. В связи с отмеченными результатами интересны данные о способности некоторых штаммов *Bacillus* и *Pseudomonas* индуцировать синтез этилена за счет образования деаминазы АЦК (АСС) (1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) [5, 74, 109]. Этилен, являясь гормоном стресса, включается в индукцию СИУ совместно и последовательно с жасмоновой кислотой. Низкие концентрации бактериальных деаминаз АЦК могут способствовать активации роста корней растений [110]. Показано, что защитный ответ растений, индуцированный *P. fluorescens* WC417г и LSW17S, а также бактерий рода *Bacillus* ассоциирован с СИУ и не зависит от СПУ, что проявляется в отсутствие и даже ингибировании транскрипционной активности генов, сопряженных с ней [5, 111, 112]. Однако следует отметить, что один из важных транскрипционных факторов MYB72, индуцируемых бактериями *Pseudomonas* СИУ, характеризовался нечувствительностью к этилену. Для его эффективной работы при стимуляции жасмонатной сигнальной системы требовался кофактор, уровень которого регулировался этиленом [113].

Штамм *B. vallismortis* EXTN-1, обладающий высокой элиситорной активностью, на культуре огурца показал эффективность и экспрессировал гены PR-1 [114]. Ряд генов СПУ, наряду с генами СИУ, обнаруживался и в патогенной системе перец – *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* под влиянием *B. cereus* BS107 [103]. Устойчивость арабидопсиса к грибу *F. oxysporum* придавалась штаммами актиномицетов *Micromonospora* sp. EN43 и *Streptomyces* sp. EN27 через активацию генов СПУ [13]. Соответственно, СПУ, индуцируемая штаммом *Streptomyces* sp. EN27, была зависима от белка NPR1 (Nonexpresser of PR genes 1), тогда как под влиянием штамма *Micromonospora* sp. EN43 – независима. Путем изменения состава среды культивирования авторы показали, что на минимальной среде штамм *Micromonospora* sp. EN43 продуцирует соединения, индуцирующие СПУ, а на комплексной среде – СИУ. Причем индукция экспрессии защитных маркерных генов с участием этого штамма, происходила только в инфицированных растениях, что предполагает важную роль СРРМ в сенсibiliзации их защитных систем [101]. Полученные данные указывают на возможность вовлечения в СИУ, индуцируемую эндофитами, генов СПУ, активирующихся под влиянием салициловой кислоты [5].

Использование генно-инженерных конструкций репортерного гена GUS ( $\beta$ -глюкоуронидаза, beta-glucuronidase) с промотором гена *pR-1*, продукт которого накапливался при СПУ, показал, что эндофитные штаммы *Pseudomonas* могут индуцировать этот промотор [115]. Данные интересны тем, что патогенный штамм бактерии *P. syringae* pv. *tomato* стро-

го индуцирует у растений активацию генов СПУ [13]. Соответственно, можно считать, что ответная реакция растений на обработку бактерией, в зависимости от ее патогенности и хозяина, может различаться. Так, обнаружено, что штамм *P. fluorescens* WCS374г, индуцирующий СИУ на растениях редиса, не действовал на арабидопсисе, а *P. putida* WCS358г – наоборот [13]. Другой штамм WCS417г, эффективный на гвоздике, редисе, томатах и бобах, был не эффективен на эвкалипте. Даже внутри вида *A. thaliana* наблюдались значительные отличия между популяциями в ответной реакции растений. Это предполагает высокую степень генетической детерминированности данного признака. Вероятно, при формировании совместимых взаимоотношений между сигнальными и рецепторными системами как макро- и микросимбионтов, должны происходить тесные взаимодействия.

Поскольку инфицирование растений СРРМ затрагивает сигнальные системы, ответственные за формирование СИУ, СПУ, интересны данные о влиянии бактерий на функционирование ключевого белка NPR1, регулирующего, в свою очередь, активность сигнальной системы СПУ. Согласно данным работы Петерса и др. [5], в мутантах *npr1* под влиянием *P. fluorescens* WCS417г не активировалась СИУ, что предполагает важность белка NPR1 в индукции СИУ и дифференциальное его вовлечение в сигнальные пути, индуцируемые гормонами и сигнальными молекулами. Выдвигаются также предположения, что активность этого белка может существенно отличаться в зависимости от его локализации в клетке. Например, цитозольная NPR1 запускает СПУ, а ядерная – СИУ [116]. Виды *Bacillus* активируют СИУ растений по тому же сценарию, что и *Pseudomonas*, но также могут стимулировать защитные системы, не зависящие от действия NPR1 белка [111].

Влияние СРРМ на функционирование защитных систем растений подобно реакциям, индуцирующимся под влиянием патогенов в устойчивых формах [13]. Оно обусловлено способностью эндофитов, наряду с разными метаболитами, выделять во внеклеточную среду такие специфические сигнальные соединения, как фитогормоны [75], олигосахариды, подобные NOD факторам ризобияльных, салициловую и жасмоновую кислоты [86, 87]. Некоторые компоненты запуска, называемые микроб-ассоциированными молекулярными частицами, индуцирующие системную устойчивость растений под влиянием СРРМ, расшифрованы и представляют собой липополисахариды (ЛПС), флагелин клеточных стенок, бактериальный элонгационный фактор Tu [117], а также сидерофоры, псевдобацин и пиоцеолин, антибиотики пиоцианин и 2,4-диацилфлуороглүцинол, N-ацилгомосеринлактоны и 2,3-бутандиолы [5, 6, 13, 108].

У растений к ним существуют специфические рецепторы из семейства Toll-подобных рецепторных белков, содержащих в своей структуре богатые лейцином домены. Так, рецепция флагелина *P. putida*

WCS358 клетками растений арабидопсиса, томатов и бобов осуществлялась посредством взаимодействия с мембраноассоциированными киназами FLS2 (flagelin-sensitive2) [6, 77, 118]. Однако флагелин, обладая высокой элиситорной активностью, не всегда запускал защитную реакцию СИУ, но был достаточно эффективным при запуске ее у эндофитных форм *Pseudomonas* [6] и не всегда вовлекался в формирование эндофитных взаимоотношений СРРМ с растительными тканями [119]. Относительно индуцирования СИУ под влиянием ЛПС бактерий показано, что они так же, как и флагелин, обладали высокой локальной элиситорной активностью в зоне проникновения псевдомонад. В гвоздике и редисе ЛПС, выделенные из *Pseudomonas* WCS417г, могли активировать СИУ, эффективную против грибов *Fusarium* spp. [6]. На картофеле ЛПС обладали высокой запускающей активностью по отношению к *Globodera pallida* [120]. Согласно сообщению Доу с сотр. [121], ЛПС *Pseudomonas*, хотя и являлись пусковым механизмом СИУ, не участвовали в формировании самой СИУ. При этом активация СИУ под влиянием ЛПС прямо пропорционально зависела от уровня доступности ионов железа для бактерий [6]. Можно предположить, что механизм рецепции как флагелина, так и ЛПС на растения ограничивается определением наличия чужеродного организма в непосредственном контакте с клеткой и инициирования неспецифической локальной защитной реакции.

Соответственно, у СРРМ в растениях должна существовать иная природа индуцирующих СИУ молекул. В качестве таких молекул могут участвовать специфические индивидуальные для каждого штамма соединения, вырабатываемые и секретируемые во внеклеточную среду, например пептиды с антибиотическими свойствами, а также универсальные сигнальные молекулы – этилен, салициловая и жасмоновая кислоты, выработка которых бактериями доказана [88, 89]. Важную роль в индукции эндофитами СИУ играют белки, обладающие свойствами гидролаз, ацетилаз полисахаридов, оксидаз, вырабатываемые бактериями, а также растениями в ответ на инфицирование [85]. Так, в ризосфере были обнаружены бактерии, вырабатывающие ферменты, разрушающие оксалат, посредством которых в прилегающей к корням зоне наблюдалось генерирование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в антимикробной концентрации. Обнаружено, что их использование способствовало повышению почти на 70% степени защиты растений арабидопсиса от патогенов [85]. Иммунизация растений риса псевдобацином *P. fluorescens* WCS374г приводила к локальному накоплению высоких доз АФК, а также фенольных соединений и каллозы в зоне инфицирования патогенным грибом *M. oryzae* [15]. Бактерии *Pseudomonas* и *Bacillus* защищали растения от патогенов не только вследствие высокой антифунгальной активности их антибиотиков, но и опосредованной ими индукцией экспрессии преимущественно белков СИУ, накопления в зоне инфицирования фенолов [122], ферментов про- и антиоксидантной системы и продуктов их функцио-

нирования (активные формы кислорода, фитоалексины, лигнин) [123, 124]. Бактеризация растений томатов штаммом *B. subtilis* ВЕВ-DN приводила к экспрессии ряда генов СИУ, среди которых наибольшей активностью характеризовались гены *PR-4*, *PR-6* ингибиторов протеиназ, и ферментов синтеза лигнина, что придавало растениям устойчивости к насекомым [104]. Проникновение в корни гороха бактерии *B. pumilus* SE34 приводило к накоплению каллозы, фенольных соединений и продукта их полимеризации – лигнина [125]. *P. aeruginosa* 13 и *P. aureofaciens* 63–28 стимулировали активность фенилаланинаммоний-лиазы в корнях огурцов [126], сафлора [123], а *P. putida* ВТР1 – липоксигеназы у томатов [127]. Важно, что обработка СРРМ приводила к активации у восприимчивых растений тех же изопероксидаз, что индуцируются в устойчивых растениях под влиянием патогенов [126, 128].

Доказана важная роль псевдобацина *P. fluorescens* WCS374г в формировании СИУ, индицирующей в растениях риса на инфицирование грибом *M. oryzae* [15]. Однако ни псевдобацин, ни пиоцианин, хотя и проявляли прямой антифунгальный эффект в условиях *in vitro*, в растениях значительного защитного эффекта против *R. solani* и *Cohiobolus miyabeanus* не обнаруживали. Не исключено, что это связано с наличием в структуре этих соединений остатков салициловой кислоты, сигнальный путь воздействия которой характеризуется явным перекрытием СИУ [129]. Липопептиды штамма *B. subtilis* S499 проявили себя эффективными активаторами СИУ в растениях табака и бобов [55].

Таким образом, эндофитные штаммы СРРМ повышают сенсбилизацию, то есть чувствительность, генома растения к инфицированию и подготавливают защитную систему растений к последующим ответным реакциям. При этом важно обратить внимание, что такое повышение, как правило, формирует СИУ, нацеленную на защиту растений от некротрофов и насекомых.

\*\*\*

Защита растений от патогенов путем их бактериализации представляет один из наиболее перспективных и экологически безопасных методов повышения урожайности и качества сельскохозяйственной продукции. При умелом использовании законов роста и развития СРРМ в сообществе с растениями, а также знаний об изменении видового их состава можно добиться значительных результатов в биологической борьбе с патогенной микрофлорой.

Однако точного определения механизма воздействия СРРМ на защитную систему растений до сих пор нет [103]. Этому, вероятно, способствует и недостаточный отбор высокоэффективных штаммов среди СРРМ, защищающих растения от патогенов, поскольку гиперсинтез или, наоборот, недостаточный синтез ими защитных соединений может не только иметь вариации в защитном эффекте, но даже индуцировать у растений высокую восприимчи-

вость к патогенам [130]. Кроме того, многие из них невозможно культивировать *in vitro*, что создает проблемы при их коммерческом использовании. Так, согласно Барруисо и др. [7], не более 10% от общей численности ризосферных видов в почве обладают высокой репродуктивной активностью *in vitro*. Это требует более четкого составления регламента производства микробиологических препаратов, составления их смесей и подбора штаммов с учетом его высокой специфичности по отношению к определенной культуре, а иногда и к сорту. Особо следует отметить необходимость учета супрессоров защитной системы растений, выделяемых микроорганизмами, способными негативно влиять на устойчивость растений [3].

Еще одним недостатком биопрепаратов является их малая эффективность при эпифитотиях. Для успешного использования СРРМ необходимо учитывать прогнозируемую степень экономического порога вредоносности, при котором эффективность их использования становится нецелесообразной и требует сочетания с ХСЗР. Поэтому в качестве обрабатываемого препарата их рекомендуется включать только при слабой и средней инфицированности семян возбудителями корневых гнилей, чередуя их в периоды с высокой инфекционной нагрузкой с ХСЗР. Слабыми сторонами биопрепаратов (по сравнению с химическими) следует считать также их неустойчивость, сравнительно медленное действие, связанное с необходимостью адаптации бактерий, входящих в их состав, к новым условиям и высокая специфичность к видам патогенов и растению-хозяину. Так, препараты на основе бактерий *Pseudomonas*, хотя и обладают защитными и стимулирующими рост растений эффектами [62,131], обнаруживают недостатки, связанные со сроками их хранения.

Использование микроорганизмов из рода *Bacillus* весьма перспективно. Их преимуществом является способность избегать конкурентного давления со стороны аборигенных видов, чему в сильной степени подвергаются другие свободно живущие микроорганизмы, искусственно привносимые в агробиоценозы. Информация об особенностях влияния бактерий рода *Bacillus*, проявляющих высокую степень антагонизма по отношению к фитопатогенам, на рост и устойчивость к неблагоприятным факторам среды, продуктивность растений, остается пока ограниченной.

К важным аргументам в пользу использования СРРМ можно отнести их невысокую стоимость, низкую энергоемкость при производстве, возможность сочетания с другими профилактическими мерами, неспособность вызывать инфекционные процессы в организме человека и нецелевых объектах, непатогенность по отношению к растениям. Они способны инактивировать вырабатываемые патогенами токсины и некоторые из них можно применять в качестве эффективных пробиотиков [132], обладают фунгицидными свойствами, способностью влиять на ростовые параметры растений и стимулировать их защитные свойства против стрессов различ-

ной природы, в том числе и СИУ. Их использование в условиях соблюдения регламентов применения может быть альтернативой для, хотя бы частичной, замены ХСЗР [11, 19, 133–135].

Работа финансировалась по грантам 17/4-Б ГНТП “Развитие научной и инновационной деятельности в сельском хозяйстве, биологии и медицине” – “ИННО-2008-2009” и РФФИ-Поволжье (10-04-97021, 10-04-97025).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Захаренко В.А. // Защита растений. 2007. № 12. С. 1–7.
- Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общество фитопатологов, 2001. 302 с.
- Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 2. С. 322–325.
- Новикова И.И. // Биологические средства защиты растений, технологии их подготовки и применения. СПб.: ВИЗР, 2005. С. 303–330.
- Pieterse C.M.J., Van der Ent S., Van Pelt J.A., Van Loon L.C. // Advances in plant ethylene research. Proc. 7-th Inter Symp. On Plant Hormone Ethylene/ Eds. A. Ramina, C. Chang. Dordrecht: Springer, 2007. P. 325–331.
- Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., van Loon L. C. // Phytopathology. 2007. V. 97. P. 239–243.
- Barrueto J., Solano B.R., Lucas J.A., Lobo A.P., Garsia-Villaraco A., Manero F.L.G. Plant-bacteria Interaction: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth / Eds. I. Ahmad, J. Pichtel, S. Hayat. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008. P. 1–17.
- Ongena M., Jacques P. // Trends in Microbiol. 2008. V. 16. № 3. P. 115–125.
- Saunders M., Kohn L.M. // New Phytol. 2009. V. 182. № 1. P. 229–238.
- Van der Lelie D., Taghavi S., Monchy S., Schwender J., Miller L., Ferrieri R., Rogers A., Wu X., Zhu W., Weyens N., Vangronsveld J., Newman L. // Crit. Rev. in Plant Sci. 2009. V. 28. № 5. P. 346–358.
- Тютчев С. Л. Научные основы индуцирования болезнеустойчивости растений. СПб.: ВИЗР, 2002. 328 с.
- Злотников А.К., Злотников К.М. // Агро XXI. 2007. № 10–12. С. 37–38.
- Van Loon L.C. // Eur. J. Plant Pathol. 2007. V. 119. № 3. P. 243–254.
- Conn V. M., Walker A. R., Franco C.M.M. // Molec. Plant-Microbe Interact. 2008. V. 21. № 2. P. 208–218.
- De Vleeschauwer D., Djavaheri M., Bakker P., Hofte M. // Plant Physiology, 2008. V. 148. № 4. P. 1996–2012.
- Казарян Ф.Г., Агаджанян Д.А. // Биол. журнал Армении. 1971. Т. 24. № 9. С. 85–89.
- Jetiyanon J., Kloepper J.W. // Biol. Control. 2002. V. 24. № 3. P. 285–291.
- Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V., Samiyappan R. // Crop Protec. 2001. V. 20. № 1. P. 1–11.
- Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Vacillus* Cohn. в агроэкосистемах. М.: Наука, 2007. 147 с.
- Романенко Н.Д., Попов И.О., Таболин С.Б., Бугаева Е.Н., Заец В.Г. // Агро XXI. 2008. № 1–3. С. 23–27.
- Berg G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. № 1. P. 11–18.
- Wu C.H., Bernard S.M., Andersen G.L., Chen W. // Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 2. № 4. P. 428–440.
- Bolckmans K. // Can. Bull. Ecol. Pest. Manag. 2008. V.13. P. 1–10.
- Монастырский О.А., Першакова Т.В. // Агро XXI. 2009. № 7–9. С. 3–5.
- Siddiqui Z.A. // PGPR: Biocontrol and Biofertilization / Ed. Z.A. Siddiqui. Dordrecht, Netherlands, Springer, 2006. P. 111–142.
- Reva O.N., Smirnov V.V., Petterson B., Priest F.G. // Inter. J. System and Evol. Microbiol. 2002. V. 52. № 1. P. 101–107.
- Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, Прил. к журн. Защита и карантин растений. № 6. 2008.
- Larran S., Perello A., Simon M.R., Moreno V. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 18. № 7. P. 683–686.
- Shi Y., Lou K., Li C. // Afr. J. Biotechnology. 2009. V. 8. P. 835–840.
- Kilan M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmeideknecht G., Hain R. // Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 2000. B. 1. S. 72–93.
- Frey-Klett P., Garbaje J., Trakka M. The mycorrhiza helper bacteria revisited // New Phytol. 2007. V. 176. № 1. P. 22–36.
- Bonfante P., Anca I.-A. // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 363–383.
- Kobayashi D.Y., Crouch J.A. // Annu. Rev. Phytopathol. 2009. V. 47. P. 63–82.
- Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Споробразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. Киев: Наукова Думка, 1982. 282 с.
- Pusey P.J., Wilson C.L. // Plant Disease. 2008. V. 68. P. 753–756.
- Stein T. // Molec. Microbiol. 2005. V. 56. № 4. P. 845–857.
- Sonenshein A.L., Belitsky B.R. // J. Bacteriol. 2001. V. 180. № 23. P. 6298–6305.
- Westers H., Dorenbos R., Van Dijl J.M., Kabel J., Flanagan T., Devine K.M. // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. № 11. P. 2076–2090.
- Arrebola E., Jacobs R., Korsten L. // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 108. № 2. P. 386–395.
- Hsieh F.C., Lin T.C., Meng M., Kao S.S. // Curr. Microbiol. 2008. V. 56. P. 1–5.
- Guder A., Wiedemann I., Sahl H.G. // Biopolymers. 2000. V. 55. № 1. P. 62–73.
- Tsuge K., Akiyama T., Shoda M. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 21. P. 6265–6273.
- McAuliffe O., Ross R.P., Hill C. // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. № 3. P. 285–308.
- Marx R., Stein T., Entian K.-D., Glaser S.J. // J. Protein Chem. 2001. V. 20. №6. P.501–506.
- Kawulka K.E., Sprules T., Diaper C.M., Whittall R.M., McKay R.T., Mercier P. // Biochemistry. 2004. V. 43. № 12. P. 3385–3395.
- Ross R.P., Morgan S., Hill C. // Int. J. Food Microbiol. 2002. V. 79. P. 3–16.
- Duffy B., Schouten A., Raaijmakers J.M. // Ann. Rev. Phytopathol. 2003. V. 41. № 4. P. 501–538.

47. *Gregor A.K., Klubek B., Varsa E.C.* // Can. J. Microbiol. 2003. V. 49. № 8. P. 483–491.
48. *Howell C.R., Stipanovich R.D.* // Phytopathology. 1979. V. 69. P. 480–482.
49. *Боронин А.М., Кочетков В.В.* // Агро XXI. 2000. № 3. С. 3–5.
50. *Belesky D.P., Robbins J.D., Stuedemann J.A., Wilkinson S.R., Devine O.J.* // Agron. J. 1987. V. 79. P. 217–220.
51. *Simons L., Bultman T.L., Sullivan T.J.* // J. Chem. Ecol. 2008. V. 34. № 12. P. 1511–1517.
52. *Lev-Yadun S., Halpern M.* // Symbiosis. 2007. V. 43. P. 105–108.
53. *Torres M.S., Singh A.P., Vorsa N., White J.F.* // Symbiosis. 2008. V. 46. P. 11–19.
54. *Voisard C., Keel C., Haas D., Defago G.* // EMBO J. 1989. V. 8. № 2. P. 351–358.
55. *Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.-L., Thonart P.* // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. № 4. P. 1084–1090.
56. *Jourdan E., Henry G., Duby F., Dommes J., Bartelemy J.P., Thonart P., Ongena M.* // Molec. Plant-Microbe Interact. 2009. V. 22. № 4. P. 456–468.
57. *Максимова Н.П., Блажевич О.В., Лысак В.В., Фомичев Ю.К.* // Микробиология. 1994. Т. 63. № 6. С. 1038–1042.
58. *Kamnev A.A.* // Plant-Microbe Interactions / Eds. E.A. Barka, C. Clément. Research Signpost Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India, 13 Chapter. 2008. P. 291–318
59. *Chen F., Wang M., Zheng Y., Luo J., Yang X., Wang X.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 675–684.
60. *Unno Y., Okubo K., Wasaki J., Shinano T., Osaki M.* // Environ. Microbiol. 2005. V. 7. № 3. P. 396–404.
61. *De Werra P., Péchy-Tarr M., Keel C., Maurhofer M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 12. P. 4162–4174.
62. *Боронин А.М.* // Соросовский образоват. журнал. 1998. № 10. С. 25–31.
63. *Porter C.L.* // Proc. Ind. Acad. Sci. 1932. V. 41. № 12. P. 149.
64. *Debono M., Gordee R.S.* // Annu. Rev. Microbiol. 1994. V. 48. P. 471–497.
65. *Hirano S.S., Baker L.S., Upper C.D.* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 7. P. 2560–2566.
66. *Weller D.M., Raaijmakers J.M., McSpadden G.B., Thomashow L.S.* // Annu. Rev. Phytopathol. 2002. V. 40. P. 309–348.
67. *Chet I., Inbar J.* // Appl. Biochem. Biotech. 1994. V. 48. № 1. P. 37–43.
68. *Pleban S., Chernin L., Chet I.* // Lett. Appl. Microbiol. 1997. V. 25. P. 284–288.
69. *Wiwat C., Siwayaprahm P., Bhumiratana A.* // Curr. Microbiol. 1999. V. 39. № 3. P. 134–140.
70. *Kishore G.K., Pande S., Podile A.R.* // J. Pytopathol. 2009. V. 153. № 3. P. 169–173.
71. *Watanabe T., Yamada T., Oyanagi W.* // Biosci. Biotech. Biochem. 1992. V. 56. № 4. P. 682–683.
72. *Garcia de Salamone I.E., Hynes R.K., Nelson L.M.* // Can. J. Microbiol. 2001. V. 47. № 5. P. 404–411.
73. *Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И.* // Биотехнология. 2006. Т. 46. № 4. С. 50–55.
74. *Sziderics A.H., Rasche F., Trognitz F., Sessitsch A., Wilhelm E.* // Can. J. Microbiol. 2007. V. 53. № 11. P. 1195–1202.
75. *Forchetti G., Masciarelli O., Alemanno S., Alvares D., Abdala G.* // Appl. Microbiol Biotechnol. 2007. V. 76. № 5. P. 1145–1152.
76. *Asgar H.N., Zahir Z.A., Arshad M., Khalidq A.* // Biol. Fertile Soils. 2002. V. 35. № 5. P. 231–237.
77. *Choudhary D.K., Johri B.N.* // Microbiol. Res. 2009. V. 164. № 5. P. 493–513.
78. *Мордухова Е.А., Кочетков В.В., Поликарпова Ф.Я., Боронин А.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 3. С. 287–292.
79. *Веселов С.Ю., Иванова Т.Н., Симонян М.В., Мелентьев А.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 5. С. 175–179.
80. *Kloepper J.W., Gutierrez-Estrada A., McInroy J.A.* // Can. J. Microbiol. 2009. V. 53. № 2. P. 159–167.
81. *Sattar M.A., Gaur A.C.* // Zentralbl. Mikrobiol. 1987. V. 142. S. 393–395.
82. *Joo G.J., Kim Y.M., Kim J.T., Rhee I.K., Kim J.H., Lee I.J.* // J. Microbiol. 2005. V. 43. № 6. P. 510–515.
83. *Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И.* // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 6. С. 567–574.
84. *Saleem M., Arshad M., Hussain S., Bhatti A.S.* // J. Ind. Microbiol. Biotech. 2007. V. 34. № 10. P. 635–648.
85. *Schoonbeek H.-J., Jacquat-Bovet A.-C., Mascher F., Metraux J.-P.* // Molec. Plant-Microbe Interact. 2007. V. 20. № 12. P. 1535–1544.
86. *Visca P., Cievro A., Sanfilippo V., Orsi N.* // J. General Microbiol. 1993. V. 139. № 9. P. 1995–2001.
87. *Shanmugam P., Narayanasamy M.* // Internet J. Microbiol. 2009. V.6. MML2501.
88. *Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Metraux J.-P., Defago G.* // Phytopathology. 1994. V. 84. № 2. P. 139–146.
89. *De Meyer G., Audenaert K., Hofte M.* // Eur. J. Plant Pathol. 1999. V. 105. P. 513–517.
90. *Maurhofer M., Reimmann C., Schmidli-Scherer P., Heeb S., Haas D., Defago G.* // Phytopathology. 1998. V. 88. № 7. P. 678–684.
91. *Alstrom S.* // J. Gen. Appl. Microbiol. 1991. V. 37. № 6. P. 495–501.
92. *Van Peer R., Niemann G.J., Schippers B.* // Phytopathology. 1991. V. 81. № 7. P. 728–734.
93. *Wei G., Kloepper J.W., Tuzun S.* // Phytopathology. 1991. V. 81. № 10. P. 1508–1512.
94. *Gwinn K.D., Gavin A.M.* // Plant Disease. 1998. V. 76. № 8. P. 911–914.
95. *Kelemu S.* // Afr. J. Biotechnol. 2003. V. 2. № 11. P. 394–416.
96. *Хайруллин Р.М., Минина Т.С., Иргалина Р.Ш., Загребин И.А., Уразбахтина Н.А.* // Вестник Оренбургского гос. университета. 2009. № 2. С. 133–137.
97. *Redman R.S., Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J., Henson J.M.* // Science. 2002. V. 298. № 5598. P. 1581–1582.
98. *Bultman T.L., Bell G., Martin W.D.* // Ecology. 2004. V. 85. № 3. P. 679–685.
99. *Campañile G., Ruscelli A., Luisi N.* // Eur. J. Plant Pathol. 2007. V. 11. № 3. P. 237–246.
100. *Popay A.J.* // Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. P. 347–358.
101. *Ryu C., Farag M.A., Hu C., Reddy M.S., Kloepper J.W., Pare P.W.* // Plant Physiol. 2004. V. 134. № 3. P. 1017–1026.
102. *Verhagen B.W.M., Glazebrook J., Zhu T., Chang H.S., Van Loon L.C., Pieterse C.M.* // Molec. Plant-Microbe Interact. 2004. V. 17. № 8. P. 895–908.

103. Yang J.W., Yu S.H., Ryu C.-M. // *Plant Pathol. J.* 2009. V. 25. № 4. P. 389–399.
104. Valenzuela-Soto J.H., Estrada-Hernández M.G., Laclette E.I., Délano-Frier J.P. // *Planta.* 2010. V. 231. № 5. P. 397–410.
105. Pozo M.J., Van der Ent S., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. // *New Phytologist.* 2008. V. 180. № 2. P. 511–523.
106. Hossain M.M., Sultana F., Kubota M., Koyama H., Hyakumachi M. // *Plant and Cell Physiol.* 2007. V. 48. № 12. P. 1724–1736.
107. Thuerig B., Felix G., Binder A., Boller T., Tamm L. // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2006. V. 67. P. 180–193.
108. Verhagen B.W.M., Tritel-Aziz P., Couderchet M., Höfte M., Aziz A. // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. № 13. P. 249–260.
109. Ghosh S., Penterman J.N., Little R.D., Chavez R., Glick B.R. // *Plant Physiol. Biochem.* 2003. V. 41. № 3. P. 277–281.
110. Glick B.R. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 251. № 1. P. 1–7.
111. Kloepper J.W., Ryu C.-M., Zhang S. // *J. Phytopathol.* 2004. V. 94. № 12. P. 1259–1266.
112. Liu Y.-H., Huang C.-J., Chen C.-Y. // *J. Phytopathol.* 2008. V. 98. № 7. P. 830–836.
113. Van der Ent S., Verhagen B.W.M., Van Doorn R., Bakker D., Verlaan M.G., Pel M.J.C., Joosten R.G., Proveniers M.C.G., Van Loon L.C., Ton J., Pieterse C.M.J. // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. № 3. P. 1293–1304.
114. Park K.S., Paul D., Kim J.S., Park J.W. // *Folia Microbiol.* 2009. V. 54. № 4. P. 322–326.
115. Park K.S., Kloepper J.W. // *Biol. Control.* 2000. V. 18. № 1. P. 2–9.
116. Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. // *Science.* 2008. V. 321. № 5891. P. 952–956.
117. Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., Felix G. // *Plant Cell.* 2004. V. 16. № 12. P. 3496–3507.
118. Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L. C., Hufte M., Bakker P.A.H.M. // *Mol. Plant Pathol.* 2005. V. 6. № 2. P. 177–185.
119. Gomes-Gomes L., Böller T. // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. № 6. P. 251–256.
120. Reitz M., Rudolph K., Schröder I., Hoffman-Hergarten S., Hallman J., Sikora R.A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 8. P. 3515–3518.
121. Dow M., Newman M.-A., Von Roepenack E. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2000. V. 38. P. 241–261.
122. Saravanakumara D., Vijayakumar C., Kumarb N., Samiyappana R. // *Crop Protec.* 2007. V. 26. № 4. P. 556–565.
123. Govindappa M., Likesh S., Ravishankar Rai V., Rudra Naik V., Raju S.G. // *Arch. Phytopathol. and Plant Protec.* 2010. V. 43. № 1. P. 26–40.
124. White J.F., Torres M.S. // *Physiol. Plantarum.* 2010. V. 138. № 4. P. 440–446.
125. Benhamou N., Kloepper J.W., Quadt –Hallman A., Tuzun S. // *Plant physiol.* 1996. V. 112. № 3. P. 919–929.
126. Chen C.Q., Bélanger R.R., Benhamou N., Paulitz T.C. // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2000. V. 56. № 1. P. 13–23.
127. Akram A., Ongena M., Duby F., Dommes J., Thonart P. // *BMC Plant Biology.* 2008. V. 8. № 1. P. 1–12.
128. Максимов И.В., Абизгильдина Р.Р., Юсупова З.Р., Хайруллин Р.М. // *Агрохимия.* 2010. № 1. С. 55–60.
129. Audenaert K., Pattery T., Cornelis P., Hofte M. // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 2002. V. 15. № 11. P. 1147–1156.
130. Рябчинская Т.А., Харченко Г.Л., Саранцева Н.А., Бобрешова И.Ю., Злотников А.К. // *Агрохимия.* 2009. № 10. С. 39–47.
131. Логинов О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 2005. 166 с.
132. Байгузина Ф.А., Кузнецова Т.Н., Байгузина С.Н. // Патент РФ. 2002. № 2182172.
133. Chandrashekhara, Niranjannanjan S., Deepak S.A., Amrutesh K.N., Shetty N.P., Shety H.S. // *Asian J. Plant Pathol.* 2007. V. 1. № 1. P. 1–11.
134. Walters D.R., Fountaine J.M. // *J. Agric. Sci.* 2009. V. 147. № 5. P. 523–535.
135. Jacometti M.A., Wratten S.D., Walter M. // *Austr. J. Grape and Wine Res.* 2010. V. 16. № 1. P. 154–172.

## Plant Growth Promoting Microorganisms as Alternative to Chemical Protection from Pathogens (Review)

I. V. Maksimov<sup>a</sup>, R. R. Abizgil'dina<sup>a</sup>, and L. I. Pusenkova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

e-mail: phyto@anrb.ru

<sup>b</sup> Bashkir Research Institute of Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences, Ufa, 450059 Russia

Received June 30, 2010

**Abstract**—The review analyses data on physiological and biochemical influence of rhizospheric and endophytic microorganisms promoting plant growth (PGPR—plant growth promoting rhizobacteria) on induced resistance of plants and the possibility of its use in plant cultivation to protect crops from pathogens and phytophages. Resistance of plants provided by PGPR due to their endosymbiotic interrelationships is directly achieved because they produce peptide antibiotics and hydrolases of chitin and glucan and also because plants form their own system of induced resistance, followed by changes in the balance of defensive proteins, phytohormones, and pro-/antioxidant status.

УДК 577.152.1.001:7+541.516:57.042.2+663.241+543

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ АРОМАТИЧЕСКОГО РЯДА

© 2011 г. М. В. Потапович\*, В. П. Курченко\*\*, Д. И. Метелица\*, О. И. Шадыро\*

\*НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, 220030  
e-mail: pot-maxim@tut.by

\*\*Биологический факультет Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, 220064  
e-mail: kurchenko@tut.by

Поступила в редакцию 15.10.2010 г.

Изучена эффективность ингибирования (антиоксидантная активность) 26 кислородсодержащих ароматических соединений в псевдопероксидазной системе метгемальбумин– $H_2O_2$ –*o*-фенилендиамин (ФДА) или тетраметилбензидин (ТМБ) при 20°C в забуференном физиологическом растворе, pH 7.4, содержащем 6% диметилформамида (ДМФ) и 0.25% диметилсульфоксида (ДМСО). Эффективность ингибиторов количественно охарактеризована константами ингибирования  $K_i$ , мкМ или глубиной ингибирования в процентах. Величина  $K_i$  изменялась в интервале от 4 до 500 мкМ и зависела от субстрата, структуры ингибитора и наличия в них *HO*-групп, электронодонорных заместителей в ароматическом кольце и стерических препятствий. Тип ингибирования при сопряженном окислении 8 пар – бесконкурентный и 5 пар – смешанный и определялся природой субстрата и структурой ингибитора. Фенольные соединения лигнинового комплекса гваяцилового и сирингилового рядов проявили высокую антиоксидантную активность (величина  $K_i$  в пределах 10–300 мкМ) и располагаются в ряд по убывающей эффективности: кофейная кислота > синаповый альдегид > сиреневая кислота > кониферилловый альдегид > *para*-оксикумаровая кислота.

Системы, содержащие биокатализаторы: гемин, метмиоглобин, метгемоглобин и метгемальбумины (MetHa),  $H_2O_2$  или органический гидропероксид в качестве окислителей, принято называть псевдопероксидазными. Ранее нами проведен цикл исследований по инициированию и ингибированию свободнорадикальных процессов в системах гемин(метгемальбумины)– $H_2O_2$  [1–6]. Псевдопероксидазные системы MetHa– $H_2O_2$ – $ArNH_2$ , в которых  $ArNH_2$  – ароматический амин (ФДА или ТМБ), успешно использованы нами для тестирования многочисленных антиоксидантов (ингибиторы) – замещенных фенолов, многоатомных фенолов и их полидисульфидов, аминифенолов и их производных, а также флавоноидов растительного происхождения [6, 7]. Метод конкурирующих реакций свободных радикалов, образующихся в гем-белковых пероксидных системах, с ФДА и ТМБ, с одной стороны, и с антиоксидантами фенольной природы, с другой стороны, использован для количественной характеристики и отбора многочисленных ингибиторов свободнорадикальных процессов [6, 7].

Псевдопероксидазная система MetHa– $H_2O_2$ –ФДА (ТМБ) представляет большой практический интерес для тестирования потенциальных антиоксидантов природного происхождения, в частности фено-

лов, содержащих в ароматическом кольце спиртовые, альдегидные и кислотные заместители. Такие соединения содержатся в эфирных маслах и экстрактах многих растений и широко используются на практике: например, коричный спирт и его производные известны как активные инсектициды, коричный альдегид применяется в парфюмерной промышленности, а коричная кислота – в фармацевтическом производстве. Особый интерес вызывают многочисленные продукты превращения лигнина древесины хвойных и лиственных растений. В химическом отношении лигнин неоднороден и представляет собой сложный комплекс, что не определяется большим числом различных мономерных блоков, которые являются производными фенолпропана, главным образом – кониферилового спирта. Сложность структуры лигнина обусловлена разнообразием связей, при помощи которых мономерные блоки соединяются друг с другом, что объясняет его нерегулярное строение и согласуется с тем, что при синтезе лигнина ферменты участвуют лишь в образовании радикалов кониферилового спирта, которые затем спонтанно образуют различные связи в зависимости от мезомерного состояния радикалов [8].

Среди многочисленных продуктов превращения лигнина древесины дуба особого внимания заслуживают ароматические соединения с одной метокси-группой в бензольном кольце (гваяциловый ряд) – кониферилловый альдегид, ванилин, ванилиновая кислота и с двумя метокси-группами – синаповый альдегид, сиреневый альдегид и сиреневая

**Сокращения:** ДМСО – диметилсульфоксид, ДМФ – диметилформамид, ЗФР – забуференный физиологический раствор, pH 7.4, ТМБ – 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин, ФДА – *ortho*-фенилендиамин,  $K_i$  – константа ингибирования, мкМ,  $f$  – стехиометрический коэффициент ингибирования, **InH** – ароматические кислородсодержащие ингибиторы, **MetHa** – метгемальбумины.



кислота (сирингиловый ряд). Все перечисленные соединения образуются на начальных этапах выдерживания коньячного спирта в процессе этанолиза и гидролиза лигнинового комплекса [9]: содержание этих веществ при выдерживании закономерно возрастает и в существенной степени определяет качество коньяка или другого алкогольного продукта. Антиоксидантные свойства коньяков давно и хорошо известны [10]. Важно оценить антиоксидантную активность производных лигнина гваяцилового и сирингилового рядов.

В табл. 1 и 2 представлены структурные формулы 26 кислородсодержащих ароматических соединений, среди которых все упомянутые выше вещества лигнинового ряда — объекты изучения в данной работе.

Цель работы — использование псевдопероксидазной системы метгемальбумин- $\text{H}_2\text{O}_2$ -ФДА (ТМБ) для количественной характеристики и сравнения антиоксидантной активности 26 кислородсодержащих ароматических соединений.

## МЕТОДИКА

**Объекты исследования.** Использовали бензиловый спирт, бензальдегид и бензойную кислоту (I–III), коричный спирт, коричный альдегид и коричную кислоту (IV–VI), фенол и его пара-замещенные производные — *p*-оксибензиловый спирт, *p*-оксибензальдегид, *p*-оксибензойную кислоту и *p*-оксикоричную (оксикумаровую) кислоту (VII–XI), пирокатехин и его производные — 3,4-диоксибензальдегид, 3,4-диоксибензойную кислоту и 3,4-диоксикоричную (кофейную) кислоту (XII–XV), гваякол и его производные — 3-метокси-4-оксибензиловый спирт, 3-метокси-4-оксибензальдегид (ванилин), 3-метокси-4-оксибензойную (ванилиновую) кислоту, 3-метокси-4-оксикоричный спирт, 3-метокси-4-оксикоричный (кониферилловый) альдегид и 3-метокси-4-оксикоричную кислоту (XXI–XXII), 3,5-диметокси-4-оксибензальдегид (сиреневый альдегид), 3,5-диметокси-4-оксибензойную (сиреневую) кислоту, 3,5-ди-метокси-4-оксикоричный (синаповый) альдегид, и 3,5-диметокси-4-оксикоричную кислоту (XXIII–XXVI).

**Реагенты.** Использовали гемин фирмы “Serva” (Германия), раствор которого готовили в ДМСО и определяли концентрацию спектрофотометрически, используя коэффициент молярного поглощения  $174000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 405 нм [11]. Применяли БСА фирмы “Sigma” (США) без дополнительной очистки, используя для его спектрофотометрического определения  $\epsilon$  (280 нм)  $35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [12]. Метгемальбумин получали по методике, описанной ранее [13], с соотношением компонентов 10 мкМ гема/5 мкМ БСА. В качестве субстратов-восстановителей применяли ФДА фирмы “Fluka” (Швейцария) и ТМБ (“Serva”, Германия), а в качестве субстрата-

окислителя — разбавленный пероксид водорода, определяя концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  с использованием  $\epsilon$  (230 нм)  $72.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [14]. Органические соразтворители ДМСО и ДМФ перед употреблением перегоняли. Для приготовления ЗФР, pH 7.4, использовали соли производства “Реахим” (Россия). В качестве потенциальных ингибиторов окисления ФДА и ТМБ применяли 26 соединений, представленных в табл. 1 и 2: фенол (VII) и пирокатехин (XII) производства “Реахим” (Россия) предварительно очищали; гваякол (XVI) фирмы “Fluka” (Швейцария), бензойную кислоту (III) фирмы “Serva” (Германия) и соединения I, II, IV–VI, VIII–XV, XVII–XXVI (“Sigma-Aldrich”, США) использовали без очистки.

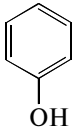
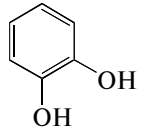
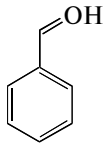
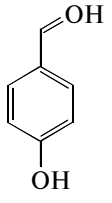
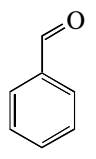
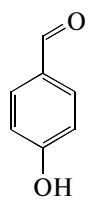
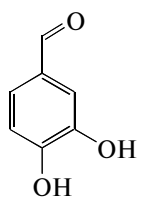
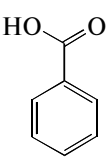
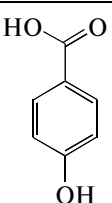
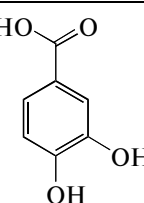
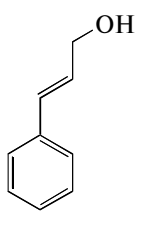
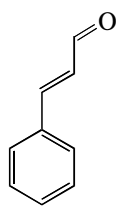
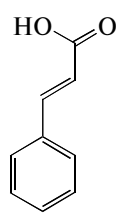
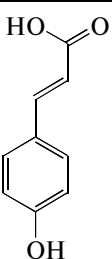
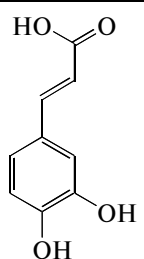
При расчете начальных скоростей расходования синапового альдегида (XXV) использовали молярный коэффициент поглощения  $\epsilon$  (345 нм), равный  $19600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  в ЗФР, pH 7.4, содержащем 6% ДМФ и 0.25% ДМСО.

**Окисление ФДА и ТМБ в системе MetHa- $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Окисление без ингибиторов и в их присутствии проводили при 20°C в термостатированных кюветках фотометра КФК-3 (Россия), в среде ЗФР, pH 7.4, содержащем 6% ДМФ и 0.25% ДМСО, что обеспечивало полную гомогенность реакционной смеси. Реакцию окисления ФДА вели при концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  6 мМ и регистрировали поглощение света продуктом окисления ФДА  $A_{455}$ . При расчете начальной скорости реакции  $V_0$  использовали молярный коэффициент поглощения продукта 2,3-диаминофеназина, равный при pH 7.4  $16200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [15]. За реакцией окисления ТМБ без ингибиторов и в присутствии соединений VII, XII, XVI и XXV с участием MetHa и 0.5 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  следили по поглощению света продуктом окисления ТМБ в его максимуме  $A_{655}$ . При расчете скоростей реакции применяли  $\epsilon$  (655 нм) продукта окисления, равный  $39000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [16]. При расчете скоростей окисления ТМБ из-за наличия периода индукции в накоплении продукта реакции использовали строго линейные участки кинетических кривых роста  $A_{655}$  после окончания лаг-периода.

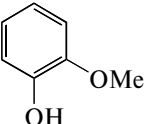
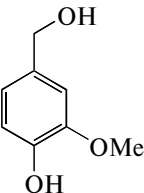
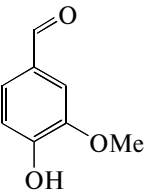
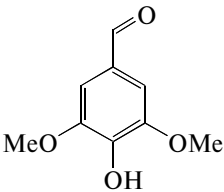
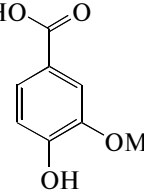
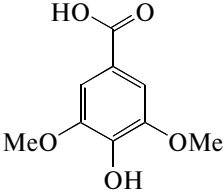
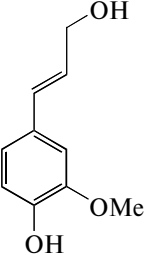
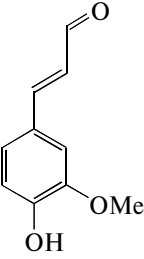
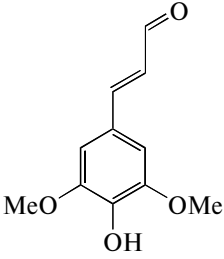
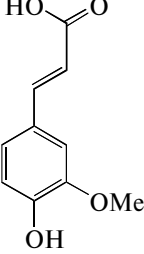
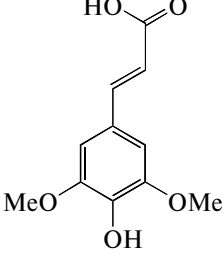
**Спектрофотометрическое исследование систем.** Исследование систем MetHa- $\text{H}_2\text{O}_2$ -ФДА-синаповый альдегид (XXV) и MetHa- $\text{H}_2\text{O}_2$ -ФДА проводили при 20°C в кюветках (1 см) спектрофотометра Cary-50 (“Varian”, США) в среде ЗФР, pH 7.4, содержащей 6% ДМФ и 0.25% ДМСО.

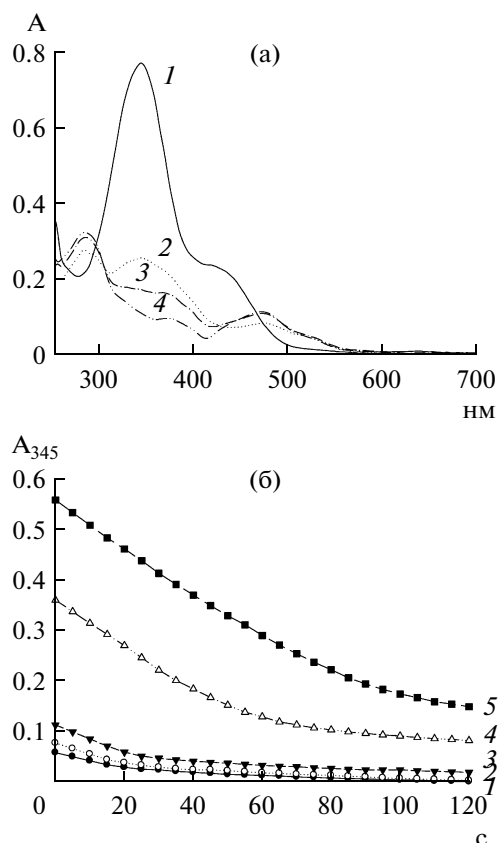
**Ингибирование окисления ФДА и ТМБ соединениями I-XXVI в псевдопероксидазной системе.** Для определения типа ингибирования строили кривые зависимости  $V_0$  от начальной концентрации субстрата в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера–Берка [17]). В наших работах по сопряженному окислению ароматических аминов и многочисленных фенольных соединений доказано, что адекватной количественной характеристикой ингибирования окисления аминов является константа

**Таблица 1.** Характеристика ингибирования окисления ФДА и ТМБ в системе гемин–БСА (10 мкМ : 5 мкМ)–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> кислородсодержащими ароматическими соединениями: 20°C, 3ФР, рН 7.4, 6 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при окислении ТМБ), 6% ДМФ и 0.25% ДМСО, а также 300 мкМ соединений I–X. Типы ингибирования: бк – бесконкурентный и см – смешанный

Структура и номер InH	Ингибирование, %	Структура и номер InH	K <sub>i</sub> , % ингибирования	Структура и номер InH	[InH], мкМ	K <sub>i</sub> , % ингибирования	Тип ингибирования
		VII 	ТМБ: 4 мкМ	XII 	25	ТМБ: 5 мкМ, 35%	бк
I 	2	VIII 	2%				
II 	~0, ТМБ: 3	IX 	~0%	XIII 	160	150 мкМ, 42%	бк
III 	7	X 	~0%	XIV 	300	~0%	–
IV 	6						
V 	8						
VI 	15	XI 	75 мкМ, 36%	XV 	17.5	10 мкМ, 21%	см

**Таблица 2.** Характеристика ингибирования окисления ФДА и ТМБ в системе гемин–БСА (10 мкМ : 5 мкМ)–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> кислородсодержащими ароматическими соединениями XVI–XXVI: 20°C, ЗФР, pH 7.4, 6 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 мМ при окислении ТМБ), 6% ДМФ и 0.25% ДМСО. Типы ингибирования: бк – бесконкурентный и см – смешанный

Структура и номер InH	[InH], мкМ	K <sub>i</sub> , % ингибирования	Тип ингибирования	Структура и номер InH	[InH], мкМ	K <sub>i</sub> , % ингибирования	Тип ингибирования
XVI 	16	ТМБ: 10 мкМ, 28%	см				
XVII 	300	11%	–				
XVIII 	200	300, 27%	бк	XXIII 	300	500 мкМ, 15%	бк
XIX 	300	12%	–	XXIV 	150	50 мкМ, 38%	см
XX 	120	77 мкМ, 37%	см				
XXI 	120	63 мкМ, 30%	бк	XXV 	12.5	ТМБ: 15.5 мкМ, 48%	бк
XXII 	70	15 мкМ, 34%	бк	XXVI 	35	13 мкМ, 45%	бк



**Рис. 1.** Спектры поглощения и кинетика окисления синапового альдегида в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$ . Спектры поглощения синапового альдегида (50 мкМ) и продуктов его окисления в системе гемин–БСА (а) (10–5 мкМ)– $\text{H}_2\text{O}_2$  (6.0 мМ) во времени: 1 – 0, 2 – 60, 3 – 120, 4 – 180 с при 20°C в ЗФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 1 см кювета. Кинетика расходования синапового альдегида (б) (1 – 2, 2 – 6, 3 – 10, 4 – 30, 5 – 50 мкМ) в единицах его оптической плотности  $A_{345}$  в системе гемин–БСА (10–5 мкМ)– $\text{H}_2\text{O}_2$  (6.0 мМ) при 20°C в ЗФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 см кювета.

ингибирования  $K_i$  в мкМ [6, 7]. Для определения  $K_i$  применяли метод Диксона, строя кривые зависимости  $V_0^{-1}$  от  $[\text{InH}]_0$  [17], или метод Корниш–Бодена [18], строя кривые зависимости  $[\text{S}]_0/V_0$  от растущей концентрации  $[\text{InH}]_0$ , где  $[\text{S}]_0$  – начальная концентрация субстрата (ФДА или ТМБ). Для определения стехиометрического коэффициента ингибирования  $f$  использовали теорию метода ингибиторов свободнорадикальных реакций Н.М. Эмануэля и сотр. [19] и уравнения (1) и (2):

$$\Delta\tau = f[\text{InH}]_0/V_i, \quad (1)$$

$$V_0 \approx V_i = f(V_i/f), \quad (2)$$

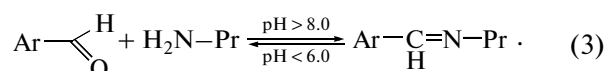
где  $\Delta\tau$  – продолжительность периода индукции в накоплении продуктов окисления ТМБ,  $V_i$  – скорость иницирования радикалов, приближенно равная скорости окисления ТМБ в отсутствие ингибитора.

Детали метода подробно описаны в работах [3–6]. Эффективные константы ингибирования  $K_i$  определены графическим методом с ошибкой, не превышающей 7%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сопряженное окисление ФДА с ароматическими соединениями, содержащими альдегидные группы, в псевдопероксидазной системе отличается некоторыми особенностями и методическими осложнениями, связанными с разными путями превращения бензальдегида (II) и его паразамещенных IX, XIII, коричневого альдегида (V) и его замещенных производных XXI и XXV. Перечисленные альдегиды взаимодействуют с радикалами  $\text{HO}^\bullet$ , генерируемыми в псевдопероксидазной системе, по связи  $-\text{C}(\text{H})=\text{O}$  по гомолитическому радикальноцепному механизму, который детально изучен при жидкофазном окислении алифатических и ароматических альдегидов, инициированном свободными радикалами или катализированном солями многих переходных металлов, с образованием в качестве продуктов соответствующих кислот [20]. Гомолитическое окисление алифатических фрагментов соединений радикалами  $\text{HO}^\bullet$  может приводить к известной последовательности в гваяциловом ряду: кониферилловый альдегид (XXI)  $\rightarrow$  ванилин (XVIII)  $\rightarrow$  ванилиновая кислота (XIX); и в сирингиловом ряду: синаповый альдегид (XXV)  $\rightarrow$  сиреневый альдегид (XXIII)  $\rightarrow$  сиреневая кислота (XXIV) [9].

К сожалению, нельзя исключить также возможность реакции ароматических альдегидов с аминокгруппами белковой глобулы биокатализатора MetHa с образованием азометиновых связей [21]:



Продукты конденсации amino- и альдегидсодержащих соединений – основания Шиффа – образуются легко только в щелочных средах и в этих условиях весьма стабильны, а в кислых средах они легко разрушаются с регенерацией исходных веществ реакции [22]. Поскольку все реакции сопряженного окисления аминов и фенолов проведены нами в строго стандартных условиях (20°C, ЗФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО), то при рН 7.4 нельзя полностью исключить возможность реакции (3).

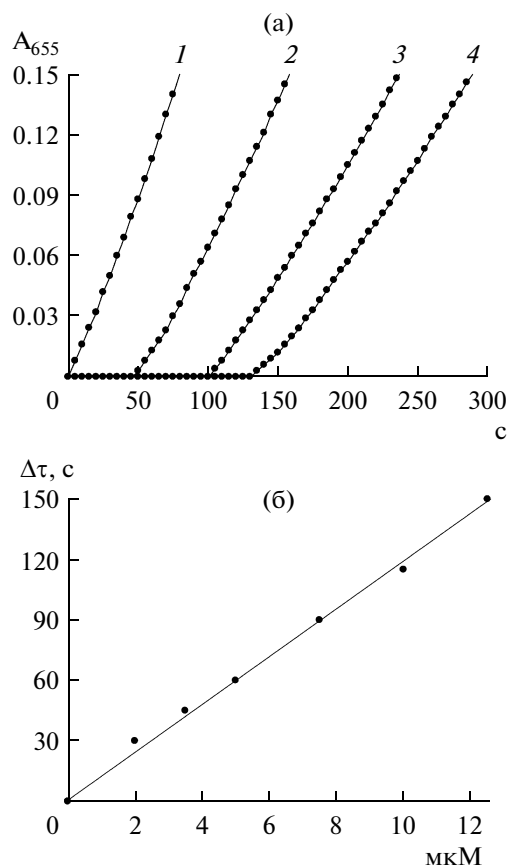
Для проверки такой версии проведено спектрофотометрическое изучение окисления синапового альдегида в псевдопероксидазной системе в отсутствие акцептора радикалов ФДА в стандартных условиях. На рис. 1а представлены спектральные изменения исходного соединения XXV в ходе его окисления и спектры образующихся продуктов: видно, что альдегид XXV быстро расходует, что сопровождается резким уменьшением поглощения

света в максимуме при 345 нм по кинетическому закону первого порядка (рис. 1б). По данным рис. 1б определена начальная скорость расходования XXV, равная при его исходной концентрации 6 мкМ  $2.25 \times 10^{-7} \text{ Мс}^{-1}$ . На рис. 1а видно, что один из продуктов окисления имеет полосу поглощения с максимумом 470 нм и значением  $A \sim 0.1$ . Эта полоса поглощения может принадлежать основанию Шиффа, образованному по реакции (3) с аминогруппой биокатализатора MetHa. Альдегиды XVIII и XXIII не вступали в реакцию (3) в условиях эксперимента, альдегид XXI быстро взаимодействовал с MetHa, так что оптическая плотность  $A_{470}$  была невелика и постоянна в ходе окисления XXI.

**Ингибированное окисление ТМБ в системе MetHa–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–ТМБ.** На рис. 2а показаны кинетические кривые накопления продукта окисления ТМБ в терминах оптической плотности  $A_{655}$  без ингибитора (1) и в присутствии синапового альдегида (XXV) (2–4): как видим, кинетика роста  $A_{655}$  характеризуется периодами индукции. Продолжительность периода индукции  $\Delta t$  линейно зависит от возрастающей концентрации XXV (рис. 2б) в полном соответствии с теорией метода ингибиторов свободнорадикальных процессов при их стационарном режиме [19]. С использованием уравнений (1) и (2) и с учетом того, что скорость инициирования  $V_i \approx 2V_0$ , так как на образование спектрально регистрируемого продукта реакции расходуются два катион-радикала ТМБ<sup>•+</sup>, по данным рис. 2б вычислен коэффициент  $f$ , равный 2.7: т.е. одна молекула XXV акцептирует ~ 3 радикала. Зависимости в координатах Лайнуивера–Берка (не приводятся) подтвердили бесконкурентный характер ингибирования при окислении пары ТМБ–XXV, а из зависимостей в координатах Корниш–Бодуена определена  $K_i$ , равная 15.5 мкМ, т.е. синаповый альдегид – сильный ингибитор окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе.

Напомним, что начальная скорость расходования XXV (6 мкМ) в отсутствие ТМБ равна  $2.25 \times 10^{-7} \text{ Мс}^{-1}$  (рис. 1б). При концентрации XXV 6 мкМ скорость расходования ТМБ (0.5 мМ) равна  $0.8 \times 10^{-7} \text{ Мс}^{-1}$ , т.е. в 2.7 раза ниже скорости окисления ингибитора XXV в абсолютно аналогичных условиях. С ростом концентрации XXV > 6 мкМ скорость расходования альдегида, естественно, будет возрастать, а скорость окисления ТМБ – снижаться.

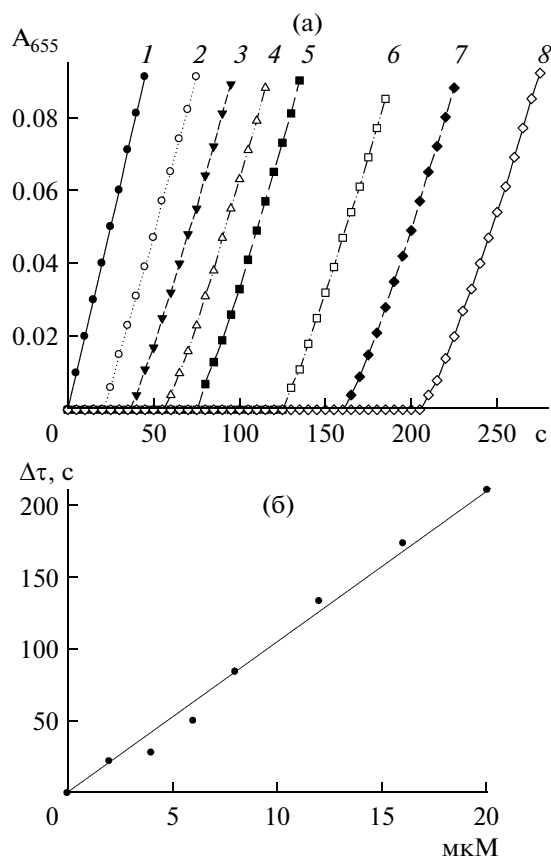
На рис. 3а представлены кинетические кривые роста  $A_{655}$  при окислении ТМБ в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии возрастающих концентраций пирокатехина (2–8), характеризующиеся периодами индукции, продолжительность которых линейно зависит от начальной концентрации пирокатехина (рис. 3б). По данным рис. 3б, вычислена величина  $f$ , равная 2.2. На рис. 4а показаны зависимости в координатах Лайнуивера–Берка, подтверждающие бесконкурентный тип ингибирования. По данным



**Рис. 2.** Сопряженное окисление ТМБ и синапового альдегида в системе гемин–БСА–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Кинетические кривые (а) роста оптической плотности продукта окисления ТМБ (0.5 мМ) в системе гемин–БСА–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> без ингибитора (1) и в присутствии синапового альдегида в концентрациях 5 (2), 10 (3), 12.5 мкМ (4). Зависимость продолжительности периода индукции (б) в накоплении продукта окисления ТМБ от концентрации синапового альдегида в системе гемин–БСА–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 20°C, 3ФР, рН 7.4, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.5 мМ, [ДМФ] = 6%, [ДМСО] = 0.25%.

рис. 4б, в координатах Диксона определена величина  $K_i$ , равная 5 мкМ, т.е. пирокатехин является высокоэффективным ингибитором окисления ТМБ в системе MetHa–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

По аналогичной схеме охарактеризовано сопряженное окисление пары ТМБ–гваякол (XVI): – кинетическими кривыми роста  $A_{655}$  без ингибитора и в его присутствии (рис. 5а), зависимостью продолжительности периода индукции от начальной концентрации гваякола (рис. 5б), из которой определена величина  $f$ , равная 2.2, зависимостями в координатах Лайнуивера–Берка (не показаны), подтверждающими смешанный тип ингибирования и зависимостями в координатах Диксона (рис. 5в), по данным которого определена величина  $K_i$  для гваякола, равная 10 мкМ, т.е. блокирование одной из НО-групп ее метилированием приводит к росту  $K_i$  в 2 раза по

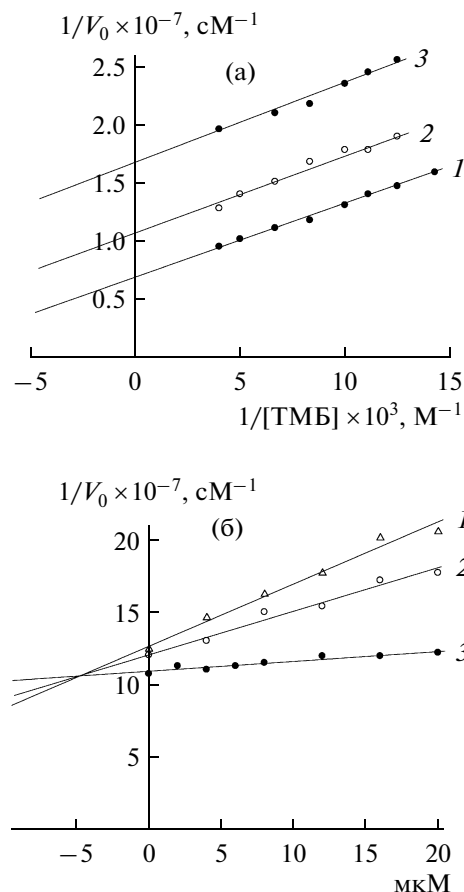


**Рис. 3.** Сопряженное окисление ТМБ и пирокатехина в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$ . Кинетика роста оптической плотности (а) продукта окисления ТМБ (0.5 мМ) в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 12 (6), 16 (7), 20 (8) мкМ пирокатехина. Зависимость продолжительности периода индукции (б) в окислении ТМБ (0.25 мМ) от концентрации пирокатехина: 20°C, ЗФР, рН 7.4,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.5$  мМ,  $[\text{ДМФ}] = 6\%$ ,  $[\text{ДМСО}] = 0.25\%$ .

сравнению с ее значением для пирокатехина, имеющего 2 радикалацептирующих центра. Величина  $K_i$  определена также для пары ТМБ–фенол (VII): она равна 4 мкМ.

В табл. 1 и 2 представлены количественные характеристики ингибированного окисления ТМБ в сопоставлении со структурой использованных ингибиторов. По эффективности ингибирующего действия в соответствии с величинами  $K_i$  в системе  $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$ –ТМБ исследованные соединения могут быть расположены в ряд по убывающей антиоксидантной активности: фенол (VII) > пирокатехин (XII) > гваякол (XVI) > синаповый альдегид (XXV)  $\gg$  бензальдегид (II). Ясно, что ингибирующая активность связана, в первую очередь, с наличием фенольных  $\text{HO}$ -групп в ароматическом кольце и практически отсутствует у бензальдегида.

Общей отличительной чертой окисления всех пар ТМБ–InН является проявление продолжитель-

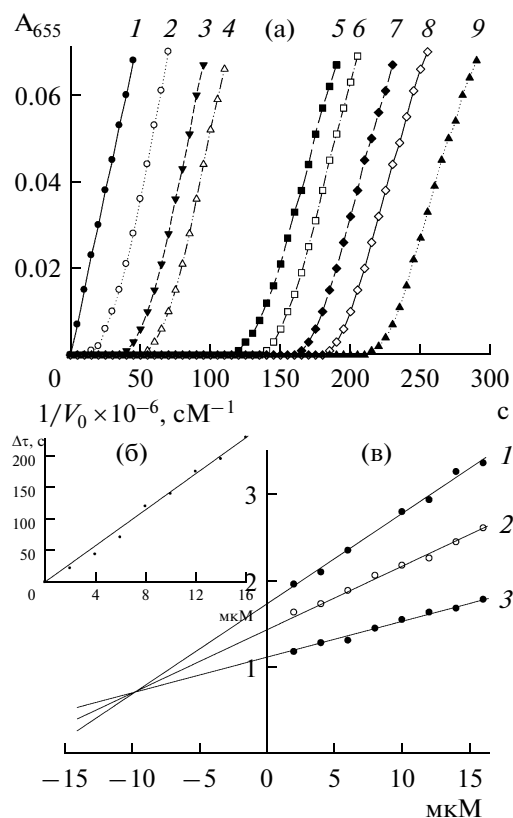


**Рис. 4.** Ингибирование окисления ТМБ пирокатехином в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$ . Зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от его обратной начальной концентрации (а) и от концентрации пирокатехина (б) в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$  в ЗФР, рН 7.4, при 20°C,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.5$  мМ,  $[\text{ДМФ}] = 6\%$ ,  $[\text{ДМСО}] = 0.25\%$ : а – 1 – 0, 2 – 8 и 3 – 16 мкМ пирокатехина; б – 1 – 0.1, 2 – 0.15, 3 – 0.5 мМ ТМБ.

ных периодов индукции в накоплении продукта окисления ТМБ, что объясняется обменной реакцией катион-радикалов  $\text{ТМБ}^{\bullet+}$  с фенольными ингибиторами:



Обменная реакция (4) была открыта Н.М. Эмануэлем и сотр. при исследовании жидкофазного ингибированного окисления углеводов смесями амин–фенол [23, 24] и в нашем случае протекает в одном направлении слева направо, обеспечивая регенерацию исходного субстрата ТМБ и, как следствие, лаг-фазу в накоплении  $\text{ТМБ}^{\bullet+}$  [6, 7]. Значения коэффициента  $f$ , полученные для пирокатехина, гваякола и синапового альдегида (2.2–2.7), свидетельствуют, что эти соединения реагируют с 2–3 радикальными частицами до полного израсходования, после чего окисление ТМБ продолжается с пониженными скоростями (рис. 2а, 3а, 5а). Фенол, пирокатехин, гваякол и синаповый альдегид – эф-

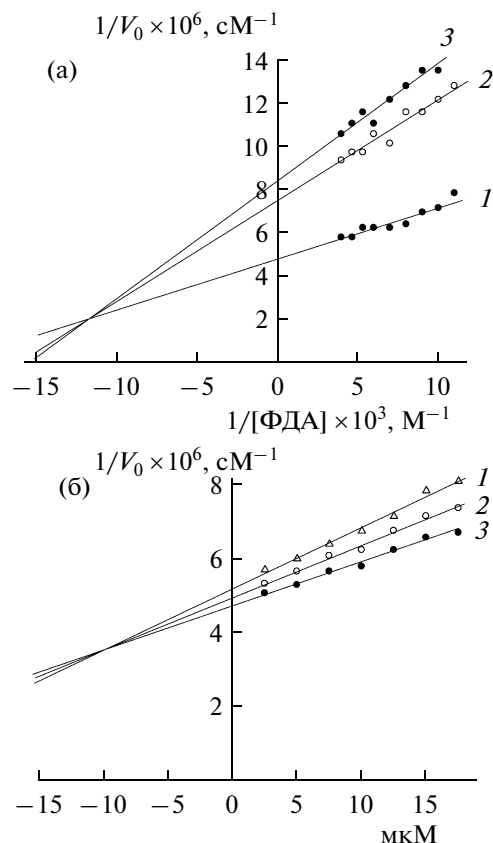


**Рис. 5.** Сопряженное окисление ТМБ и гваякола в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$ . Кинетика роста оптической плотности (а) продукта окисления ТМБ (0.25 мМ) в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии 0 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6), 12 (7), 14 (8) и 16 (9) мкМ гваякола. Зависимость продолжительности периода индукции (б) в окислении ТМБ (0.25 мМ) от концентрации гваякола. Зависимость обратной начальной скорости (в) окисления ТМБ (1 – 0.1, 2 – 0.15, 3 – 0.25 мМ) от концентрации гваякола. 20°C, ЗФР, pH 7.4,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.5$  мМ,  $[\text{ДМФ}] = 6\%$ ,  $[\text{ДМСО}] = 0.25\%$ .

эффективные ингибиторы окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе, так как величины их  $K_i$  равны 4, 5, 10 и 15.5 мкМ соответственно.

**Ингибированное окисление ФДА в системе MetHa– $\text{H}_2\text{O}_2$ –ФДА.** Сопряженное окисление ФДА с использованными ароматическими соединениями отличается от окисления пар ТМБ–InH тем, что на кинетических кривых роста оптической плотности  $A_{455}$  продукта окисления ФДА полностью отсутствуют периоды индукции, т.е. реакция (4) аминильного радикала ФДА $\cdot$  с PhOH слева направо не идет. Во многих случаях глубина ингибирования окисления ФДА мала даже при концентрациях InH до 300 мкМ, сопоставимых с концентрацией субстрата (0.25 мМ). При незначительном ингибировании его уровень характеризовали в процентах при концентрации InH 300 мкМ.

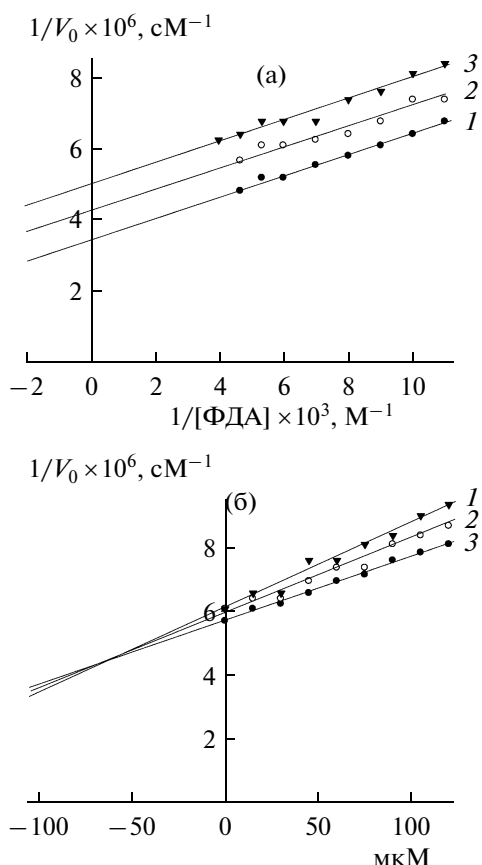
В табл. 1 представлены количественные характеристики ингибирования окисления ФДА в системе



**Рис. 6.** Ингибирование окисления ФДА кофейной кислотой в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$ . Зависимости обратной начальной скорости (а) окисления ФДА от его обратной начальной концентрации и от концентрации кофейной кислоты (б) в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$  в ЗФР, pH 7.4 при 20°C. 6.0 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 6% ДМФ, 0.25% ДМСО: 1 – 0, 2 – 70 и 3 – 150 мкМ кофейной кислоты (а); 1 – 0.12, 2 – 0.17 и 3 – 0.25 мМ ФДА (б).

MetHa– $\text{H}_2\text{O}_2$  соединениями I–VI, не имеющими в ароматическом кольце фенольных HO-групп, но содержащих спиртовые, альдегидные и кислотные заместители: уровень ингибирования окисления ФДА такими соединениями низок (2–15% при концентрации InH 300 мкМ), но повышается в последовательности спирт < альдегид < кислота, как для бензилового спирта (I) и продуктов его окисления (II, III), так и для коричневого спирта (IV) и его продуктов (V, VI). Введение в соединения I–III и VI HO-групп в пара-положение мало сказывается на ингибирующей активности п-оксипроизводных бензилового спирта (VIII), бензальдегида (IX) и бензойной кислоты (X), но резко увеличивает активность п-оксикоричной кислоты (XI), для которой определена  $K_i$ , равная 75 мкМ, свидетельствующая о высокой ингибирующей эффективности.

На рис. 6а показаны кривые зависимости начальной скорости окисления ФДА от его концентрации



**Рис. 7.** Ингибирование окисления ФДА кониферильным альдегидом в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$ . Зависимости обратной начальной скорости (а) окисления ФДА от его обратной начальной концентрации и от концентрации кониферильного альдегида (б) в системе гемин–БСА– $\text{H}_2\text{O}_2$  в ЗФР, рН 7.4 при  $20^\circ\text{C}$ , 6.0 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 6% ДМФ, 0.25% ДМСО: 1 – 0, 2 – 45 и 3 – 90 мкМ кониферильного альдегида (а); 1 – 0.12, 2 – 0.17 и 3 – 0.25 мМ ФДА (б).

в двойных обратных координатах в отсутствие ингибитора (1) и в присутствии кофейной кислоты (XV): как видно, XV сильно замедляет окисление ФДА, а прямые 1–3 пересекаются в одной точке в верхнем левом квадранте, что свидетельствует о смешанном типе ингибирования. Из зависимостей в координатах Диксона (рис. 6б) определена величина  $K_i$ , равная 10 мкМ, т.е. кофейная кислота является сильным ингибитором окисления ФДА.

Аналогичные зависимости в координатах Лайнуивера–Берка и Диксона получены для пары ФДА–кониферильный альдегид (XXI) (рис. 7а, 7б), подтверждающие бесконкурентный тип ингибирования; по данным рис. 7б, определена величина  $K_i$ , равная 63 мкМ, т.е. кониферильный альдегид является довольно эффективным ингибитором окисления ФДА в системе MetNa– $\text{H}_2\text{O}_2$ .

По аналогичной схеме изучено сопряженное окисление ФДА с соединениями гваяцилового ряда

XVII–XX, XXII и соединениями сиригилового ряда XXIII, XXIV и XXVI. Все количественные характеристики ингибированного окисления ФДА представлены в табл. 1 и 2, которые построены по следующему принципу: первая графа в табл. 1 представляет собой структуры кислородсодержащих ароматических соединений, не имеющих фенольной HO–группы, и их ингибирующая активность в процентах; вторая графа табл. 1 включает фенол и его паразамещенные производные VIII–XI и их ингибирующие характеристики; третья графа табл. 1 содержит пирокатехин (XII) и его производные XIII–XV, максимальные концентрации InH, ингибирующие параметры и типы ингибирования; в табл. 2 первая графа содержит гваякол (XVI) и соединения гваяцилового ряда XVII–XXII, а также характеристики ингибирования и его типы; вторая графа табл. 2 включает соединения сиригилового ряда XXIII–XXVI, количественные характеристики и типы ингибирования. Такое представление полученных результатов дает возможность сравнения характеристик ингибирования между собой и их соотношения со структурными особенностями изученных InH.

Для 13 пар субстрат–ингибитор определены типы ингибирования: бесконкурентный (XII, XIII, XVIII, XXI–XXIII, XXV, XXVI) в 8 случаях и смешанный (XI, XV, XVI, XX, XXIV) в 5 случаях. При бесконкурентном типе ингибирования ингибиторы взаимодействуют только с комплексами биокатализатор–субстрат, но не с самим метгемальбумином; при смешанном типе ингибиторы частично конкурируют с субстратом за связывание в активном центре биокатализатора. Тип ингибирования зависит от субстрата и структуры ингибитора, даже незначительные изменения которой влияют на характер ингибирования: например, при окислении ФДА ингибирование 3–метокси–4–оксикоричным спиртом (XX) смешанное, а 3–метокси–4–оксикоричным альдегидом (XXI) – бесконкурентное, т.е. соединения XX и XXI связываются по разным местам белковой глобулы MetNa; при окислении ТМБ пирокатехином (XII) – бесконкурентное, а при ингибировании гваяколом (XVI) – смешанное, т.е. более гидрофильный пирокатехин связывается только с комплексом MetNa–ТМБ, а более гидрофобный гваякол частично конкурирует с гидрофобным ТМБ за связывание с биокатализатором.

Ингибирующая активность изученных соединений в окислении ФДА и ТМБ, в первую очередь, определяется наличием HO–группы в ароматическом кольце. Ее отсутствие объясняет низкий уровень ингибирования соединениями I–VI (табл. 1), отражая малое участие кислородсодержащих функциональных групп в ингибировании окисления ФДА. Уровень ингибирования окисления ФДА для пара-замещенных соединений фенола (VIII–X) незначителен, но возрастает для п–оксикоричной кислоты (XI) ( $K_i = 75$  мкМ), а сам фенол является высо-



коэффициентным ингибитором (при окислении ТМБ  $K_i = 4$  мкМ).

Пирокатехин (XII) – высокоэффективный ингибитор окисления ТМБ ( $K_i = 5$  мкМ), а его производное – кофейная кислота (XV) – сильный ингибитор окисления ФДА ( $K_i = 10$  мкМ), в то время как активность другого производного пирокатехина – 3-метоксибензальдегида (XIII) много ниже ( $K_i = 150$  мкМ).

Как следует из табл. 2, гваякол (XVI) – высокоэффективный ингибитор окисления ТМБ ( $K_i = 10$  мкМ), а его производные – XX, XXI и XXII – активные ингибиторы окисления ФДА ( $K_i$  равна 77, 63 и 15 мкМ соответственно). Из 4 изученных соединений ирингилового ряда (XXIII–XXVI) 3 обнаружили ингибирующую активность высокого уровня: синаповый альдегид (XXV) – сильный ингибитор окисления ТМБ ( $K_i = 15.5$  мкМ), а сиреневая кислота (XXIV) и 3,5-диметокси-4-оксикоричная кислота (XXVI) эффективно ингибировали окисление ФДА ( $K_i$  равны 50 и 13 мкМ соответственно).

Представляет большой интерес сравнение ингибирующей активности InH не только по графам табл. 1 и 2, но и в строках. В верхней строке фенол, пирокатехин и гваякол проявили высокую активность в ингибировании окисления ТМБ, которая минимальна у гваякола из-за метилирования одной из HO-групп. Во второй строке бензиловый спирт и его производные оказались малоактивными в ингибировании окисления ФДА. В третьей строке в окислении ФДА были слабыми ингибиторами бензальдегид (II) и п-оксибензальдегид (IX), но замещенные бензальдегида XIII, XVIII и XXIII обнаружили умеренную ингибирующую активность ( $K_i$  равна 150, 300 и 500 мкМ соответственно). В четвертой строке бензойная кислота (III) и ее производные X, XIV и XIX обнаружили слабое ингибирующее влияние на окисление ФДА, но сиреневая кислота (XXIV) оказалась довольно эффективным ингибитором в псевдопероксидажном процессе ( $K_i = 50$  мкМ). Коричный спирт (IV) незначительно замедлял окисление ФДА, но 3-метокси-4-оксикоричный спирт (XX) – эффективный ингибитор окисления ФДА ( $K_i = 77$  мкМ). Коричный альдегид (V) слабо тормозил окисление ФДА, а кониферилловый альдегид (XXI) – активный ингибитор этого процесса ( $K_i = 63$  мкМ). Еще более эффективным ингибитором оказался синаповый альдегид ( $K_i = 15.5$  мкМ при окислении ТМБ). В седьмой строке слабое ингибирование обнаружила в окислении ФДА коричная кислота (VI), но все ее производные оказались эффективными ингибиторами, которые можно расположить в ряд по возрастающей антиоксидантной активности: оксикумаровая кислота (XI) < 3-метокси-4-оксикоричная кислота (XXII) < 3,5-диметокси-4-оксикоричная кислота (XXVI) < кофейная кислота (XV). Соединения седьмой строки хорошо отражают влияние на величину  $K_i$  заместителей в ароматиче-

ском кольце коричной кислоты: минимальная  $K_i$  (10 мкМ) у XV с двумя радикалацептирующими HO-группами;  $K_i$  возрастает до 13 мкМ у XXVI, где одна HO-группа метилирована, но в орто-положении к другой HO-группе находится электродонорная 5-метокси-группа, снижающая прочность Н–О-связи фенольной группы; удаление 5-метокси-группы у соединения XXII приводит к росту  $K_i$  до 15 мкМ; удаление обеих метокси-групп приводит у соединения XI к росту  $K_i$  до 75 мкМ. Таким образом, наличие электронодонорных заместителей в ароматическом кольце и их число существенно сказывается на реакционной способности фенольной HO-группы по отношению к активным свободным радикалам.

Практическое значение полученных результатов заключается в том, что на количественном уровне сравнена антиоксидантная активность компонентов лигнинового комплекса гваяцилового и сирингилового ряда в строго идентичных условиях окисления ароматических аминов в псевдопероксидажной системе. Все компоненты являются носителями антиоксидантных свойств, а отдельные из них отличаются высокой антиоксидантной активностью и характеризуются константами ингибирования от 10 до 150 мкМ. Величины эффективных констант ингибирования  $K_i$  отражают реакционную способность фенольных HO-групп в реакциях со свободными радикалами, влияние электронодонорных заместителей в ароматическом кольце ингибитора и стерические препятствия с ростом числа заместителей. Наиболее эффективными антиоксидантами природного происхождения оказались производные коричной кислоты.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Международного научного центра (МНТЦ) по проекту В-1746.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Метелица Д.И., Русь О.Б., Пучкаев А.В. // Журн. прикл. химии. 1997. Т. 70. № 10. С. 1713–1720.
2. Русь О.Б., Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 10. С. 1813–1824.
3. Метелица Д.И., Русь О.Б., Пучкаев А.В., Шадыро О.И. // Биохимия. 1997. Т. 62. № 3. С. 323–333.
4. Русь О.Б., Пучкаев А.В., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Ж. прикл. химии. 1998. Т. 71. № 5. С. 842–848.
5. Метелица Д.И., Еремин А.Н., Свиридов Д.О., Камышиников В.С. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 5. С. 628–639.
6. Метелица Д.И., Карасева Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 537–564.
7. Метелица Д.И., Пивень Н.В., Шадыро О.И., Григоренко Ю.А., Лухверчик Л.Н., Денисевич Н.П. // Тр. Белорус. гос. ун-та. 2008. Т. 3. Часть 1. С. 7–21.
8. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987. С. 415–417.

9. Урсул О.Н., Курченко В.П., Власова Т.М., Гавриленко Н.В., Матюшина М.В. // Тр. Белорус. гос. ун-та. 2008. Т. 3. Часть 1. С. 210–220.
10. Скурухин И.М. Химия коньяка и бренди. М.: ДеЛи-Принт, 2005. 296 с.
11. Collier G.S., Praut J.M., De Wet C.R., Tschalala C.F. // Biochem. J. 1979. V. 179. № 2. P. 281–289.
12. Chmelíč I., Kadleček I., Kalons N. // J. Electroanal. Chem. 1979. V. 99. № 2. P. 245–250.
13. Русь О.Б., Метелица Д.И. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2001. № 4. С. 75–82.
14. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. Л.: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.
15. Карасева Е.И., Лосев Ю.П., Метелица Д.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 6. С. 713–721.
16. Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. № 1. С. 116–124.
17. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. С. 183–203.
18. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 2. С. 507.
19. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. // Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982. С. 239–308.
20. Денисов Е.Т., Мицкевич Н.И., Агабеков В.Е. // Механизм жидкофазного окисления кислородсодержащих соединений. Минск: Наука и техника, 1975. С. 104–161.
21. Несмеянов А.Н., Несмеянов Н.А. Начала органической химии. Книга вторая. М.: Химия, 1970, С. 145.
22. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Можяев В.В., Хмельницкий Ю.Л. // Иммуобилизованные ферменты. М.: Высшая школа, 1987. С. 92–93.
23. Карпухина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М. // Докл. АН СССР. 1963. Т. 152. № 1. С. 110–114.
24. Карпухина Г.В., Майзус З.К., Эмануэль Н.М. // Докл. АН СССР. 1965. Т. 160. № 1. С. 158–162.

## Antioxidant Activity of Oxygen-Containing Aromatic Compounds

M. V. Potapovich<sup>a</sup>, V. P. Kurchenko<sup>b</sup>, D. I. Metelitz<sup>a</sup>, and O. I. Shadyro<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Physicochemical Problems, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

e-mail: pot-maxim@tut.by

<sup>b</sup> Biological Faculty, Belarusian State University, Minsk, 220064 Belarus

e-mail: kurchenko@tut.by

Received October 15, 2010

**Abstract**—Inhibition efficiency (antioxidant activity) of 26 oxygen-containing aromatic compounds was studied in methemalbumin–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–*o*-phenylenediamine (PDA) or tetramethylbenzidine (TMB) pseudoperoxidase system at 20°C in buffered physiological solution (pH 7.4) containing 6% DMF and 0.25% DMSO. The inhibitor's efficiency was quantitatively characterized by the inhibition constants ( $K_i$ ,  $\mu\text{M}$ ) or the inhibition degree (%).  $K_i$  values varied in the range of 4 to 500  $\mu\text{M}$  and were influenced by a substrate, the structure of an inhibitor, hydroxyl groups, electron-donating substituents in aromatic ring, and steric hindrances. The type of inhibition at cooxidation of eight pairs was noncompetitive, and that of five pairs was mixed and determined by the substrate nature and the inhibitor structure. Lignin phenolic compounds of guaiacyl and syringal series exhibited high antioxidant activity ( $K_i$  in the range of 10–300  $\mu\text{M}$ ), and their efficiency decreased in the following order: caffeic acid > synaldehyde > syringic acid > coniferyl aldehyde > *para*-hydroxycoumaric acid.

УДК 543.5; 577.112

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ В ЛУКЕ РЕПЧАТОМ (*Allium cepa* L.) НОВОГО БИОРЕГУЛЯТОРА, ДЕЙСТВУЮЩЕГО В СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ

© 2011 г. О. Г. Куликова\*, В. П. Ямскова\*\*, А. П. Ильина\*, Д. В. Маргасюк\*,  
А. А. Молявка\*, И. А. Ямсков\*

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

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

Поступила в редакцию 23.08.2010 г.

В луке репчатом (*Allium cepa* L.) обнаружен биорегулятор, по физико-химическим и биологическим свойствам аналогичный группе биорегуляторов, выделенных из различных тканей животных. Установлено, что за проявление биологического действия растительного биорегулятора отвечает пептид с молекулярной массой  $4036 \pm 2$  Да, для которого была определена 18-членная С-концевая аминокислотная последовательность. На модели проращивания семян ряда овощных культур была показана способность биорегулятора, выделенного из супернатанта экстракта лука, в сверхмалых дозах ( $10^{-13}$  мг белка/мл) ингибировать их рост и развитие.

Ранее нами было показано, что в межклеточном пространстве различных тканей позвоночных животных присутствуют биорегуляторы, влияющие на важнейшие биологические процессы (миграцию, адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток), в концентрациях, соответствующих сверхмалым дозам (СМД),  $10^{-8}$ – $10^{-15}$  мг/мл [1–8]. Биорегуляторы характеризуются наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности, стимулируют репаративные процессы в патологически измененных тканях, способствуя восстановлению их нарушенной структуры [9]. Их можно отнести к группе регуляторных молекул, которые функционируют как “настройщики” органо-тканевого гомеостаза.

Согласно сходству физико-химических свойств и биологического действия биорегуляторы, выделенные из различных тканей и секретов животных, получили название мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ). Установлено, что в состав МГТБ входят углеводы, липиды, белки [10], за проявление биологического действия ответственны пептиды, молекулярная масса которых не превышает 6 кДа, а связанные с ними высокомолекулярные белки модулируют их активность. Между пептидами и белками-модуляторами образуется комплекс по механизму углеводов–белкового взаимодействия в присутствии ионов кальция [11]. МГТБ, выделенные из тканей животных, проявляют устойчивость к воздействию денатурирующих факторов, их вторичная структура характеризуется преобладанием  $\beta$ -структур. Показано, что в водном растворе МГТБ присутствуют в виде частиц размером 50–150 нм, причем наноразмерное состояние определяет характер их активности [4–7, 12].

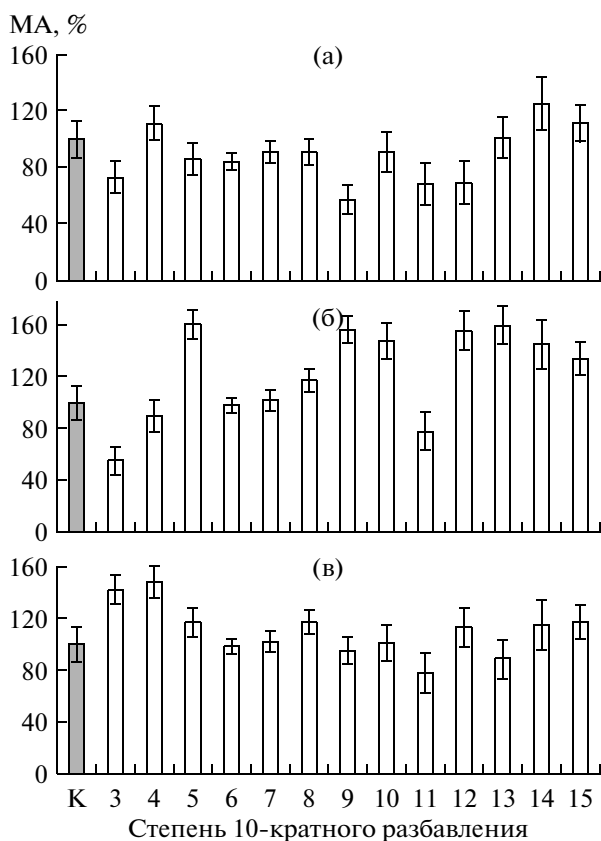
Применив экспериментальный подход, разработанный для исследования МГТБ, к изучению экстрактов растений, мы обнаружили биорегуляторы, проявляющие аналогичные МГТБ физико-химические свойства и биологическое действие. Результаты этого исследования показали, что в листьях подорожника большого (*Plantago major* L.) присутствует биорегулятор, стимулирующий в СМД ( $10^{-11}$  мг белка/мл) заживление кожной раны у мыши *in vivo* [13].

В настоящей работе предпринята попытка идентификации биорегулятора данной группы в луке репчатом (*Allium cepa* L.), который представляет собой травянистое растение семейства лилейных. Кроме широкого применения в качестве ценной пищевой культуры, лук используется как лекарственное растение: в нем содержатся эфирные масла, циклоалин, метилаллин, тиопропионал, кемпферол, производные кверцетина, органические кислоты, углеводы (глюкоза, фруктоза, мальтоза), каротиноиды, аминокислоты, витамин С, различные микроэлементы и фитонциды. Препараты лука обладают противосклеротическим, сахароснижающим, антимикробным, мочегонным, желчегонным и ранозаживляющим действием [14].

Цель работы – идентификация биорегулятора в луке репчатом путем применения экспериментального подхода, ранее разработанного для выделения и очистки МГТБ [2, 4–7], а также изучение влияния растительного биорегулятора на рост и развитие семян некоторых овощных культур.

### МЕТОДИКА

Для выделения биорегулятора был взят лук репчатый (*Allium cepa* L.), произрастающий во Влади-



**Рис. 1.** Дозовая зависимость мембранотропной активности (МА, %): а – экстракта лука (исходная концентрация 0.14 мг/мл); б – супернатанта (исходная концентрация 0.21 мг/мл); в – супернатанта после ВЭЖХ (исходная концентрация 0.03 мг/мл). К – контроль.

мирской области. В работе использовали сернокислый аммоний, нитрат аммония, нитрат калия, гидрат сульфата магния, фосфат калия, гидрат хлорида кальция, азид натрия марки х.ч., бидистиллированную воду (16 МОм). Исследование биологической активности растительного биорегулятора проводили на мышах-гибридах F1 линии C57BL/СВА, самцах весом 18–20 г, содержащихся в стандартных условиях в виварии Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

**Выделение белков.** Для экстракции белков использовали лук репчатый, предварительно нарезанный на фрагменты 3–4 см. Экстракцию проводили в растворе, содержащем  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $2.06 \times 10^{-2}$  М,  $\text{KNO}_3$   $1.88 \times 10^{-2}$  М,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   $3 \times 10^{-3}$  М,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   $1.5 \times 10^{-3}$  М,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1.25 \times 10^{-3}$  М, в течение 5–6 ч при 8–10°C. Растительный экстракт отфильтровывали через марлю, центрифугировали (3000 г 30 мин), осадок отбрасывали и далее не использовали. При постоянном перемешивании к растительному экстракту добавляли сухой сернокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли

(780 г/л), поддерживая рН раствора 7.5–8.0 путем добавления раствора гидроксида аммония. Полученную белковую смесь оставляли на 95–100 ч при 4°C. Осадок белков отделяли центрифугированием (25000 г 30 мин) при 4–8°C. Полученную таким образом фракцию супернатанта и осадка диализовали против воды до полного удаления сернокислого аммония, фильтровали и затем концентрировали, используя роторный вакуумный испаритель, при 37–40°C.

**Адгезиометрический метод.** Для определения мембранотропной активности биорегулятора во фракциях на каждой стадии очистки использовали разработанный ранее для идентификации МГТБ адгезиометрический метод [2].

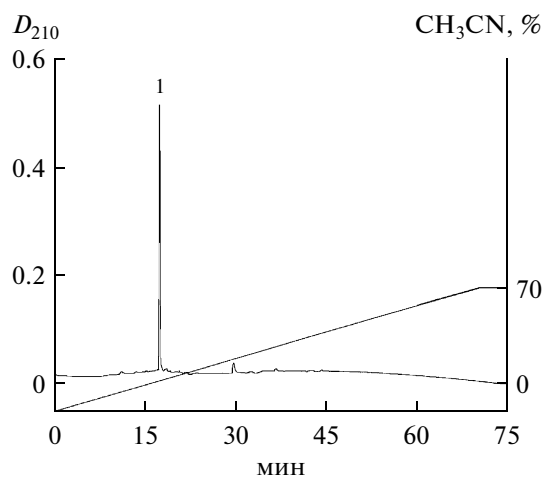
**Содержание белка.** Использовали спектрофотометрический [15] и колориметрический [16] методы.

**Хроматографическое разделение белков.** Супернатант анализировали с использованием хроматографа высокого давления (“Kontron”, США) и гидрофобной колонки (2 × 150 мм) Jupiter C<sub>5</sub> (“Phenomex”, США). Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила (0–70%) в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте (рН 2.2) со скоростью 0.3 мл/мин в течение 70 мин. Детекцию проводили при 210 нм.

**Метод динамического лазерного светорассеяния.** Исследовали гидродинамический радиус частиц в водном растворе супернатанта. Измерение проводили на приборе PhotoCor Complex (“ФотоКор”, Россия), снабженном автоматическим гониометром, псевдокорреляционной системой счета фотонов PhotoCor, одноплатным мультитиммерным коррелятором реального времени PhotoCor-FC, использованном в логарифмической конфигурации (интервал времен задержки  $0.01–5 \times 10^5$  мс), и гелий-неоновым лазером Uniphase 1135P мощностью 20 мВт с длиной волны 633 нм [4–7]. Измерения проводили в интервале величин угла рассеивания 60°–120° при 23°C. Растворы, содержащие биорегулятор, предварительно очищали от пыли фильтрованием через мембраны Durapore с диаметром пор 0.45 мкм (“Millipore”, США).

**Аминокислотный анализ.** Использовали аминокислотный анализатор Hitachi 835 (Япония). Разделение продуктов гидролиза осуществляли в стандартном режиме на катионообменной колонке с последующей детекцией нингидриновых производных при 570 и 440 нм. Образцы раствора, содержащего пептид, гидролизовали 24 ч 5.7 М HCl при 110°C [17].

**Масс-спектрометрический анализ.** Анализ молекулярной массы пептида проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией в матрице (MALDI-TOF) на времяпролетном масс-спектрометре UltraFlex 2 (“Bruker Daltonic”, Германия). Образец для масс-спектрометрического анализа получали упариванием досуха с последующим разведением в 70%-ном ацетонитриле, содержащем 0.1%-ную трифтор-



**Рис. 2.** Разделение супернатанта экстракта лука с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Jupiter C<sub>2</sub> (2 × 150 мм). Элюцию осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила (0–70%) в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте (рН 2.2) со скоростью 0.3 мл/мин в течение 70 мин. Детекцию проводили при 210 нм. Пик 1 – ВЭЖХ-фракция супернатанта лука.

уксусную кислоту. В качестве матрицы в работе использовали α-циано-4-гидроксикоричную кислоту.

**Установление С-концевой аминокислотной последовательности.** Пептид (600 пмоль) растворяли в 10 мкл натрий-цитратного буфера (50 мМ, рН 6.0), затем к данному раствору добавляли карбоксипептидазу Y (“Sigma Aldrich”, США) в соотношении фермент–пептид 1 : 50 по массе. После 1, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин инкубации при 37°C отобрали аликвоты по 1 мкл, смешивали с 1.5 мкл раствора матрицы (α-циано-гидроксикоричная кислота) и наносили на плашку для дальнейшего масс-спектрометрического анализа продуктов реакции.

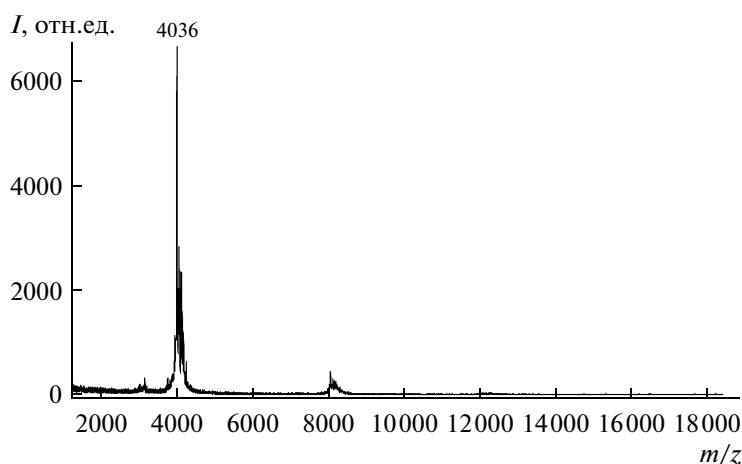
**Специфическая активность биорегулятора.** В качестве объектов исследования использовали лук (*Alli-*

*um cepa* L.), чеснок (*Allium sativum* L.), укроп (*Anethum graveolens* L.), горох (*Pisum sativum* L.), а также свеклу (*Beta vulgaris* L.) “Тавриш” (Россия). В каждом случае брали по 100 семян в контрольной и опытной серии, каждый эксперимент повторяли по 3 раза. Семена предварительно стерилизовали бидистиллированной водой при 50–55°C в течение 20 мин. Затем их помещали в чашки Петри на двойной слой фильтровальной бумаги. Опытную серию семян обрабатывали водным раствором супернатанта экстракта лука в концентрации 10<sup>-13</sup> мг белка/мл; контрольную серию семян обрабатывали аналогичным объемом воды. На 12 сут эксперимента оценивали высоту проростка (мм), массу (мг) и всхожесть семян как отношение проросших к общему количеству (%). У гороха определяли также длину корня (мм). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования осуществляли очистку растительного биорегулятора по ранее разработанной методике [1]. Методом биотестирования было показано, что мембранотропную активность, характерную для МГТБ, проявлял только супернатант, в то время как экстракт лука не проявлял мембранотропного действия (рис. 1а, 1б).

Методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 2) было установлено, что основным компонентом супернатанта являлся полипептид, гомогенность которого была доказана масс-спектрометрическим анализом. Молекулярная масса полипептида составляла 4036 ± 2 Да (рис. 3). Аминокислотный анализ показал наличие в образце 44 аминокислотных остатков: Асп (3), Тре (2), Сер (3), Глу (6), Про (3), Гли (7), Ала (5), Вал (2), Иле (1), Лей (3), Тир (2), Фен (2), Лиз (2), Гис (1), Арг (2). Подобно другим МГТБ, по-



**Рис. 3.** MALDI-TOF -масс-спектр фракции супернатанта после ВЭЖХ. 4036 – молекулярная масса исследуемого пептида, Да.

Влияние биорегулятора, выделенного из лука, на рост и развитие семян (отличия достоверны при  $p < 0.05$ )

Объект	Биометрические параметры	Контроль	Опыт
Лук	Высота побега, мм	$8.9 \pm 0.2$	$7.8 \pm 0.2$
	Всхожесть, %	96	92
Горох	Вес корня, мг	$127 \pm 1.9$	$118 \pm 3.6$
	Всхожесть, %	89	61
Чеснок	Всхожесть, %	93	73
Укроп	Высота побега, мм	$5.2 \pm 0.2$	$4.8 \pm 0.2$
	Вес побега, мг	$10.3 \pm 0.03$	$8.9 \pm 0.03$
	Всхожесть, %	66	59

лученным ранее из тканей животных [6], изучаемый пептид также не имел остатков Цис, Мет и Три.

Используя ферментативный гидролиз карбоксипептидазой Y изучаемого пептида с последую-

щим MALDI-TOF – масс-спектрометрическим анализом реакционной смеси, была установлена его 18-членная С-концевая аминокислотная последовательность:

ГлиФенГлиГлуГлиАлаТирТреГлиАлаВалАлаАлаГлиТреГлуГлиАрг.

Сравнительный анализ полученной С-концевой аминокислотной последовательности в базе данных Uniprot (<http://www.uniprot.org>) полипептидов не выявил пептидов с аналогичной аминокислотной последовательностью.

Методом динамического лазерного светорассеяния в водном растворе супернатанта были обнаружены крупные частицы размером  $99.2 \pm 4.96$  нм; после обращенно-фазовой ВЭЖХ во фракции пептида наноразмерных частиц обнаружено не было. Следует отметить, что фракция после ВЭЖХ проявляла мембранотропную активность, но в отличие от супернатанта не в СМД, а в более высоких концентрациях, соответствующих  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  мг белка/мл (рис. 1в). Полученные результаты можно объяснить, предположив, что при обращенно-фазовой ВЭЖХ произошло отделение пептида, ответственного за активность растительного биорегулятора, от других его компонентов, взаимодействие с которыми приводило к образованию наноразмерных частиц, активных в СМД. Возможно, что представленные на рис. 1в другие фракции ВЭЖХ содержат модулятор, влияющий на активность пептида. Следует также отметить, что биорегулятор, присутствующий в экстракте лука, до осаждения белков сульфатом аммония не проявлял мембранотропного действия. Очевидно, что отсутствие активности биорегулятора связано с его взаимодействием с другими веществами экстракта. Подобное ингибирование активности биорегулятора данной группы было показано при исследовании сыворотки крови позвоночных животных [1, 11]. Поиск и идентификация модуляторов, входящих в состав растительного биорегулятора, яв-

ляется предметом наших дальнейших исследований. Данное предположение согласуется с результатами, ранее полученными при исследовании МГТБ, выделенных из тканей глаза [12]. В этом исследовании было показано, что после обращенно-фазовой ВЭЖХ пептид, ответственный за активность биорегулятора, также утрачивает способность проявлять ее в СМД. Вероятно, биорегуляторы данной группы, выделенные из тканей животных и растений, имеют сходное строение: в их состав входят биологически активные пептиды, а также вещества, влияющие на их биологическое действие.

Биорегулятор снижал некоторые биометрические параметры роста и развития семян самого лука, гороха, укропа, а также чеснока (таблица). При сопоставлении параметров контрольной и опытной серий проростков свеклы достоверных отличий выявлено не было. Данное исследование представляет собой начальный этап изучения влияния растительного биорегулятора на рост семян. На основании полученных данных довольно сложно сделать какие-либо выводы. В проведенном эксперименте нас интересовало влияние СМД, выявленных методом биотестирования для биорегулятора, на рост семян. При проведении эксперимента мы принимали во внимание существующие данные о совместимости растений при их посадке. В настоящей работе мы предприняли попытку определения влияния идентифицированного в луке нового биорегулятора в СМД на прорастивание семян ряда покрытосеменных растений.

Таким образом, в луке репчатом был обнаружен биорегулятор, по свойствам аналогичный МГТБ

животного происхождения. Установлено, что основным компонентом супернатанта экстракта лука является обладающий биологической активностью пептид, для которого была определена 18-членная C-концевая аминокислотная последовательность. Также была показана способность биорегулятора ингибировать рост и развитие семян ряда овощных культур.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии. 1991. Т. 52. № 2. С. 181–191.
2. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н., Клеменкова З.С., Антипов Б.Г., Черников Ф.Р., Гусынина М.М., Рыбакова Е.Ю. // Рос. хим. журн. (Журн. Рос. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 5. С. 34–39.
3. Krasnov M.S., Gurmizov V.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 28–37.
4. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research / Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 38–48.
5. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research/ Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 49–56.
6. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research/ Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 57–67.
7. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Borisenko A.V., Yamskov I.A. // Biochemical Physics: Frontal Research/ Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 71–78.
8. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Filatova A.G., Yamskov I.A. // New Trends in Biochemical Physics: Research/ Ed. S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge–N.-Y.: Nova Sci. Publ. Inc., 2007. P. 73–82.
9. Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямсков И.А., Ямскова В.П. // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 6. С. 736–745.
10. Назарова П.А., Краснов М.С., Ямскова В.П., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 529–533.
11. Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А., Вечеркин В.В., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 4. С. 407–413.
12. Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А., Ильина А.П., Краснов М.С., Маргасюк Д.В., Борисенко А.В., Березин Б.Б., Кузнецова Е.С., Бурак А.К., Ямсков И.А. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. С. 1195–1203.
13. Краснов М.С., Ямскова В.П., Маргасюк Д.В., Куликова О.Г., Ильина А.П., Рыбакова Е.Ю., Ямсков И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 146–153.
14. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия здоровья. М.: АСТ, 2008. 896 с.
15. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.
16. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. // Anal. Biochem. 1985. Т. 150. № 5. С. 76–85.
17. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Т. 227. № 6. P. 680–682.

## Identification of a New Bioregulator Acting in Ultralow Doses in Bulb Onion (*Allium cepa* L.)

O. G. Kulikova<sup>a</sup>, V. P. Yamskova<sup>b</sup>, A. P. Il'ina<sup>a</sup>, D. V. Margasyuk<sup>a</sup>,  
A. A. Molyavka<sup>a</sup>, and I. A. Yamskov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Nesmeyanov Institute of Element-Organic Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119999 Russia  
e-mail: koulikova\_olga@mail.ru

<sup>b</sup> Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

Received August 23, 2010

**Abstract**—A bioregulator that has physicochemical and biological properties similar to a group of bioregulators isolated from various animal tissues has been found in the bulb onion (*Allium cepa* L.). It was determined that the biological action of the plant bioregulator is determined by a peptide with molecular weight of  $4036 \pm 2$  Da whose 18-C-terminal amino acid sequence consisted of 18 residues. On models of seed germination of some vegetable cultures, the ability of the bioregulator isolated from supernatant of onion extract in ultralow doses ( $10^{-13}$  mg of protein/ml) to inhibit growth and development was demonstrated.

УДК 577.152.3

## ФРАГМЕНТ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК-ИНГИБИТОР ХИМОТРИПСИНА И ТРИПСИНА В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 г. И. А. Парфёнов\*, Т. А. Ревина\*, П. П. Пашковский\*\*, Н. Л. Радюкина\*\*, Т. А. Валуева\*

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

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

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

Поступила в редакцию 15.11.2010 г.

Из генома картофеля (*Solanum tuberosum* L. сорт Юбилей Жукова) выделен продукт полимеразной цепной реакции, амплифицированный с геномной ДНК с использованием сконструированных праймеров, обозначенный как РКР1J-B. Установлена нуклеотидная последовательность РКР1J-B и восстановлена аминокислотная последовательность кодируемого им белка. Анализ этой последовательности позволил высказать предположение, что выделенный фрагмент гена кодирует белок-ингибитор химотрипсина и трипсина (РКС1-23, potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor), присутствующий в клубнях.

Клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) содержат значительную группу водорастворимых белков, в состав которой входят ингибиторы протеолитических ферментов различных классов [1]. В ряде сортов европейской и японской селекции в их составе присутствуют белки с молекулярной массой 20–24 кДа, структурно родственные соевому ингибитору трипсина Кунитца, которые действуют на сериновые и цистеиновые протеиназы. Эти ингибиторы выделяются в подсемейство картофельных ингибиторов протеиназ Кунитца и обозначают РКР1 (potato Kunitz-type proteinase inhibitors) [2]. На основании строения N-концевых аминокислотных последовательностей белки РКР1 разделяют на пять структурных групп, три из которых, А, В и С, наиболее изучены [2]. Физиологические функции, которые осуществляют эти ингибиторы в растениях, и пути их экспрессии *in vivo*, окончательно еще не установлены. Однако показано, что белки РКР1 участвуют в защитной реакции растения при атаке фитопатогенными микроорганизмами, подавляя не только действие секретируемых ими протеиназ, но и их рост и развитие [3, 4].

К настоящему времени описано более ста нуклеотидных последовательностей (в большинстве, кДНК), кодирующих белки РКР1 в различных сортах картофеля как европейской, так и азиатской селекции (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Предполагают, что каждый сорт картофеля содержит свой уникальный набор таких генов, при этом в процессе селекции происходит непрерывная эволюция их последовательностей [5].

В нашей предыдущей работе [6] был детально охарактеризован белок РКС1-23, выделенный из клубней картофеля сорта Юбилей Жукова, выведенного в последние годы российскими селекционерами и районированного в средней полосе России. Бе-

лок РКС1-23 действовал не только как эффективный ингибитор химотрипсина и трипсина, но и подавлял рост мицелия двух фитопатогенов *Phytophthora infestans* Mont. de Bary и *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc., поражающих картофель. На основании структуры N-концевой аминокислотной последовательности белок РКС1-23 был отнесен к подсемейству РКР1 и локализован в структурной группе РКР1-B [6]. В эту группу объединены родственные белки, действующие как ингибиторы сериновых протеиназ клана химотрипсина [2, 5, 7].

Цель работы – выделение, секвенирование и анализ последовательности фрагмента гена, кодирующего белок РКС1-23 в клубнях картофеля.

### МЕТОДИКА

Тотальную ДНК картофеля (*Solanum tuberosum* L. сорт Юбилей Жукова) выделяли из двухнедельных проростков в соответствии с методом, описанным в работе [8]. Клубни проращивали во влажной камере при естественном освещении и комнатной температуре.

Для создания праймеров был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей белков РКР1-B, опубликованных в работах [2, 5, 9, 10] и базе данных NCBI. С использованием программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Vector NTI (<http://www.invitrogen.com>) были сконструированы прямой и обратный праймеры:

5'-(ACCTAGTGATGCTACTCCAGTACTTGACG)-3'

и

5'-(TТАCTGGACTTGGTTGAAGGAGACATC)-3'.



Содержание идентичных остатков (%) в нуклеотидной и аминокислотной последовательностях белков РКРІ-В

	Аминокислотная последовательность									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1		89.1	93.3	86.5	93.8	90.7	94.3	94.8	91.7	89.1
2	92.6		92.2	91.7	90.2	90.2	90.2	91.2	91.2	86.8
3	96.2	94.5		90	96.8	96.4	97.4	97.3	95.9	91.7
4	90.7	94.8	92.9		90	90	90.2	91	91.4	88.2
5	96	94.3	98.5	92.6		93.7	96.9	98.2	95	93.3
6	95.2	94.5	97.3	92.8	96.7		94.8	94.6	98.6	89.1
7	96.3	93.4	98.6	92.3	98.5	97.3		93.2	95.9	97.4
8	96.6	94.8	98.9	93.1	96.1	97.1	99		95.9	93.2
9	95.4	95.2	97.9	93.4	97.3	98.8	97.6	97.7		90.6
10										
	Нуклеотидная последовательность									

1 – РКСІ-23, 2 – РКТІ-22, 3 – СІС1, 4 – gCDI-B1, 5 – P4D11, 6 – PI-2, 7 – PSPI-21-6.3, 8 – KPi B-k2, 9 – PIH5, 10 – PSPI-21-5.2.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в амплификаторе Eppendorf Mastercycler personal (США). Реакционная среда (20 мкл) содержала: Taq-полимеразу (5 ед.), специфические праймеры (прямой и обратный) (по 20 пмоль), 20 мкг ДНК, 0.2 мМ дАТФ, 0.2 мМ дГТФ, 0.2 мМ дТТФ, 0.2 мМ дЦТФ, 60 мМ Трис-НСІ рН 8.5, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол, 0.1% Тритона X-100. ПЦР проводили при следующих условиях: 95° – 5 мин, затем 94° – 30 с, 58° – 30 с, 72° – 2 мин (30 циклов) и 72° – 5 мин.

Аmplифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 0.8%-ном геле агарозы и экстрагировали с помощью набора для экстракции ДНК (DNA Extraction Kit, “Fermentas”, Литва). В результате были получены ПЦР-продукты, предполагаемого размера около 550–600 н.п. Полученные фрагменты секвенировали в направлениях 5' и 3' с использованием указанных выше праймеров. Нуклеотидная последовательность продуктов ПЦР была установлена в научно-производственной компании “Синтол” (Москва).

Обработку результатов секвенирования, а также их анализ и выравнивание полученных последовательностей проводили, используя программы Unipro UGENE (<http://genome.unipro.ru/>) и Vector NTI AlignX.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ПЦР из генома картофеля был выделен продукт, амплифицированный с геномной ДНК с использованием специфических праймеров, обо-

значенный как *PKPIJ-B*, который по данным электрофореза содержал 550–600 нуклеотидных пар (н.п.). Секвенирование этого продукта показало, что фрагмент *PKPIJ-B* состоит из 582 н.п.

Как уже упоминалось, белки РКРІ разделяют на три структурные группы: РКРІ-А, РКРІ-В и РКРІ-С [2]. Анализ 3'-участков генов, кодирующих белки всех трех структурных групп позволил предположить, что выделенный фрагмент гена кодирует белок, относящийся к группе РКРІ-В. На рис. 1 приведено сравнение нуклеотидных последовательностей выделенного фрагмента *PKPIJ-B* и генов, кодирующих белки РКРІ-В в шести сортах картофеля, которые представлены в базе NCBI Gene Bank Blast. Последовательность нуклеотидов в фрагменте *PKPIJ-B* характеризовалась высокой степенью сходства (от 95.2 до 96.6% идентичных н.п.) с генами *PKPI-B9* (AY693424), *PKPI-B10* (AF536175.1) [10], *PI-2* (AY166690) [9], *KPi B-k2* (DQ168333.1) [11], *PIH5* (AF492359), *P4D11* (AF4955584) и *SIC1* (AF492769) [5], которые были обнаружены в картофеле сортов Истринский, Elkana, Kurasa, Provita и Saturna соответственно. Однако она значительно отличалась от последовательности *gCDI-B1* (Q41484) из сорта Dan-shaku, содержащей только 90.7% идентичных н.п. [2]. Оценка степени сходства последовательностей генов и полученного фрагмента *PKPIJ-B*, кодирующих белки РКРІ-В в картофеле семи сортов, показала, что они содержат от 89 до 99% идентичных н.п. (таблица). Оказалось, что наиболее варибельные фрагменты последовательностей расположены в 5'-концевой части молекул. Анализируя положения замен нуклеотидов в этих последовательностях, можно сделать заключение, что они локализируются в од-

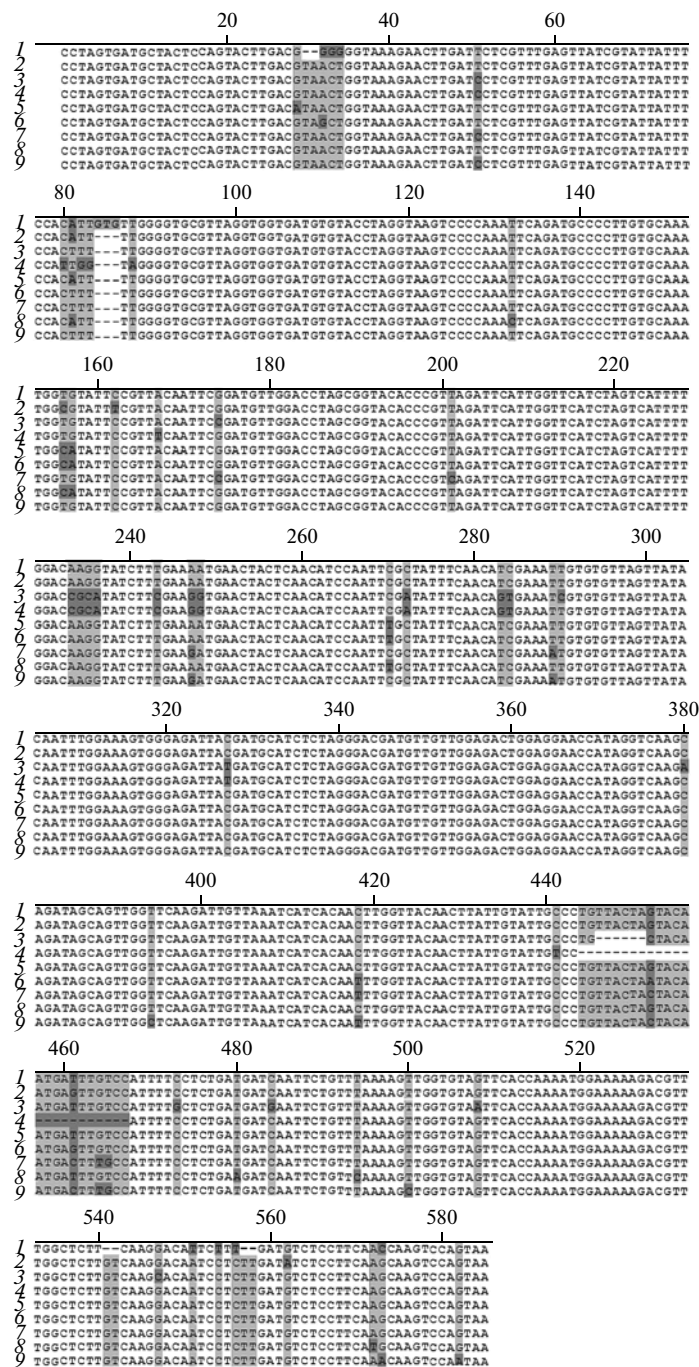
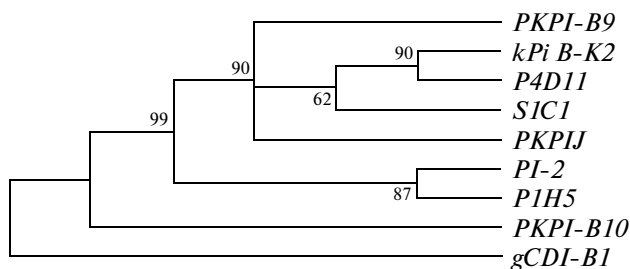


Рис. 1. Сравнение нуклеотидной последовательности, кодирующей белка РКPI-B в различных сортах картофеля. 1 – PKPIJ (данная работа), 2 и 3 PKPI-B9 и PKPI-B10 [10], 4 – gCDI-B1 [2], 5 – KPi B-k2 [11], 6, 7 и 8 – SIC1, PIH5, и P4D11 [5], 9 – PI-2 [9]. Варибельные участки окрашены серым цветом, единичные замены нуклеотидов выделены темно-серым.

них и тех же участках. Весьма вероятно, что в этих участках и происходили рекомбинации. На рис. 2 приведено филогенетическое дерево, построенное по принципу максимального подобия с помощью программ PhyML 3.0 aLRT (<http://www.phylogeny.fr/>) и MEGA 4. Видно, что сорта японской и европейской (в том числе российской) селекции находятся на разных ветвях “дерева”, что соответствует гипоте-

зе, предложенной в работе [5], о высокой внутри и межсортовой варибельности белков РКPI. Действительно, замены в нуклеотидных последовательностях могут приводить к полиморфизму аллелей одного и того же генного локуса в геноме тетраплоидного картофеля.

На основании нуклеотидной последовательности выделенного фрагмента гена PKPIJ-B была вос-

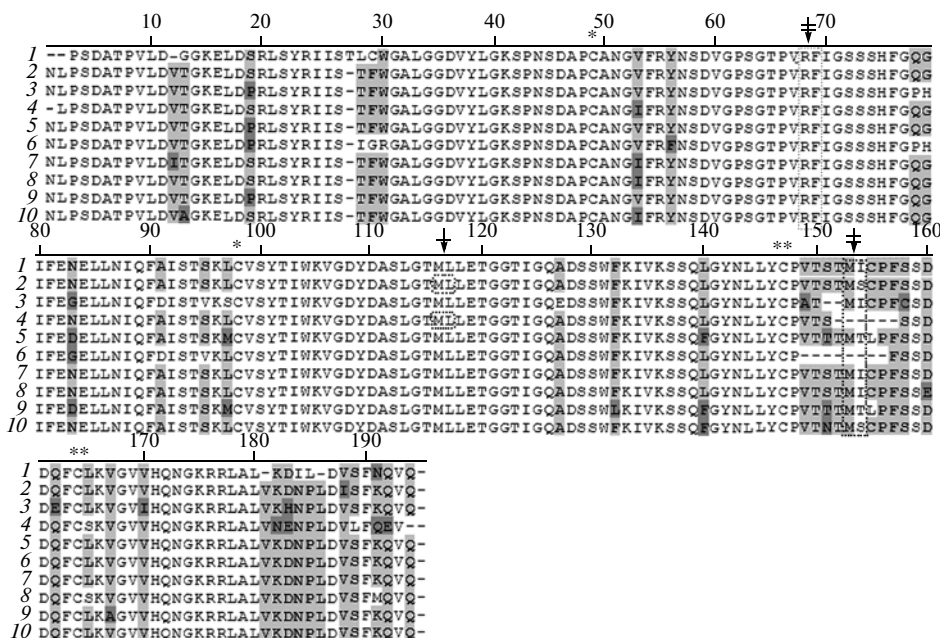


**Рис. 2.** Филогенетическое дерево генов, кодирующих белки РКРІ-В в различных сортах картофеля. Построено с использованием программы MEGA 4 по принципу максимального подобия. Числа в узлах ветвей (bootstraps) – индексы поддержки каждого узла, полученные при расчете 100-кратной повторности.

становлена аминокислотная последовательность кодируемого им белка (рис. 3). Оказалось, что последовательность первых 20 остатков полностью совпадала с N-концевой аминокислотной последовательностью белка РКСІ-23, установленной в работе [6]. Это с большой степенью вероятности указывало на то, что белок РСРІ кодируется выделенным фрагментом гена. В пользу этого свидетельствует также тот факт, что молекулярная масса белка РКРІ-В, рассчитанная из восстановленной аминокислотной последовательности, составляла 22.5 кДа и совпадала с молекулярной массой белка РКСІ-23, определенной по результатам ПААГ-электрофореза.

Итак, в геноме картофеля сорта Юбилей Жукова обнаружен и секвенирован фрагмент ДНК, который предположительно кодирует белок РКСІ-23, выделенный нами ранее из клубней и действующий как ингибитор химотрипсина и трипсина [6]. Это позволило восстановить предполагаемую полную аминокислотную последовательность этого белка.

Анализ аминокислотных последовательностей РКСІ-23 и известных белков РКРІ-В, приведенных на рис. 3, показал, что они содержат от 86.5 до 98.6% идентичных остатков (таблица), часть из которых является консервативной. Прежде всего, это два консервативных остатка цистина, образующих дисульфидные связи, соединяющие остатки Cys49–Cys98 и Cys147–Cys164, первая из которых формирует большую пептидную петлю в N-концевой части молекулы, а вторая – малую в ее С-концевой части. Следует отметить, что в последовательности белков, кодируемых генами *PKPI-B9*, *kPi B-k2*, *P4D11*, *SIC1*, а также белка РКСІ-23, в положении 155 присутствует только остаток цистеина, в то время как в молекуле белка, кодируемого геном *PKPI-B10*, – третья дополнительная дисульфидная связь между остатками Cys155–Cys158. Несмотря на высокое сходство первичных структур, рассматриваемые белки различаются по специфичности действия на химотрипсин и трипсин. Так, белок PSPI-21-6.3, который кодируется геном *PKPI-B9*, эффективно подавлял активность эластазы из лейкоцитов человека и значительно сла-



**Рис. 3.** Сравнение аминокислотной последовательности белков РКРІ-В из различных сортов картофеля. 1 – РКСІ-23 (данная работа), 2 – PSPI-6.3 [12], 3 – PKTI-22 [13], 4 – PSPI-21-5.2 [12], 5 – P1H5 [5], 6 – gCDI-B1 [2], 7 – KPi B-k2 [11], 8 – P4D11 [5], 9 – PI-2 [9], 10 – SIC1 [5]. Последовательности 1, 3, 5–10 восстановлены по последовательностям кодирующих их генов. Аминокислотные остатки, идентичные во всех последовательностях, не окрашены, а различающиеся обозначены серым цветом. Реактивные центры указаны стрелками, дисульфидные связи (Cys49–Cys98 и Cys147–Cys164) обозначены звездочками.

бее трипсина и химотрипсина [12]. Такой же специфичностью действия на протеиназы характеризуется белок PSPI-21-5.2, который кодируется гибридным геном, содержащим на 3'-участке фрагмент гена *PKPI-B9*, а на 5'-участке – *PKPI-A6* [12]. Белок РКТИ-22, кодируемый геном *PKPI-B10*, является специфическим ингибитором трипсина [13], а белки РКСИ-23 и P1H5 с одинаковой эффективностью действуют на химотрипсин и трипсин [6, 14].

Все белки, аминокислотные последовательности которых представлены на рис. 3, являются ингибиторами трипсина и взаимодействуют с ферментом по “каноническому” субстратоподобному механизму. В последовательности каждого из них присутствуют консервативные остатки Arg68-Phe69, расположенные в большой пептидной петле. Показано, что они входят в состав реактивного трипсин-связывающего центра ингибиторов [12]. Участок аминокислотной последовательности, окружающий эти остатки, идентичен в структуре всех указанных белков, а в пространственной организации их молекул создаются условия для образования “канонической петли” связывания трипсина.

На участке последовательностей, локализованном вне пептидных петель, который практически также идентичен у всех рассматриваемых белков, расположены консервативные остатки Met116-Leu117. В работе [12] было показано, что белки PSPI-21-5.2 и PSPI-21-6.3 подвергаются посттрансляционному протеолизу по пептидным связям Ser151-Thr152 и Phe157-Ser158 с образованием двухцепочечных молекул. Было установлено, что остатки Met116-Leu117 входят в состав химотрипсинсвязывающего реактивного центра, расположенного в пептидной петле, формирующейся между полипептидными цепями, соединенными дисульфидной связью Cys147–Cys164. Однако молекулы других белков, структуры которых приведены на рис. 3, состоят из одной полипептидной цепи и в них не может сформироваться “каноническая петля” между остатками Ser100-Leu145. В то же время часть из них, а именно белки РСPI, P1H5, Кри В-k2, P4D11, PI-2 и S1C1, достаточно эффективно подавляют активность химотрипсина [6, 11, 14]. Вы сказано предположение, что остаток Met153 может входить в состав реактивного химотрипсинсвязывающего центра, локализованного в “канонической петле”, образующейся между остатками Cys147–Cys164 [14]. Однако в аминокислотной последовательности белка gCDI-B1 в результате делеции в нуклеотидной последовательности кодирующей его ДНК отсутствует остаток Met153. В молекуле белка РКТИ-22 также существуют препятствия для образования “канонической” петли связывания химотрипсина, поскольку между остатками Cys147–Cys164 расположена еще одна дисульфидная связь Cys155–Cys158. И, действительно, белок gCDI-B1 не действует на химотрипсин [2], а белок

РКТИ-22 очень слабо подавляет активность этого фермента [13].

Таким образом, отсутствие или присутствие определенных аминокислотных остатков в первичной структуре определяет специфичность действия ингибиторов РКPI. Высокая изменчивость в последовательностях белков РКPI-B на участке, расположенном между остатками Cys147 и Cys164, согласуется с данными об их высокой функциональной значимости для молекулы ингибитора [11]. Можно предположить, что образование замен, расположенных на этом участке, происходит в результате независимых мутаций. Вполне вероятно, что полиморфизм генов *PKPI-B* является следствием адаптивной эволюции, направленной на защиту растений от фитопатогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей. Большой набор вариантов генов белков-ингибиторов способен привести к экспрессии их новых изоформ, которые позволяют противостоять адаптации фитопатогенов к ингибиторам.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lisinska G., Leszczynski W.* Potato Science and Technology. London: Elsevier Applied Science, 1989. 391 p.
2. *Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K.* // Plant Cell Physiol. 1994. Т. 35. № 2. P. 303–312.
3. *Valueva T.A., Revina T.A., Kladnitskaya G.V., Mosolov V.V.* // FEBS Lett. 1998. V. 426. № 1. P. 131–134.
4. *Валуева Т.А., Мосолов В.В.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1600–1606.
5. *Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C.* // Mol. Gen. Genomics. 2003. V. 269. № 4. P. 526–534.
6. *Ревина Т.А., Парфенов И.А., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 265–271.
7. *Barrett A. J., Rawlings N. D., O'Brien E. A.* // J. Struct. Biol. 2001. V. 134. № 2–3. P. 95–102.
8. *Ежова Т.А., Солдатова О.П., Пенин А.А., Шестаков С.В.* Молекулярно-генетическое картирование генома растений. М.: МАКС Пресс, 2002. 70 с.
9. *Pouvreau L., Gruppen H., van Koningsveld G.A., van den Broek L.A.M., Voragen A.G.J.* // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 17. P. 5001–5005.
10. *Сперанская А.С., Крилицына А.А., Полтроньеры П., Фазано Л., Сантино А., Шевелев А.Б., Валуева Т.А.* // Биохимия. 2005. Т. 70. № 3. С. 360–369.
11. *Bauw G., Nielsen H.V., Emmersen J., Nielsen K.L., Jorgensen M., Welinder K.G.* // FEBS J. 2006. V. 273. № 15. P. 3569–3584.
12. *Valueva T.A., Revina T.A., Mosolov V.V., Mentele R.* // Biol. Chem. 2000. V. 381. № 12. P. 1215–1221.
13. *Ревина Т.А., Кладницкая Г.В., Герасимова Н.Г., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А.* // Биохимия. 2010. Т. 75. № 1. С. 46–51.
14. *Heibges A., Salamini F., Gebhardt C.* // Mol. Gen. Genom. 2003. V. 269. № 4. P. 535–541.

## Fragment of the Gene Encoding Chymotrypsin and Trypsin Inhibitor Protein of Potato Tubers

I. A. Parfenov<sup>a</sup>, T. A. Revina<sup>a</sup>, P. P. Pashkovsky<sup>b</sup>, N. L. Radyukina<sup>b</sup>, and T. A. Valueva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup> *Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia*

*e-mail: valueva@inbi.ras.ru*

Received November 15, 2010

**Abstract**—Product of polymerase chain reaction designated as *PKPIJ-B* was isolated after amplification from genomic DNA of potato (*Solanum tuberosum* L., Zhukov Jubilee cultivar) using the designed primers. Nucleotide sequence of *PKPIJ-B* was determined and amino acid sequence of protein was restored. Analysis of this sequence has allowed us to suggest that isolated gene fragment encodes chymotrypsin and trypsin inhibitor protein (PKCI-23 potato Kunitz-type chymotrypsin inhibitor) of potato tubers.

UDC 547.96:576.8

## OVER-EXPRESSION, PURIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF *Celosia* ClpS AS A FUSED PROTEIN IN *Escherichia coli*

© 2011 A. Gholizadeh

Department of Molecular Biology, Research Institute for Fundamental Sciences (RIFS),  
University of Tabriz, Tabriz, Iran  
e-mail: aghz\_bioch@yahoo.co.in

Received November 16, 2010

A ClpS homologue from *Celosia cristata* was expressed as maltose-binding fusion protein under the control of strong inducible *tac* promoter of pMALc2X vector in TB1 strain of *Escherichia coli*. SDS-PAGE analysis showed that fused ClpS is produced as about 63 kDa protein in recombinant bacteria. Expressed product was purified to homogeneity with a yield of about 31 mg/l of bacterial culture. The results indicated that heterologous expression of *Celosia* ClpS does not affect bacterial growth under different induced conditions. Total cellular antioxidant assessment results revealed that the induction of ClpS activates the bacterial antioxidative system. Since, the purified ClpS did not exhibit antioxidant activity in vitro, we speculated a functional correlation between bacterial proteolytic apparatus and its anti-oxidative system. This prediction may contribute to our better understanding of functional relationship between proteolytic and antioxidative systems in biological worlds in the future investigations.

In all living organisms, proteolysis is known as a major post-translational regulatory mechanism that is not only required for the quality control of proteins but also for the important regulatory cellular processes such as timing of the cell division cycle, heat shock response, different stress responses, adaptations to nutritional alterations, cell signaling mechanisms and developmental processes particularly in which programmed cell death is involved [1, 2]. The proteolytic machinery has been known to be carried out by several ATP-dependent protease-chaperone pairs that often belong to Clp (caseinolytic protease) protein family in all organisms investigated hitherto. Clp are serine proteases that are generally composed of an endopeptidase containing a protease domain and unfoldase containing the ATPase/chaperone domain [3, 4]. Protein degradation process in the cytosol of *Escherichia coli* is carried out by at least three ATP-dependent Clp known as ClpAP, ClpXP and ClpYQ in which Clp P and Y are endopeptidase, while Clp A, X and Q act as chaperones [5–8].

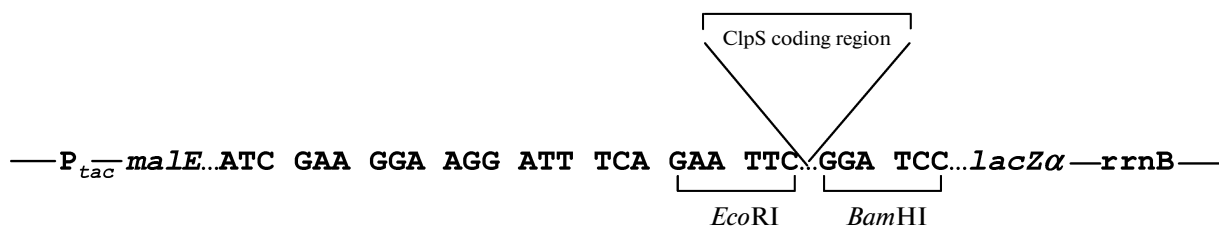
ClpS is a newly identified component of *E. coli* proteolytic system. It acts as a substrate modulator of the ClpAP machine through the binding to the N-terminal domain of the chaperone ClpA [9]. The crystal structure of ClpS in complex with the isolated N-terminal domain of ClpA in two different crystal forms at 2.3–3.3 Å has been identified in *E. coli* cells [10]. It has been very recently reported that ClpS binds directly to N-terminal destabilizing residues of target proteins through its substrate binding site distal to the ClpS–ClpA interface and mediates the N-end rule pathway in *E. coli* [11].

In compare to bacteria, there is limited information concerning the structures and mechanisms of function of proteolytic apparatus in plants. Clp-dependent protein

degradation process in *Arabidopsis thaliana* is predicted to be performed by a single 350 kDa core complex, ClpP/R, in which ClpP is an endonuclease and ClpR is a regulator component [12]. After genome sequencing and annotation projects in plants, cyanobacterial-homologues of ClpS gene had been identified [13, 14]. For the first time, we reported the presence of an actinobacterial-type ClpS gene in *Celosia cristata* [15]. But how these ClpS interact with proteolytic system is still remained obscure in planta.

Stimulation of cellular redox system and production of oxidative compounds is one of the common cellular reactions in response to various environmental changes. This phenomenon is called as “oxidave burst” that is mostly leads to death of the cells [16]. To better cope with the environmental stimuli and inhibition of cell death, oxidative burst is often modulated by cellular antioxidative system [17, 18]

In the present research, the activation of cellular antioxidative system following the activation of proteolytic apparatus was predicted. To test this idea, an over-producing construct for the production of *Celosia* ClpS was generated in *E. coli* cells and the effect of its induction on the growth of recombinant bacteria and their antioxidative status were experimented. As the results of this research work, the molecular cloning, successful expression and purification of *C. cristata* ClpS in *E. coli* as a part of maltose-binding fusion protein and its effect on the activation of antioxidation system in recombinant bacteria are reported for the first time.



**Fig. 1.** The cloned map of the ClpS gene on pMALc2X expression vector. *EcoRI* and *BamHI* digested ClpS coding region from *Celosia* plant was inserted, with its correct reading frame, downstream of *malE* gene of *E. coli* and resulted in an MBP-ClpS fusion gene.

## MATERIAL AND METHODS

**Materials.** *Celosia cristata* seeds were obtained from the division of Biochemistry, IARI (New Delhi, India) and grown in growth house conditions. *E. coli* strain TB1 and pMALc2X vector for bacterial transformation, recombinant vector construction and protein expression system kit (New England Biolabs, UK). Plasmid vector pGEM-T easy (Promega, USA). *Taq* DNA polymerase, buffer, dNTPs, and MgCl<sub>2</sub> were used for polymerase chain reactions (PCR) amplification (CinnaGen, Iran). DNA Extraction Kit (Fermentas, UK) was used for the purification of the PCR product from the agarose gel. Restriction enzymes *EcoRI* and *BamHI* were used in cloning procedure (CinnaGen, Iran). All of the other chemicals used in this research work were of molecular biology grade.

**Cloning of *Celosia* ClpS cDNA.** Cloning of *Celosia* ClpS cDNA was carried out by standard PCR using the specific primers designed based on the ClpS cDNA sequence reported in our previous work [15]. The 30 base pairs synthetic primer sequences were:

right primer:

5'ATACGAATTCATGGCCGGAGCAGGATATAG3';

left primer:

5'ACTAACGGATCCGTGTCCAGCTGCAGGGTTC3'.

To do the directional cloning of the PCR-amplified fragment in *E. coli* expression vector, *EcoRI* and *BamHI* restriction sites were included at the 5' end of each primer. The cDNA sequence was amplified from *Celosia* complete leaf cDNA library constructed on λTriplex2 vector as described already [15].

PCR reaction was carried out in a reaction volume of 20 μl containing 5x PCR buffer, 5 ng template DNA, 1 pmol of each primer, 10 mM dNTP mix, 2 units *Taq* DNA polymerase. Amplification was performed in Techne type thermal cycler (Germany), with 25 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 2 min annealing at 57°C, and 2 min of extension at 72°C, ending with 10 min of incubation at 72°C. The amplified product was analyzed on 1% agarose gel using Tris-borate-EDTA (TBE) running buffer and sliced from gel, ligated into pGEM-T easy vector and transformed into DH5α *E. coli* cells. The positive re-

combinant clones were selected by blue-white screening method [19]. Plasmid DNA was then purified from recombinant bacterial cells [20] and proceeded for DNA sequencing at New Delhi University (South campus, India).

**Expression of ClpS gene as fused product.** The PCR amplification product after agarose gel purification step was digested with *EcoRI* and *BamHI* restriction enzymes, run on 1% agarose gel, extracted and purified from gel and ligated into the pMALc2X expression vector which had already been linearized at the *EcoRI* and *BamHI* sites within the multiple cloning region (Fig. 1). The ligation mixture was transferred into competent *E. coli* TB1 cells. For preparation of competent cells, the cells were grown in LB media when the OD<sub>600</sub> reached to 0.4, they were kept in ice for 15 min, centrifuged at 3500 g for 10 min at 4°C and washed with 10 ml of 100 mM CaCl<sub>2</sub>. Then after, they were centrifuged at 5000 g for 10 min, resuspended in 2 ml of chilled 50 mM CaCl<sub>2</sub> and kept in ice for 12 h. For transformation of bacterial cells, the ligation reaction was mixed with 25 μl competent cells, incubated on ice for 5 min, heated to 42°C for 2 min and after addition of 0.1 ml LB medium, it was incubated at 37°C for 20 min. The transformed cells were plated on LB medium (supplemented with Amp and X-gal) at 37°C and a recombinant clone was selected for gene expression studies.

### Extraction and purification of expressed fusion protein.

To extract the fusion protein, transformed cells were grown in 500 ml of rich broth/ glucose/Amp. For the induction of fused protein expression, the inducer molecule isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.3 mM and incubated for 8 h. The cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 10 min and the pellet was dissolved in 25 ml of extraction buffer containing 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM azide and 10 mM BME. The cells were frozen in the same buffer at -20°C over night and were then sonicated in short pulses of 15 s. Sample was centrifuged at 10000 g at 4°C for 20 min and the supernatant used as crude extract.

The fusion protein was purified from the crude extract by affinity column chromatography. It was done in a column packed with amylose resin specific for the maltose-binding protein (MBP), which was a part of fused protein.

<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	GGGCGCGCCGCGGCTCGGTCGCGGGCGTTCGGGGCTTCGCGCCGCGGGCAGCCGAGACGGTT -----
<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	CATAGGGGGCGGCTCGGCGGGGCGATGGCCGGAGCAGGATATAGGCCCTCCAACGGGTGCC -----ATGGCCGGAGCAGGATATAGGCCCTCCAACGGGTGCC
<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	TACAAAGCCGGGCGCGGTTCGCGGGCGGGCGCGGAGCGAGCGAGACTGGAT TACAAAGCCGGGCGCGGTTCGCGGGCGGGCGCGGAGCGAGCGAGACTGGAT
<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	CCGTGAGTCCGCACGCCTCGTCGCCCGCGCCCGTCGAGGTCGACCGGCCGACGGGTGAGG CCGTGAGTCCGCACGCCTCGTCGCCCGCGCCCGTCGAGGTCGACCGGCCGACGGGTGAGG
<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	AGGTGGTCGAGCCGACCGGCCGTCGATCGTCCTGGTCTGGAACGACCCCATCAACCTCA AGGTGGTCGAGCCGACCGGCCGTCGATCGTCCTGGTCTGGAACGACCCCATCAACCTCA
<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	TGTCGTACGTCTGTTCGTCTTCCAGAAGCTCTTCGGGTACAGCCGCGAGAAGGCCACCT TGTCGTACGTCTGTTCGTCTTCCAGAAGCTCTTCGGGTACAGCCGCGAGAAGGCCACCT
<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	CGCTCATGCTCGACGTCCATCACAAGGGGGCGGGCGGTTCGTGTCGAGCGGGACGCGCGAGA CGCTCATGCTCGACGTCCATCACAAGGGGGCGGGCGGTTCGTGTCGAGCGGGACGCGCGAGA
<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	AGGCCGAGCTCGACGTGTTCCGCCGTCACGAGCAGGACTGTGGGCGACCTGCAGCTGG AGGCCGAGCTCGACGTGTTCCGCCGTCACGAGCAGGACTGTGGGCGACCTGCAGCTGG
<i>Celosia</i> ClpS/ Amplified cDNA/	ACACGTGAGCCTGCGCAGGCGGGTTCGCCGCAACCGACGGGGCCAGTTCGAGCTGCTGCT ACACGG-----

Fig. 2. Nucleotide sequence alignment between amplified cDNA and *Celosia* ClpS.

The fusion protein was eluted out from the column with column buffer (extraction buffer plus 10 mM maltose). The eluted product was analyzed for its homogeneity by SDS-PAGE electrophoresis using 10% polyacrylamide gel [21].

**Assessment of recombinant bacterial growth.** In order to find out the effects of expressed fused product on the growth of recombinant bacteria, the cells were separately induced at different concentrations of IPTG (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) and the growth of bacteria was assessed by measuring the optical densities of the cultures at 600 nm for 1 h time intervals. Bacterial growth curves were drawn for each induced test culture and compared to each other as well as to control non-induced culture.

**Antioxidant activity test.** The total antioxidant activity of the bacterial cells was determined using ferric reducing antioxidant power (FRAP) test [22]. To 1 ml of bacterial cell culture, 3 ml of FRAP reagent was added and the reaction mixture was incubated at 37°C for 4 min. The assessment was carried out spectrophotometrically at  $A_{593}$ . Antioxidant potential of samples was determined against the standard curve of ferrous sulphate ( $\text{Fe}^{2+}$ , 100–1000  $\mu\text{M}$ ). Ascorbic acid (100  $\mu\text{M}$ ) served as a standard antioxidant and BSA considered as negative control. FRAP values were calculated as follows: FRAP value ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ ml}^{-1}$ ) =  $A_{593}$  of test sample /  $A_{593}$  of standard  $\times$  FRAP value ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ ml}^{-1}$ ) of standard. Three experimental samples including non-recombinant, recombinant induced and non-induced were considered for test assay. The antioxidative FRAP test was similarly repeated for the purified fused ClpS in vitro and compared to those of ascorbic acid and BSA. All of the samples were ana-

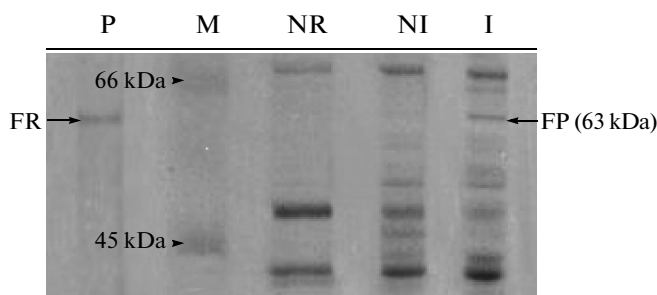
lyzed in triplicate and the data were presented as mean values.

## RESULTS

**Cloning of *Celosia* ClpS cDNA.** In the present research, *Celosia* ClpS was amplified by PCR using *Celosia* leaf cDNA library as template and a pair of specifically designed primers which created *Eco*RI and *Bam*HI restriction endonuclease recognition sequences at 5' and 3' ends of the ClpS coding region (Fig. 1). The amplification product was purified from agarose gel and was then cloned into pGEM-T easy vector for sequencing. Analysis of the sequence data confirmed that the amplified cDNA is completely identical to the already reported ClpS sequence from *Celosia* plant. The results of homology search between the nucleotide sequences of the PCR amplified cDNA and *Celosia* ClpS gene by CLASTAW (<http://www.genome.ad.jp>) has been demonstrated (Fig 2). The amplified ClpS cDNA was used for the expression studies in *E. coli* cells.

**Expression of amplified ClpS in *E. coli* cells.** *Celosia* ClpS coding region on pGEM-Teasy vector was restricted with *Eco*RI and *Bam*HI enzymes and was then cloned into *Eco*RI and *Bam*HI sites within the multiple cloning region of pMALc2X *E. coli* expression vector as shown in Fig. 1. Transformed TB1 cells harboring the recombinant plasmid were allowed to grow under the induced condition using 0.3 mM IPTG as inducer molecule. Total crude proteins of non-recombinant, recombinant induced and non-induced cultures were separately isolated and separated on 10% polyacrylamide gel by SDS-PAGE electrophoresis (Fig. 3). Analysis of the gel revealed that *Celosia*



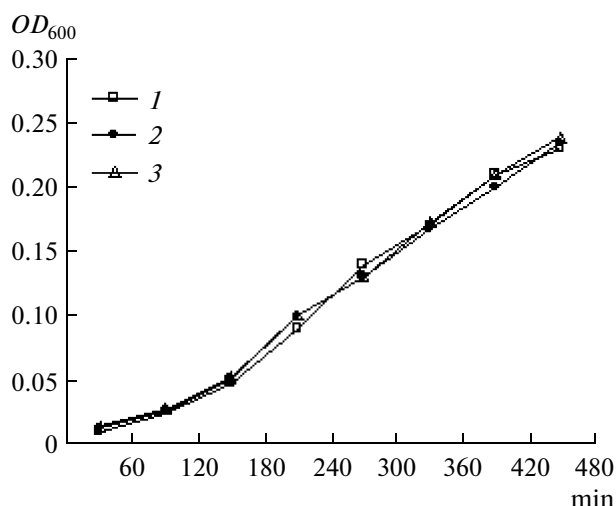


**Fig. 3.** SDS-PAGE analysis of the fused product expression. I – induced recombinant fused sample; NI – non-induced recombinant fused sample; NR – non-recombinant/non-fused sample; M – Sigma protein low molecular weight marker and P – purified fused protein (FP). The gel was stained with comassie brilliant blue dye.

ClpS protein is expressed as a part of maltose-binding protein fused product with a molecular weight of about 63 kDa (Fig. 3). As it has been shown in the photograph, this expressed product is not observed in non-recombinant or non-induced lines. The expressed product was purified to homogeneity by maltose binding affinity chromatography at the yield of 31 mg/l of induced bacterial culture. The purified protein sample was also analyzed by SDS-PAGE and compared with crude sample as shown in Fig. 3.

**Effect of plant ClpS induction on bacterial growth.** In order to determine the effect of inducer dosage on the growth of recombinant bacteria, an experiment was performed in which IPTG concentration was varied from 0.1 to 1.0 mM. Data corresponding to minimum (0.1 mM) and maximum (1 mM) concentrations of IPTG were presented on the graph (Fig. 4). Each test was carried out in two replicates and the results were presented as mean values. The growth of bacteria was spectrophotometrically assessed by measuring the  $OD_{600}$  values of each test culture at 1 h time intervals for overall 8 h time period. The growth curve of bacteria in each induced culture was also separately compared to non-induced control culture (data not shown). In overall, the growth curve of the cells exposed to IPTG induction not significantly differs from the curve obtained for non-induced culture. The results showed that increasing concentrations of inducer molecule have no inhibitory effects on bacterial cell growth. Recombinant bacteria exposed to different concentrations of IPTG exhibit the similar pattern in their growth curves. The  $OD_{600}$  values obtained for each comparable time points show no statistically different data ( $P \leq 0.05$ ).

**Changes in antioxidant status of recombinant cells.** Antioxidant ability of the recombinant cells carrying fused ClpS was determined by FRAP method as described in materials and methods section. The FRAP values were calculated to be 0.085, 0.12 and 0.09  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ ml}^{-1}$  for non-recombinant (cells carrying MBP vector alone/non fused vector), recombinant (cells carrying MBP-ClpS



**Fig. 4.** Effect of IPTG dosage on bacterial growth: 1 – non-induced cells; 2 – induced with 0.1 mM of IPTG; 3 – induced with 1.0 mM of IPTG. The growth of recombinant bacterial cells were evaluated by measuring the  $OD_{600}$  values of the test cultures at 1 h time intervals for overall experimental period of 8 h.

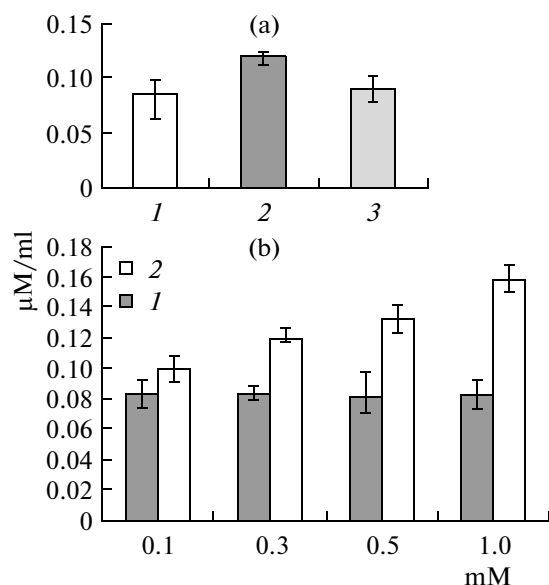
vector/fused vector) induced (with 0.3 mM IPTG) and non-induced cultures, respectively (Fig. 5). As the results show, there is a significant difference between the recombinant induced sample and non-recombinant culture or between the induced and non-induced cultures in terms of their FRAP values. The values between the non-recombinant and non-induced samples are not statistically different ( $P \leq 0.1$ ).

The antioxidant status of the recombinant cells exposed to different concentrations of IPTG (0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM) were similarly assessed by FRAP test. The results showed that the total antioxidant capacity of the cells is increased with increasing concentrations of IPTG (Fig. 5b). The FRAP value of the induced culture reaches up to 0.16 at 1 mM IPTG used. Data revealed that the total antioxidant ability of the non-recombinant bacterial cells is remained constant at different dosages of IPTG used.

FRAP test assay was also performed to identify the antioxidant activity of the purified fused ClpS in vitro. In compare to antioxidant activity of 100  $\mu\text{M}$  ascorbic acid ( $114.8 \mu\text{mol ml}^{-1}$ ), the 100  $\mu\text{M}$  of purified fused ClpS did not show antioxidant activity in vitro.

## DISCUSSION

**Cloning and expression of Celosia ClpS cDNA in *E. coli*.** In our previous work, a complete ClpS cDNA clone was randomly isolated from *C. cristata* leaf expression library constructed on the  $\lambda$ TriplEX2 vector at the vegetative growth stage. Sequence data analysis showed that *Celosia* ClpS is highly identical to the corresponding proteins from actinobacteria [15]. Therefore, it was for the first



**Fig. 5.** Assessment of antioxidant activity.

(a) The antioxidant capacity of the recombinant induced cells were analysed in terms of  $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{ml}$  cell culture at three different cellular conditions: 1 – induced nonfused; 2 – induced fused and 3 – non-induced fused cells.

(b) Antioxidant ability of the recombinant (cells carrying fused MBP-ClpS vector, 1) and non-recombinant cells (cells carrying MBP vector alone/non fused vector, 2) were compared with increasing concentrations of IPTG.

time speculated on the presence in the plant system of two more distant homologues of ClpS proteins (including cyanobacterial and actinobacterial types), as had been already detected in bacteria [23]. In the present research, *Celosia* ClpS coding region was specifically amplified from *Celosia* leaf cDNA library taken from laboratory stock (Fig. 2). The amplification product was attempted to be expressed in *E. coli* cells.

Although, ClpS protein is a new component of the proteolytic machine that has been partially characterized in *E. coli*, but still now, very limited information is available concerning its structures and functions in eukaryotic system.

As a part of our functional studies, *Celosia* ClpS coding region was cloned into pMALc2X *E. coli* expression vector in which the strong “*tac*” promoter and “*male*” translation initiation signals are used to give high-level expression of cloned sequences under induction with IPTG [24, 25].

SDS-PAGE analysis revealed that ClpS protein is expressed as a part of maltose-binding protein fused product with a molecular weight of about 63 kDa, consisting of MBP (42.482 kDa), the product of 132 amino acid residues of ClpS cDNA and six amino acid residues derived from the expression vector (Fig. 3). The expressed product was purified to homogeneity using one step purifica-

tion method by MBP affinity chromatography at the yield of 31 mg per liter of bacterial culture [26].

This purification yield indicates that *Celosia* ClpS is highly expressed in bacterial cells and it may have no toxic effects on *E. coli* cells. Despite this, whether *Celosia* fused ClpS is expressed as an active product in bacterial cells still needs to be investigated in future.

This work for the first time describes the heterologous expression of a ClpS gene from plant origin in bacterial cells, successfully. Thus far, there has been no reports concerning the corresponding recombinant or fused products in the literatures. As plants lack ClpA molecular chaperon to interact with their ClpS component, therefore it was already speculated that plant cyanobacterial-type ClpS proteins may interact with ClpC, known as a functional homologue of ClpA in plant system [9]. Newly, after finding an actinobacterial-type ClpS gene in *Celosia* plant, the presence of a different type of molecular chaperon or a novel target of ATP-dependent Clp protease has been predicted in plants [15]. Considering the successful production of plant actinobacterial-type ClpS in *E. coli* cells, its possible cooperation with *E. coli* ClpA chaperon is speculated in recombinant bacteria.

**Effect of induction on bacterial growth and cellular antioxidant status.** Our experimental results revealed that there is no significant difference between the growth patterns of bacteria exposed to minimum (0.1 mM) and maximum (1 mM) dosages of IPTG used (Fig. 4). The results also showed that the growth curve for cells exposed to IPTG induction not measurably differs from the curve obtained for non-induced culture. Therefore, it may be deduced that differentially expressed amount of plant ClpS fusion protein has no inhibitory effects on recombinant bacterial cell growth. But how *Celosia* ClpS function in bacterial cells, needs to be investigated.

One of the common responses of the cells to their environmental changes is the excessive formation of reactive oxygen species (ROS) that is normally balanced with the cellular antioxidative system to adapt the cells to the new conditions/environments [17, 18].

Based on this view, we predicted possible changes in the total antioxidative status of the recombinant induced cells carrying plant ClpS as a component of plant Clp-dependent proteolytic system. In biological cells, proteolysis and antioxidation processes are known as the natural targets of cell death phenomenon. In general, proteolysis elevations activate cell death metabolic pathways while the antioxidative lightening inhibits cell death. We predicted that cellular proteolytic and antioxidation systems may be functionally balanced in such a way that capable of preventing cell death process. Therefore, heterologous over-production of a proteolytic component predicted to activate the antioxidation pathways in recombinant cells.

In order to test the antioxidant capacity of the recombinant bacterial cells over-producing fused plant ClpS, FRAP method was used. It is known as a simplest and re-

producibile method for the assessment of total antioxidant abilities of various biological systems [22].

The results indicated that during the induction period, the total antioxidative status of the recombinant cells (cells carrying MBP-ClpS fused vector) is increased as compared to non-recombinant cells (cells carrying MBP vector alone /non fused vector), suggesting that MBP might not be involved in cellular antioxidative response (Fig. 5). The antioxidant capacity of the induced recombinant cells was also found to be increased with the increasing concentrations of the inducer molecule.

This result may have two explanations. Firstly, antioxidative response can be as a result of over-production of every fused protein in induced *E. coli* cells and therefore it can be considered as a generalized response to genetic recombination process. Secondly, the antioxidative changes may be due to the specific activity or the particular molecular interactions of the expressed fused ClpS in recombinant cells. So, it can be considered as a specialized response to plant ClpS production and function in bacterial cells. We suggest a functional balancing between bacterial proteolytic and antioxidation processes leads to cell death inhibition and so results in the normal growth of the recombinant cells upon induction. As the purified fused ClpS did not show the antioxidant activity in vitro, it is reliably predicted that the changes in the antioxidative status of the induced recombinant cells is a indirect metabolic adaptation process to cope with heterologous plant ClpS activity/challenges in *E. coli* cells.

Despite these, more attempts will be needed to identify the molecular interactions of the expressed ClpS fused product in recombinant *E. coli* cells. More investigations also needed to find out the possible relations / interactive events between the proteolytic and antioxidative systems of the recombinant cells.

– *Celosia* ClpS can be successfully expressed as maltose-binding fused product in *E. coli* cells. It can be over-produced at different concentrations of IPTG inducer molecule in bacterial cells without affecting their normal growth. This will provide a successful way for future studies on molecular interactions of the fused ClpS in recombinant bacteria. The possible cooperation of fused *Celosia* plant ClpS with *E. coli* ClpA molecular chaperon is speculated.

– Over-expression of fused ClpS in *E. coli* cells leads to the significant increase in total antioxidant status of the induced cells.

– Further research on the mechanism of how fused ClpS changes the total antioxidative ability of the bacterial cells is recommended. It has to be finding out: (1) whether the antioxidative response is a generalized action that is commonly depended on genetic recombination process in *E. coli* cells; (2) whether the antioxidative changes in induced cells is a specialized response that is particularly depended on ClpS overproduction and activity in *E. coli* cells.

– We speculate that the alterations in the total cellular antioxidative ability can be an indirect metabolic adaptation process in response to heterologous production of ClpS or its activity in recombinant induced cells. Our future attempt is to find out the functionality of the fused plant ClpS in *E. coli* cells and to investigate its possible molecular interactions with *E. coli* proteolytic and antioxidative systems.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors of this paper are thankful the Research Institute for Fundamental Sciences (RIFS), University of Tabriz, Iran and Indian Agricultural Research Institute (IARI), New Delhi, India for their financial support of this work.

## REFERENCES

1. Gottesman, S., *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, vol. 2, pp. 142–147.
2. Wickner, S., Maurizi, M.R., and Gottesman, S., *Science*, 1999, vol. 286, pp. 1888–1893.
3. Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S., and Maurizi, M.R.A., *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, pp. 4477–4485.
4. Gottesman, S., *Annu. Rev. Genet.*, 1996, vol. 30, pp. 465–506.
5. Porankiewicz, J., Wang, J.M., and Clarke, A.K., *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 32, pp. 449–458.
6. Schmidt, M., Lupas, A.N., and Finley, D., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, vol. 3, pp. 584–591.
7. Sousa, M.C., Trame, C.B., Tsuruta, H., Wilbanks, S.M., Reddy, V.S., and McKay D.B., *Cell*, 2000, vol. 103, pp. 633–643.
8. Bochtler, M., Hartmann, C., Song, H.K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., and Huber, R., *Nature*, 2000, vol. 403, pp. 800–805.
9. Dougan, D.A., Reid, B.G., Horwich, A.L., and Bukau, B., *Mol. Cell*, 2002, vol. 9, pp. 673–683.
10. Guo, F., Esser, L., Singh, S.K., Maurizi, M.R., and Xia, D., *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 46753–46762.
11. Erbse, R.S., Bornemann, T., Mergene, J.S., Mogk, A., Zahn, R., Dougan, D.A., and Bukau, B., *Nature*, 2006, vol. 439, pp. 753–756.
12. Peltier, J.B., Ytterberg, J., Liberles, D.A., Roepstorff, P., and Wijk, K.J.V., *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, pp. 16318–16327.
13. Peltier, J.B., Ripoll, D.R., Friso, G., Rudella, A., Cai, Y., Ytterberg, J., Giacomelli, L., Pillardy, J., and Wijk, K.J.V., *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 279, pp. 4768–4781.
14. Clarke, K., MacDonald, T.M., and Sjögren, L.L.E., *Physiol. Plant.*, 2005, vol. 123, pp. 406–412.
15. Gholizadeh, A., Faizi, M.H., and Baghban Kohnehrouz, B., *Russ. J. Plant. Physiol.*, 2008, vol. 55, pp. 521–529.
16. Schwarzländer, M., Fricker, M.D., Marty, L., Brach, T., Novak, J., Sweetlove, L.J., and Meyer, A.J., *J. Microscopy*, 2008, vol. 231, pp. 299–316.

17. Adam, L., Bestwick, B., Barna, B., and Mansfield, J.W., *Planta*, 1995, vol. 197, pp. 240–249.
18. Bestwick, S., Adam, A.L., Puri, N., and Mansfield, J.W., *Plant Sci.*, 2001, vol. 161, pp. 497–506.
19. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seiolman, J.G., Smith, J.A., and Struhi, R., *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: John Wiley and Sons, 1991.
20. Birnboim, H.C. and Dolly, J.A., *Nucl. Acids Res.*, 1979, vol. 7, pp. 1513–1515.
21. Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
22. Benzie, F.F. and Strain, J.J., *Anal. Biochem.*, 1996, vol. 239, pp. 70–76.
23. Lupas, N. and Koretke, K.K., *J. Struct. Biol.*, 2003, vol. 141, pp. 77–83.
24. Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W., and Hofnung, M., *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, pp. 10606–10613.
25. Amann, E. and Brosius J., *Gene*, 1985, vol. 40, pp. 83–190.
26. Kellerman, O.K. and Ferenci T., *Methods Enzymol.*, vol. 90, 1982, pp. 459–463.

УДК 577.121

## АНАЭРОБНЫЙ СИНТЕЗ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli* С АКТИВИРОВАННЫМ НАД<sup>+</sup>-ВОССТАНАВЛИВАЮЩИМ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНЫМ КОМПЛЕКСОМ

© 2011 г. А. Ю. Скороходова, А. Ю. Гулевич, А. А. Моржакова, Р. С. Шакулов, В. Г. Дебабов

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, 117545

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Поступила в редакцию 24.11.2010 г.

Исследовано влияние конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих ферменты НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса, на анаэробную продукцию янтарной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*. Базовые штаммы-продуценты были получены за счет инактивации в клетках штамма *E. coli* MG1655 основных путей образования уксусной и молочной кислот, путем делеции генов *ackA*, *pta*, *poxB* и *ldhA* (SGM0.1), и дополнительного введения пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis* (SGM0.1 [pPYC]). Конститутивная экспрессия генов *aceEF-lpdA* в потомках базовых штаммов SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] была обеспечена заменой нативной регуляторной области оперона промотором P<sub>L</sub> фага лямбда. Молярные выходы янтарной кислоты при анаэробном сбраживании глюкозы штаммами SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] превосходили соответствующие показатели контрольных штаммов на 2 и 33% в отсутствие, и на 9 и 26% в присутствии в среде иона HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Сделан вывод, что увеличение продукции янтарной кислоты штаммом SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] относительно штаммов SGM0.1 и SGM0.1 [pPYC], продуцирующих данное вещество в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот, обусловлено активацией глиоксилатного шунта.

Янтарная кислота, традиционно получаемая из продуктов нефтепереработки, широко используется как ключевой предшественник в крупнотоннажном синтезе целого ряда промышленно значимых соединений. В связи с ограниченностью природных запасов нефти и газа, возможность эффективной продукции янтарной кислоты из возобновляемого сырья представляет особый интерес. Изученность метаболизма *Escherichia coli* и доступность генно-инженерных методов для его модификации, обусловили тот факт, что лучшие на сегодняшний день микробные продуценты янтарной кислоты были получены на основе именно данного микроорганизма [1].

Биосинтез янтарной кислоты путем фиксации CO<sub>2</sub> и образования шавелевоуксусной кислоты в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот является весьма привлекательным, однако не может быть осуществлен из-за дефицита НАДН эквивалентов, образующихся при гликолизе. Лучшие показатели анаэробной продукции янтарной кислоты при сбраживании глюкозы, достигаются в процессах биосинтеза, представляющих сочетание двух биохимических путей – восстановительной части цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта. Глиоксилатный шунт, потребляющий меньшее количество НАДН на каждую синтезируемую

молекулу янтарной кислоты, выступает в данном случае как донор “остаточных” гликолитических НАДН для формирования целевого вещества в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот.

Распределение потоков углерода между восстановительной частью цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатным шунтом обуславливается функционированием метаболического узла фосфоенолпируват – шавелевоуксусная кислота – пировиноградная кислота – ацетил-КоА. В клетках *E. coli* изменения в данной точке ветвления могут быть осуществлены различными способами.

Один из стандартных подходов к модификации функционирования данного метаболического узла заключается в инактивации пируватформиаатлиазы PflB (КФ 2.3.1.54). В результате этого создаются условия для потенциально доминирующего участия в биосинтезе янтарной кислоты восстановительной части цикла трикарбоновых кислот. Данный подход использован при конструировании таких рекомбинантных продуцентов янтарной кислоты как *E. coli* KJ060 [1], *E. coli* AFP184 [2], *E. coli* NZN111 [3] и других. Другим подходом является обеспечение в клетках целевого рекомбинанта активности гетерологичной пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1) на фоне присутствующей пируватформиаатлиазы. За счет конкурентного по отношению к пируватформиаат-

Таблица 1. Использованные штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
<b>Штаммы</b>		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
MG1655 $\Delta prc$	<i>E. coli</i> MG1655 <i>prc::\lambda attB</i>	Данная работа
SGM0.1	<i>E. coli</i> MG1655 <i>ackA-pta::\lambda attB</i> , <i>poxB::\lambda attB</i> , <i>ldhA::\lambda attB</i>	»
SGM0.1 P <sub>L</sub> - <i>aceEF-lpdA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>ackA-pta::\lambda attB</i> , <i>poxB::\lambda attB</i> , <i>ldhA::\lambda attB</i> , <i>\lambda attB</i> -P <sub>L</sub> - <i>aceEF-lpdA</i>	»
SGM0.1 [pPYC]	SGM0.1 + pPYC	»
SGM0.1 P <sub>L</sub> - <i>aceEF-lpdA</i> [pPYC]	SGM0.1 P <sub>L</sub> - <i>aceEF-lpdA</i> + pPYC	»
SGM0.1 [pMW119]	SGM0.1 + pMW119	»
SGM0.1 P <sub>L</sub> - <i>aceEF-lpdA</i> [pMW119]	SGM0.1 P <sub>L</sub> - <i>aceEF-lpdA</i> + pMW119	»
<b>Плазмиды</b>		
pMW118-( <i>\lambda attL</i> -Cm- <i>\lambda attR</i> )	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>\lambda attL</i> - <i>cat</i> - <i>\lambda attR</i> cassette	[11]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P <sub>araB</sub> - <i>\lambda gam</i> - <i>bet</i> - <i>exo</i>	[10]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P <sub>R</sub> - <i>\lambda xis</i> - <i>int</i> , <i>cIts857</i>	[12]
pMW119	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i>	GenBank AB005476.2
pPYC	pMW119 с клонированным геном пируват-карбоксилазы ( <i>pycA</i> ) из <i>B. subtilis</i>	Данная работа

лиаза карбоксилирующего действия пируваткарбоксилазы в клетке создается повышенная концентрация щавелевоуксусной кислоты, что также стимулирует биосинтез янтарной кислоты в восстановительной ветви цикла трикарбоновых кислот. Примером реализации данного подхода может быть рекомбинантный продуцент янтарной кислоты *E. coli* SBS550MG/*pyc* [4]. При конструировании штамма *E. coli* AFP111/*pyc* [5] были применены оба вышеописанных подхода.

В результате подобных модификаций окислительно-восстановительный баланс клетки не претерпевает значительных изменений, способных обеспечить восстановительную часть цикла трикарбоновых кислот недостающими для эффективного биосинтеза янтарной кислоты восстановленными эквивалентами НАДН. Однако дополнительную генерацию НАДН можно обеспечить путем конверсии пировиноградной кислоты в ацетил-КоА, под действием ферментов НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса AceEF-LpdA (КФ 1.2.4.1; 2.3.1.12; 1.8.1.4), чья активность практически не проявляется в анаэробных условиях [6] за счет сниженной экспрессии соответствующих генов. Перераспределение потоков углерода между двумя путями биосинтеза янтарной кислоты будет осуществляться при этом под действием эффекта прецизионной метаболической регуляции с отрицательной обратной связью, поскольку сама актив-

ность пируватдегидрогеназного комплекса является НАДН-репрессуемой [7, 8].

Цель работы – изучение эффекта конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих белки-компоненты НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса, на анаэробную продукцию янтарной кислоты модельными штаммами-продуцентами.

## МЕТОДИКА

**Бактериальные штаммы, плазмиды и среды.** Штамм *E. coli* K12 MG1655 (ВКПМ В-6195) был использован в качестве исходного для конструирования всех полученных в работе штаммов. Использованные в работе штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Бактерии культивировали в богатых средах LB, SOB, SOC и минимальной среде M9 [9], при необходимости с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

**Реагенты.** Использовали препараты рестриктаз и T4 ДНК-лигазы, ДНК полимеразы Taq (“Fermentas”, Литва) и Phusion (“Finnzymes”, Финляндия). Олигонуклеотиды (табл. 2) синтезировали в ЗАО “Синтол” (Россия). Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и выделяли, используя QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Компоненты питательных сред, соли и другие

Таблица 2. Использованные в работе олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность
P1	5'-catgctgagtaagtttagtactggttctgaaactgcggcgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ttactgctgctgtgcagactgaatcgcagtcagcgtgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P3	5'-cagtgcatgatgtaatacataaatgt-3'
P4	5'-atgcagcgcagttaagcaag-3'
P5	5'-catgaacaacaggttcagacttatatcgccaaaaccgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-ttacctagccagttgttttcgccagttcgatcactgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P7	5'-gtcagatgaactaaactgttaccg-3'
P8	5'-ggccatcatcgcttcgag-3'
P9	5'-tatgaaactcgccgtttatagcacaaaacagtcagcgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P10	5'-ttaaaccagttcgttcggcaggtttcgctttttctgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P11	5'-gtggcatgttaaccgttcag-3'
P12	5'-gccatcagcaggttagcg-3'
P13	5'-tatgaacgaacaatattccgattgcgtagtaatgtcgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P14	5'-ttagccgttattacgcatacctgcccaatcccggctgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P15	5'-gacgtcaccgcttttacgtg-3'
P16	5'-gctttccagtaaaaagaggttag-3'
P17	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgccc-3'
P18	5'-tattctttacctttaaaggccaatgcttcgttc-3'
P19	5'-gatcggatccacgtcatttgggaaacgttctgacattattctttacctttaaaggccaatg-3'
P20	5'-aaaactcaacgttattagatagataaggaataaccccgtcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P21	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P22	5'-gcaactaaactagaacctgc-3'
P23	5'-tgagcacgctcaacaccttc-3'
P24	5'-gacgtttctagaaacgggagtagcccctccgg-3'
P25	5'-agtaatgtaccactctataatctctgaagtcccc-3'

реагенты были производства “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

**Конструирование штаммов и плазмид.** Все хромосомные модификации осуществляли с использованием методики, разработанной Даценко и Ваннер [10]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *ppc*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1, P2; P5, P6; P9, P10; P13, P14 и плазмиды pMW118-(*λattL*-*Сm*-*λattR*) [11] в качестве матрицы.

Полученные фрагменты ДНК были по отдельности интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощника pKD46. Последующее удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами (*attachment*) фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [12]. Факт соответствия предполагаемых и полученных

экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инактивированными генами *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *ppc*, подтверждали ПЦР анализом с помощью пар локус-специфических праймеров P3, P4; P7, P8; P11, P12 и P15, P16, соответственно. Делеции генов *ackA-pta*, *poxB* и *ldhA* были объединены в штамме SGM0.1 серией последовательных P1-зависимых трансдукций [9].

Для обеспечения конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* оперона, промотор P<sub>L</sub> фага лямбда, соединенный с последовательностью Шайна-Дальгарно (SD) гена *aceF*, был интегрирован в хромосому штамма *E. coli* MG1655 перед кодирующим участком гена *aceE*. ПЦР амплификацией с использованием пар праймеров P17, P18; P17, P19 и геномной ДНК фага лямбда был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания Bg/II, промотор P<sub>L</sub>, последовательность SD гена *aceF* и нуклеотиды, комплементарные 5'-концу кодирующей области гена

*aceE*. Фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*III, маркер *Sm*<sup>R</sup> и нуклеотиды, гомологичные участку ДНК, предшествующему непосредственно кодирующей области гена *aceE*, был получен при помощи ПЦР с использованием праймеров P20 и P21 и плазмиды pMW118-(*λattL*-*Sm*-*λattR*).

Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*III и лигированы Т4 ДНК-лигазой [9]. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P19 и P20. Полученный ПЦР-продукт был использован для интеграции в хромосому. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *aceE*, было подтверждено в полученных клонах секвенированием с помощью праймеров P22 и P23. Штамм SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* был получен в результате переноса P1-зависимой трансдукцией полученной модификации в штамм SGM0.1.

Ген *pusA* *Bacillus subtilis*, кодирующий пируваткарбоксилазу, был клонирован в составе плазмиды pMW119. Фрагмент ДНК, содержащий ген *pusA* с собственной регуляторной областью был получен с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы хромосомы штамма *B. subtilis* 168 и праймеров P24 и P25. Полученный ПЦР-продукт был, в дальнейшем, последовательно обработан эндонуклеазами рестрикции *Xba*I и *Kpn*I. Параллельно эндонуклеазами рестрикции *Xba*I и *Kpn*I была обработана плазида pMW119. Полученные линейные фрагменты ДНК, содержащие ген *pusA* и большой *Xba*I-*Kpn*I фрагмент плазмиды pMW119 были лигированы с помощью Т4 ДНК-лигазы. Полученная лигазная смесь была использована для трансформации штамма *E. coli* MG1655 *Δppc* с последующим отбором Ap<sup>R</sup> трансформантов на агаризованной среде LB, содержащей 100 мг/л ампициллина. Полученные трансформанты проверяли на способность к росту на агаризованной минимальной среде M9 в присутствии 0.2% глюкозы в качестве единственного источника углерода. Индивидуальные клоны, способные к росту на данной среде, содержали плазмиду, включающую ген *pusA*, кодирующий функционально активную пируваткарбоксилазу. Выделенная по стандартной методике из соответствующих трансформантов плазида была названа pPYC.

Трансформацию штаммов SGM0.1 и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* плазидами pMW119 и pPYC осуществляли по стандартной методике.

**Культивирование штаммов для продукции янтарной кислоты.** Клетки штаммов SGM0.1, SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA*, SGM0.1 [pMW119], SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pMW119], SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. К 1 мл полученных ночных культур добавляли 49 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы. Полученные культуры

выращивали в колбах объемом 750 мл при 37°C на роторной качалке при 250 об/мин в течение 6 ч. Полученные клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g и 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды M9, содержащей 20 г/л глюкозы. В дальнейшем проводили инкубацию полученных клеточных культур в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл закрытых завинчивающимися крышками при 37°C на роторной качалке при 250 об/мин. При выращивании штаммов SGM0.1 [pMW119], SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pMW119], SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] использованные среды содержали дополнительно 100 мг/л ампициллина. Аналогичным образом оценивали способность штаммов SGM0.1, SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA*, SGM0.1 [pMW119], SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pMW119], SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] продуцировать янтарную кислоту в присутствии в среде дополнительного источника иона HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Культивирование проводили как описано выше, за исключением того, что среда, использованная на последней стадии, дополнительно содержала 1.5 г/л NaHCO<sub>3</sub>.

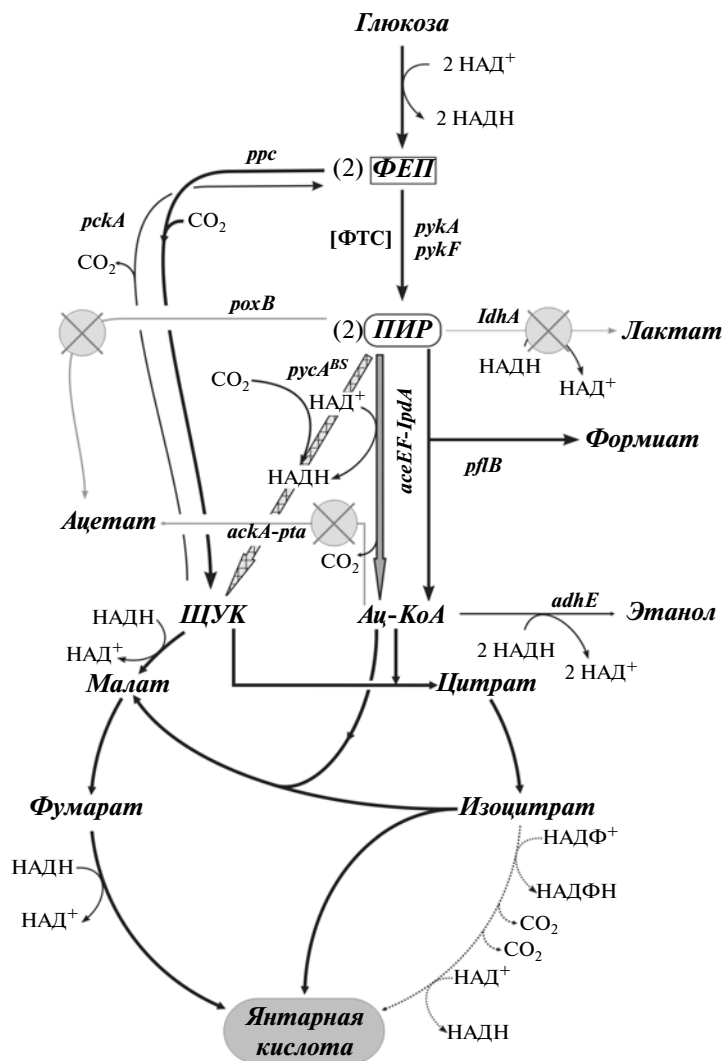
**Аналитические методы.** Концентрацию органических кислот и остаточной глюкозы в культуральных жидкостях определяли методом ВЭЖХ с использованием системы "Waters" HPLC system (США). Для измерения концентраций органических кислот использовали ReproSil-Pur C18-AQ ("Dr. Maisch", Германия) с детекцией при длине волны 210 нм. Для измерения концентрации глюкозы, система была укомплектована рефрактивным детектором "Waters" 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 ("Waters", США). Концентрацию этанола определяли методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором на колонке OmegaWax (30 м, 0.25 мм в.д., 0.25 мкм толщины пленки) ("Supelco", США). Использовали хроматограф "Shimadzu" GC-17A (Япония), оснащенный автосамплером АОС-20i.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе был исследован эффект конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* оперона, кодирующих белки-компоненты НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса, на анаэробную продукцию янтарной кислоты модельными штаммами-продуцентами.

В качестве базовых штаммов-продуцентов янтарной кислоты в работе были использованы штаммы *E. coli* SGM0.1, сконструированный таким образом, что в нем были инактивированы гены *pta*, *ackA*, *poxB* и *ldhA*, кодирующие фосфотрансацетилазу Pta (КФ 2.3.1.8), ацетаткиназу AckA (КФ 2.7.2.1), пируватоксидазу PoxB (КФ 1.2.5.1) и лактатдегидрогеназу LdhA (КФ 1.1.1.28), катализирующие основные реакции образования уксусной и молочной кислот, и SGM0.1





Общая схема окислительно-восстановительных реакций центрального метаболизма и возможных путей анаэробного биосинтеза янтарной кислоты в сконструированных штаммах.

Вовлеченные ферменты обозначены наименованиями кодирующих их генов.

Серым цветом обозначены продукты, основные пути образования которых в сконструированных штаммах инактивированы (перечеркнутые круги) за счет делеций соответствующих генов.

Широкой серой стрелкой обозначена возможность анаэробной конверсии пирувинуградной кислоты в Ац-КоА под действием пируватдегидрогеназы в штаммах SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC].

Широкой заштрихованной стрелкой обозначена возможность конверсии пирувинуградной в щавелевоуксусную кислоту под действием гетерологичной пируваткарбоксилазы в штаммах SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC].

Пунктиром обозначена окислительная часть цикла трикарбоновых кислот, не активная в анаэробных условиях.

ФЕП – фосфоенолпируват, ПИР – пирувинуградная кислота, ЩУК – щавелевоуксусная кислота, Ац-КоА – ацетил-КоА, ФТС – фосфоенолпируват-зависимая фосфотрансферазная система.

[pPYC] – дополнительно обладающий активностью гетерологичной пируваткарбоксилазы.

Целевые хромосомные модификации были получены в штаммах с использованием оптимизированной [11, 12] методики, разработанной Даденко и Ваннер [10] и основанной на эффекте λRed-зависимой гомологичной рекомбинации. Конститутивная экспрессия генов *aceE*, *aceF*, *lpdA* была обеспечена

заменой нативной регуляторной области соответствующего оперона в хромосоме промотором P<sub>L</sub> фага лямбда. Также сайт связывания рибосом гена *aceE* был заменен сайтом связывания рибосом гена *aceF*, обладающим нуклеотидной последовательностью более близкой к канонической.

Ген *pucA* *B. subtilis*, кодирующий пируваткарбоксилазу, расположили под контролем собственной

**Таблица 3.** Концентрации и молярные выходы\* (%) метаболитов, продуцируемых сконструированными штаммами в анаэробных условиях

Штамм	Потребленная глюкоза	Пировиноградная кислота		Уксусная кислота		Этанол		Янтарная кислота	
	мМ	мМ	%	мМ	%	мМ	%	мМ	%
<b>Без <math>\text{HCO}_3^-</math></b>									
SGM0.1	25.0 (0.5)	30.9 (0.4)	123.7 (0.7)	0.7 (0.1)	2.7 (0.1)	11.5 (0.1)	46.1 (0.5)	3.9 (0.1)	15.4 (0.1)
SGM0.1 $P_L\text{-aceEF-lpdA}$	25.5 (0.9)	30.6 (0.3)	119.8 (2.3)	1.2 (0.1)	4.5 (0.1)	11.9 (0.1)	46.8 (1.4)	4.4 (0.1)	17.3 (0.4)
SGM0.1 [pPYC]	23.9 (0.5)	30.7 (0.4)	128.5 (0.9)	0.7 (0.1)	2.9 (0.1)	12.2 (0.1)	51.3 (0.5)	4.2 (0.1)	17.6 (0.2)
SGM0.1 $P_L\text{-aceEF-lpdA}$ [pPYC]	23.9 (0.5)	18.7 (0.3)	78.2 (0.5)	1.7 (0.1)	7.0 (0.1)	14.0 (0.1)	58.7 (0.7)	12.2 (0.2)	51.2 (0.7)
<b>C 1.5 г/л <math>\text{NaHCO}_3</math></b>									
SGM0.1	30.7 (0.4)	34.9 (0.3)	113.7 (0.5)	1.0 (0.1)	3.3 (0.2)	13.9 (0.1)	45.1 (0.2)	8.2 (0.1)	26.6 (0.1)
SGM0.1 $P_L\text{-aceEF-lpdA}$	30.6 (0.5)	30.6 (0.4)	100.1 (0.3)	2.5 (0.1)	8.2 (0.1)	13.1 (0.2)	42.9 (1.2)	10.8 (0.1)	35.4 (0.7)
SGM0.1 [pPYC]	30.6 (0.4)	34.2 (0.7)	111.5 (0.7)	1.2 (0.1)	3.8 (0.1)	12.4 (0.1)	40.4 (0.1)	9.5 (0.1)	31.2 (0.3)
SGM0.1 $P_L\text{-aceEF-lpdA}$ [pPYC]	33.6 (0.4)	18.0 (0.1)	53.8 (0.5)	1.3 (0.3)	4.0 (0.3)	13.8 (0.3)	41.1 (0.3)	19.2 (0.1)	57.3 (0.4)

\* Молярные выходы продуктов приведены в расчете на потребленную глюкозу. Указанные значения являются средними для трех независимых экспериментов. В скобках указаны стандартные отклонения.

регуляторной области в составе низкокопийной плазмиды pMW119. Соответствующая плазида pPYC, содержащая ген *pusA*, кодирующий функционально активную пируваткарбоксилазу, была отобрана в клетках штамма *E. coli* MG1655  $\Delta ppc$ . Известно, что *ppc* мутанты *E. coli* не способны к синтезу шавелевоуксусной кислоты и являются ауксотрофами по интермедиатам цикла трикарбоновых кислот, в результате чего не способны расти на средах, содержащих в качестве источников углерода сахара [13]. Наличие в клетках данного штамма плазмиды pPYC, содержащей ген *pusA*, кодирующий функционально активную пируваткарбоксилазу, восстанавливало способность к росту штамма на минимальной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода.

Общая схема центрального метаболизма и возможные пути анаэробного биосинтеза янтарной кислоты в сконструированных штаммах SGM0.1, SGM0.1 [pPYC], SGM0.1  $P_L\text{-aceEF-lpdA}$  и SGM0.1  $P_L\text{-aceEF-lpdA}$  [pPYC] представлены на рисунке.

Для получения янтарной кислоты штаммы культивировали в минимальной солевой среде M9 с использованием глюкозы в качестве единственного источника углерода. Культивирование включало

аэробную стадию накопления биомассы и анаэробную стадию образования янтарной кислоты. Анаэробную инкубацию клеток полученных штаммов осуществляли как в отсутствии, так и в присутствии в среде дополнительного источника иона  $\text{HCO}_3^-$ . Концентрации остаточной глюкозы и метаболитов, продуцируемых сконструированными штаммами в анаэробных условиях, определяли методами ВЭЖХ и ГХ. Результаты соответствующих экспериментов представлены в табл. 3. Показатели утилизации глюкозы и образования метаболитов контрольными штаммами SGM0.1 [pMW119] и SGM0.1  $P_L\text{-aceEF-lpdA}$  [pMW119] не отличались от таковых для штаммов SGM0.1 и SGM0.1  $P_L\text{-aceEF-lpdA}$ , соответственно.

Из результатов измерений следует, что основными продуктами анаэробного сбраживания глюкозы всеми исследованными штаммами являлись пировиноградная кислота, янтарная кислота и этанол. Отсутствие среди продуктов брожения молочной кислоты согласовывалось с инактивацией в штаммах основного пути ее образования. Остаточная продукция штаммами уксусной кислоты, с учетом инактивации основных путей ее биосинтеза, объяснялась, по-видимому, действием альтернативных ферментов, таких как ацил-КоА тиоэстераза  $\text{YciA}$

(КФ 3.1.2.20) [14], ацетальдегиддегидрогеназа MhpF (КФ 1.2.1.10) [15] и альдегиддегидрогеназа AldB (КФ 1.2.1.4) [16].

Значительное образование штаммами пировиноградной кислоты в первую очередь зависело от действия фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы транспорта сахаров. Моллярный выход пировиноградной кислоты, в расчете на потребленную глюкозу, в большинстве случаев превышавший 100%, подтверждал данное предположение. Известно, что рост *E. coli* при высоких концентрациях глюкозы, как источника углерода, даже в аэробных условиях сопровождается значительной экскрецией уксусной кислоты. Данный феномен получил название “бактериального эффекта Крэбтри” [17]. Инактивация основных путей биосинтеза уксусной кислоты за счет делеций генов *ackA*, *pta* и *poxB* приводит, в данных условиях, к накоплению, вместо уксусной, пировиноградной и даже молочной кислот [18]. Дополнительная инактивация гена *ldhA*, блокирующая образование молочной кислоты, приводит к доминантной экскреции пировиноградной кислоты [13]. Вместе с тем, инактивация фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы транспорта сахаров, снижающая эффективность потребления глюкозы и, тем самым, интенсивность гликолиза, приводит к отмене данного эффекта [13, 19].

Присутствие в штамме SGM0.1 [pPYC] активности пируваткарбоксилазы не приводило к выраженному снижению образования пировиноградной кислоты не только в отсутствии, но и в присутствии дополнительного источника  $\text{HCO}_3^-$ . Данный факт позволял считать, что возможное образование щавелевоуксусной кислоты, в результате карбоксилирования пировиноградной кислоты, и ее дальнейшая конверсия в яблочную и янтарную кислоты в этом случае лимитировались, в первую очередь, недостатком восстановленных НАДН эквивалентов. Щавелевоуксусная кислота, синтезированная пируваткарбоксилазой, могла превращаться в фосфоенолпируват фосфоенолпируваткарбоксикиназой PckA (КФ 4.1.1.49) и в дальнейшем в пировиноградную кислоту под действием пируваткиназ PucA и PucF (КФ 2.7.1.40) или же в результате действия фосфотрансферазной транспортной системы.

Конститутивная экспрессия генов *aceEF-lpdA* оперона в штамме SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* приводила к относительному снижению продукции пировиноградной кислоты только в случае присутствия в среде дополнительного источника иона  $\text{HCO}_3^-$ . При этом данный эффект был связан с соответствующим повышением продукции янтарной кислоты. Можно было предположить, что в этом случае в щавелевоуксусную кислоту мог эффективнее превращаться фосфоенолпируват под действием, соответственно, фосфоенолпируваткарбоксилазы Ppc (КФ 4.1.1.31). Дополнительные НАДН эквиваленты, генерируе-

мые активным НАД<sup>+</sup>-восстанавливающим пируватдегидрогеназным комплексом, способствовали конверсии щавелевоуксусной кислоты в янтарную кислоту в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот.

Продукция янтарной кислоты штаммами SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* в средах, не содержащих дополнительного источника  $\text{HCO}_3^-$ , лишь незначительно превышала показатели контрольного штамма SGM0.1. В первом случае это было связано как с недостатком растворенного  $\text{CO}_2$  для эффективного карбоксилирования пировиноградной кислоты, так и с недостатком необходимых восстановленных эквивалентов для последующей конверсии щавелевоуксусной кислоты в янтарную в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот. Во втором случае основной причиной была недостаточная генерация щавелевоуксусной кислоты фосфоенолпируваткарбоксилазой. В присутствии дополнительного источника  $\text{HCO}_3^-$  эффект наличия в штаммах активности пируваткарбоксилазы или же конститутивной экспрессии *aceEF-lpdA* оперона был более выраженным, выход янтарной кислоты повышался на ~4.5% и ~9%, соответственно. Тем не менее, отсутствие выраженного снижения продукции соответствующими штаммами пировиноградной кислоты в данных условиях позволяло сделать предположение о сохраняющихся условиях лимитации для эффективной конверсии этого предшественника в янтарную кислоту. При этом в случае штамма, содержащего пируваткарбоксилазу, позволяющую обеспечить эффективную конверсию пировиноградной кислоты в щавелевоуксусную кислоту, лимитация была обусловлена непосредственно недостатком восстановленных эквивалентов для конверсии последней в янтарную кислоту. Тогда как в случае штамма SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA*, способного к формированию дополнительных к гликолитическим НАДН эквивалентов за счет активности НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса, эта лимитация обуславливалась недостаточным образованием щавелевоуксусной кислоты из интенсивно расходуемого клеткой метаболического предшественника пировиноградной кислоты – фосфоенолпирувата. Таким образом обеспечение в одном штамме совместной активности пируваткарбоксилазы и НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса могло взаимно компенсировать эффекты лимитирующие продукцию янтарной кислоты штаммами SGM0.1 [pPYC] и SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA*.

Действительно, объединение обеих активностей в штамме SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] приводило к резкому падению продукции им пировиноградной кислоты и резкому росту образования янтарной кислоты. При этом отношения приращений количеств синтезированной штаммом янтарной кислоты

и убывали количества синтезированной им пировиноградной кислоты относительно штаммов SGM0.1 и SGM0.1 [pPYC] во всех случаях были близки к 2/3. Это свидетельствовало о том, что увеличение продукции янтарной кислоты штаммом SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] относительно штаммов SGM0.1 и SGM0.1 [pPYC], продуцирующих данное вещество в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот, было обусловлено, в основном, активацией глиоксилатного шунта. С участием глиоксилатного шунта две молекулы янтарной кислоты могут быть синтезированы из одной молекулы щавелевоуксусной кислоты и двух молекул ацетил-КоА. Поскольку щавелевоуксусная кислота и ацетил-КоА синтезируются в штамме SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] из пировиноградной кислоты, можно заключить, что в этом случае образование 2 молекул янтарной кислоты с участием глиоксилатного шунта требует расхода 3 молекул пировиноградной кислоты, обуславливая соотношение продукт/субстрат – 2/3. В клетках *E. coli* дикого типа ферменты глиоксилатного шунта активируются лишь при росте на уксусной кислоте, жирных кислотах и других субстратах, утилизация которых происходит через первичное образование ацетил-КоА. Вместе с тем, известно, что гены кодирующие ферменты глиоксилатного шунта экспрессируются конститутивно при инактивации белка-репрессора IclR [20]. Однако, глиоксилатный шунт может активироваться при анаэробной утилизации глюкозы штаммами с инактивированными генами *ackA*, *pta*, *ldhA* и *adhE* даже в присутствии интактного IclR [4]. По-видимому, это связано с формированием в мутантных штаммах избыточного пула ацетил-КоА из пировиноградной кислоты под действием пируватформатлиазы. В штамме SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC], с интактным *adhE*, относительное возрастание пула ацетил-КоА обуславливалось дополнительной к пируватформатлиазе активностью НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса. При этом возрастание пула ацетил-КоА, сопровождающееся генерацией дополнительных НАДН эквивалентов на фоне интактной альдегид/алкоголь дегидрогеназы AdhE, не приводило к значительному увеличению образования этанола штаммом. Это объяснялось генерацией НАД<sup>+</sup>-восстанавливающим пируватдегидрогеназным комплексом лишь одной молекулы НАДН на формируемый ацетил-КоА, в то время как конверсия последнего в этанол требует двух восстановленных эквивалентов. С учетом активности пируватформатлиазы, синтез в клетке ацетил-КоА заведомо превышал генерацию необходимых для его конверсии в этанол восстановленных эквивалентов. Вместе с тем, образование янтарной кислоты с участием глиоксилатного шунта требует расхода двух молекул ацетил-КоА и окисления одной молекулы НАДН. Таким образом, у штамма SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] вовлечение ацетил-КоА в глиок-

силатный шунт, с формированием янтарной кислоты, было предпочтительней его конверсии в этанол.

Важно отметить, что ярко выраженный эффект конститутивной экспрессии генов *aceEF-lpdA* в штамме с активностью пируваткарбоксылазы наблюдался вне зависимости от присутствия в среде дополнительного источника HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Это позволило заключить, что сочетание активностей пируваткарбоксылазы и НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса способствовало достижению определенного баланса окислительно/восстановительных реакций и потоков углерода в клетках рекомбинантного штамма, в то время как повышение уровня растворенного CO<sub>2</sub> способствовало лишь общей интенсификации соответствующих биохимических процессов.

Влияние активного пируватдегидрогеназного комплекса на анаэробный метаболизм клеток *E. coli* [21], на анаэробную продукцию ими этанола [22, 23] и других продуктов брожения [24] в последнее время активно обсуждается. Тем не менее прямой эффект положительного влияния активности НАД<sup>+</sup>-восстанавливающего пируватдегидрогеназного комплекса на анаэробную продукцию янтарной кислоты клетками *E. coli* продемонстрирован нами впервые.

Данный эффект был показан на модельных рекомбинантных штаммах. Очевидно, что их оптимизация для сверхсинтеза целевого продукта требует внесения дополнительных направленных модификаций в клеточный метаболизм.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ГосНИИгенетика Антоновой С.В. и Сухоженко А.В. за проведение хроматографических анализов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jantama K., Haupt M.J., Svoronos S.A., Zhang X., Moore J.C., Shanmugam K.T., Ingram L.O. // *Biotechnol. Bioeng.* 2008. V. 99. № 5. P. 1140–1153.
2. Andersson C., Hodge D., Berglund K.A., Rova U. // *Biotechnol. Prog.* 2007. V. 23. № 2. P. 381–388.
3. Stols L., Donnelly M.I. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. № 7. P. 2695–2701.
4. Sánchez A.M., Bennett G.N., San K.Y. // *Metab. Eng.* 2005. V. 7. № 3. P. 229–239.
5. Vemuri G.N., Eiteman M.A., Altman E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 4. P. 1715–1727.
6. Cassey B., Guest J.R., Attwood M.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1998. V. 159. № 2. P. 325–329.
7. Schmincke-Ott E., Bisswanger H. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 114. № 2. P. 413–420.
8. Shen L.C., Atkinson D.E. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. № 22. P. 5974–5978.
9. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
10. Datsenko K.A., Wanner B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.

11. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
12. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
13. Sauer U., Eikmanns B.J. // FEMS Microbiol. Rev. 2005. V. 29. № 4. P. 765–794.
14. Zhuang Z., Song F., Zhao H., Li L., Cao J., Eisenstein E., Herzberg O., Dunaway-Mariano D. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 9. P. 2789–2796.
15. Ferrández A., García J.L., Díaz E. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 8. P. 2573–2581.
16. Ho K.K., Weiner H. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 3. P. 1067–1073.
17. Veit A., Polen T., Wendisch V.F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. № 2. P. 406–421.
18. De Mey M., Lequeux G.J., Beauprez J.J., Maertens J., Van Horen E., Soetaert W.K., Vanrolleghem P.A., Vandamme E.J. // Biotechnol. Prog. 2007. V. 23. № 5. P. 1053–1063.
19. Flores S., Gosset G., Flores N., de Graaf A.A., Bolívar F. // Metab. Eng. 2002. V. 4. № 2. P. 124–137.
20. Gui L., Sunnarborg A., Pan B., LaPorte D.C. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 1. P. 321–324.
21. Murarka A., Clomburg J.M., Moran S., Shanks J.V., Gonzalez R.J. // Biol. Chem. 2010. V. 285. № 41. P. 31548–31558.
22. Zhou S., Iverson A.G., Grayburn W.S. // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. № 2. P. 335–342.
23. Kim Y., Ingram L.O., Shanmugam K.T. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 6. P. 1766–1771.
24. Wang Q., Ou M.S., Kim Y., Ingram L.O., Shanmugam K.T. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 7. P. 2107–2114.

## Anaerobic Synthesis of Succinic Acid by *Escherichia coli* Strains with Activated NAD<sup>+</sup> Reducing Pyruvate Dehydrogenase Complex

A. Yu. Skorokhodova, A. Yu. Gulevich, A. A. Morzhakova, R. S. Shakulov, and V. G. Debabov

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 117545, Russia*

*e-mail: skorokhodova@genetika.ru*

Received November 24, 2010

**Abstract**—Effect of constitutive expression of the *aceEF-lpdA* operon genes coding for the enzymes of NAD<sup>+</sup> reducing pyruvate dehydrogenase complex on the anaerobic production of succinic acids from glucose by recombinant *Escherichia coli* strains was studied. Basic producer strains were obtained by inactivation of the main pathways for synthesis of acetic and lactic acids by deletion of the genes *ackA*, *pta*, *poxB*, and *ldhA* (SGM0.1) in *E. coli* strain MG1655 cells and additional introduction of the *Bacillus subtilis* pyruvate carboxylase (SGM0.1 [pPYC]). A constitutive expression of the genes *aceEF-lpdA* in derivatives of the basic strains SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* and SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] was provided by replacing the native regulatory region of the operon with the lambda phage P<sub>L</sub> promoter. Molar yields of succinic acid in anaerobic glucose fermentation by strains SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* and SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] exceeded the corresponding yields displayed by several control strains (exceeded considerably in the case of the strains with a pyruvate carboxylase activity). It is concluded that an increase in the succinic acid production by strain SGM0.1 P<sub>L</sub>-*aceEF-lpdA* [pPYC] as compared with the strains SGM0.1 and SGM0.1 [pPYC], which synthesize this substance in the reductive tricarboxylic acid cycle, is determined by activation of the glyoxylate shunt.

UDC 576.8

## HETEROGENOUS EXPRESSION OF POLY- $\gamma$ -GLUTAMIC ACID SYNTHETASE COMPLEX GENE OF *Bacillus licheniformis* WBL-3

© 2011 N. Wang, G. Yang, C. Che, Y. Liu

College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu, 273165 RR. China  
e-mail: woshihaoren 212@163.com; e-mail: yangge@mail.qfnu.edu.cn

Received November 16, 2010

*Bacillus licheniformis* WBL-3, one of poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) producers, depends on the existence of glutamate in the medium. In this paper,  $\gamma$ -PGA synthetase complex gene (*pgsBCA*) was cloned from *Bacillus licheniformis* WBL-3. *pgsBCA* gene of *B. licheniformis* WBL-3 was highly homologous with *pgsBCA* gene of *B. licheniformis* 14580. The similarity was 97%, but the similarity of *pgsBCA* gene between *B. licheniformis* WBL-3 and *Bacillus subtilis* IF03336 was only 74%. However, when *pgsBCA* was expressed in *Escherichia coli*, the *E. coli* clone produced  $\gamma$ -PGA extracellularly. The yield of  $\gamma$ -PGA was 8.624 g/l. This result infers that *B. licheniformis* and *B. subtilis* has the similar  $\gamma$ -PGA biosynthesis mechanism, namely, glutamic acid is catalyzed by an ATP-dependent amide ligase to synthesize  $\gamma$ -PGA.

Poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) is a kind of non-ribosomal peptide, it is made of D-and (or) L-glutamic acid units linked by amide linkages between  $\alpha$ -amino and  $\gamma$ -carboxylic acid groups with higher negative charges. It is water-soluble and biodegradable [1],  $\gamma$ -PGA is substantially non-toxic to humans and environment, and even edible. Therefore,  $\gamma$ -PGA and its derivatives are applied in various fields, such as food, medicine, cosmetics, waste water treatment and so on [2].

Recent ten years, the studies of  $\gamma$ -PGA biosynthesis have made remarkable achievements. There are two kinds of mechanism for  $\gamma$ -PGA biosynthesis. The first one is that  $\gamma$ -PGA is synthesized depending on a protein template in *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A, which is like the biosynthesis of gramicidin S [3, 4]. This enzyme system contains at least three enzymes. A sequence-reaction mechanism is proposed as followings:

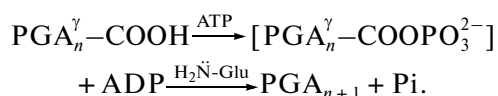
L-glutamic acid + ATP  $\longrightarrow$  [ $\gamma$ -L-glutamyl-AMP] + PPi;

[ $\gamma$ -L-glutamyl-AMP] + SH-enzyme  
 $\longrightarrow$  [ $\gamma$ -x-glutamyl-S-enzyme] + AMP;

[ $\gamma$ -x-glutamyl-S-enzyme]  $\longrightarrow$  [ $\gamma$ -D-glutamyl-S-enzyme];

[ $\gamma$ -D-glutamyl-S-enzyme] + ( $\gamma$ -D-glutamyl)<sub>n</sub>  
 $\longrightarrow$  ( $\gamma$ -D-glutamyl)<sub>n+1</sub> + SH-enzyme.

The second one is that  $\gamma$ -PGA is biosynthesized by  $\gamma$ -PGA synthetase complex as following [5]:



This reaction is catalyzed by an enzyme (PgsB), which is encoded by *pgsB*. PgsB belonged to the ATP-dependent

amide ligase superfamily. PgsA and PgsC, which are encoded by *pgsA* and *pgsC* respectively, are also integral to  $\gamma$ -PGA synthesis. PgsB, PgsA and PgsC construct  $\gamma$ -PGA synthetase complex. These three genes (*pgsB*, *pgsA* and *pgsC*) form an operon. The synthetase complex is exclusively responsible for  $\gamma$ -PGA biosynthesis [6–8]. Many laboratories have proved this mechanism in *B. subtilis* by gene engineering. Jiang et al. cloned *pgsBCA* genes into *E. coli*, and constructed engineered strain successfully [9]. Tarui et al. transfected  $\gamma$ -PGA synthetase system (*pgs*) into tobacco leaves, *pgs* complex were expressed and reassembled in a functional form in tobacco plants [10].

For *B. licheniformis*, the studies on  $\gamma$ -PGA biosynthesis mechanism are few, and the biosynthesis mechanism above-mentioned has not been proved, related genes of  $\gamma$ -PGA biosynthesis are unreported. In this experiment,  $\gamma$ -PGA synthetase complex gene (*pgsBCA*) of *B. licheniformis* WBL-3 was cloned, *pgsBCA* was expressed in *E. coli*, the *E. coli* clone produced  $\gamma$ -PGA extracellularly. This result infers that *B. licheniformis* and *B. subtilis* has the similar  $\gamma$ -PGA biosynthesis mechanism.

### MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Trytone was purchased from Beijing Aoboxing Biotech Co. (China). Yeast extract was purchased from Oxoid (England). NaCl, citric acid, L-glutamic acid, glycerol, NH<sub>4</sub>Cl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>7</sub> · 4H<sub>2</sub>O, ninhydrin, 3,5-dinitrosalicylic acid, HCl, NaOH (analytical reagent) were obtained from Beijing Chemical Works (China). Agar, restriction endonuclease *Nco* I and *Kpn* I, DNA ligation Kit Ver.2.0, agarose gel DNA fragment recovery Kit Ver.2.0 *TaKaRa LA*

*Taq*, DL5000 DNA marker were purchased from TaKaRa (Japan).

**Bacterial strains, plasmids and media.** *B. licheniformis* WBL-3, a mutant strain from *B. licheniformis* ATCC 9945A by irradiation of He-Ne laser [11]. *E. coli* JM109, a host strain for producing  $\gamma$ -PGA. Plasmid pTrc99A was used as expression vector.

Luria-Bertani (LB) medium (g/l): tryptone – 10.0, yeast extract – 5.0 and NaCl – 10.0) used for cultivating cells.  $\gamma$ -PGA media (g/l): citric acid – 13.5, L-glutamic acid – 23.0, glycerol – 75.0,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 6.8,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0.8,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.05,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.17,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0.13,  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  – 0.26, pH 7.0–7.5, used for producing  $\gamma$ -PGA [12].

**Amplification and sequencing of  $\gamma$ -PGA synthetase complex gene (*pgsBCA*).** *pgsBCA* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the primers of p1 and p2, which were designed based on the genome annotations of *B. licheniformis* 14580 (Accession Number: CP000002) [13], and contained restriction sites of *Nco* I and *Kpn* I respectively (shown by a solid underline), p1 (the sense primer) was 5'-gcgccatgggacaacaatgtgggaatgc-3'; p2 (the antisense primer) was 5'-gcggtacctttcattgttcaccactccg-3'. The PCR was carried out for 35 cycles at 94°C for 50 s, 68°C for 50 s, 72°C for 3 min followed by a final step at 72°C for 10 min. *pgsBCA* was consigned to Shanghai Sangon Biological Engineering Technology & Services Co., Ltd to sequence.

**Construction of genetically engineered strain.** The product of PCR containing *pgsBCA* was digested with *Nco* I and *Kpn* I, and then was cloned into pTrc99A, which was also digested with *Nco* I and *Kpn* I, to construct recombinant expression plasmid *pTrc-pgs*. *pTrc-pgs* was transformed into *E. coli* JM109 to construct recombinant *E. coli* (*E. coli-pgs*).

**Conditions for  $\gamma$ -PGA production.** *E. coli-pgs* cells were cultivated in LB media at 37°C, 200 rpm for 12 h. And then 5 ml *E. coli-pgs* cells were inoculated into 100 ml  $\gamma$ -PGA media, at the same time, ampicillin and isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) were added at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 1 mM respectively into  $\gamma$ -PGA media. *E. coli-pgs* cells were incubated at 37°C, 200 rpm for 84 h to produce  $\gamma$ -PGA. *E. coli* JM109 (growing in  $\gamma$ -PGA media), *B. licheniformis* WBL-3 (growing in  $\gamma$ -PGA media) and *E. coli-pgs* (growing in  $\gamma$ -PGA media plus ampicillin and IPTG free) were cultivated at the same conditions to compared with *E. coli-pgs* (induced).

Cell growth was determined by measuring the dry cell weight.

**Purification of  $\gamma$ -PGA.**  $\gamma$ -PGA was isolated from the solution by the method as following: the culture medium was centrifuged (Beckman, USA) at 15000 g for 20 min to remove cells. The resulting solution was poured into 4 volumes of ethanol, it was incubated at 4°C for 12 h. The precipitate was collected and dissolved in deionized water

and dialyzed three times against 1.0 deionized water in dialysis bag (Viskase, USA) for 3 h. The solution was lyophilized, and the dry matter was used as  $\gamma$ -PGA [6, 12].

**Yield of  $\gamma$ -PGA.** The  $\gamma$ -PGA concentration in culture media was measured by weight method.

**Analysis of  $\gamma$ -PGA and its hydrolysate.** 0.1 g of  $\gamma$ -PGA was dissolved in 2 ml 6 M HCl, and then hydrolyzed at 120°C for 48 h in ampoule bottles [14]. pH of hydrolysate was adjusted to 3.0–3.5 and 7.0 with 6 M NaOH, and then diluted into 0.5% with deionized water.

Amino acids and reducing saccharides of hydrolysate were identified by the ninhydrin reaction and 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method respectively [3,15]. High performance liquid chromatography (HPLC, Agilent, USA) was used to identify glutamic acid [16]. L-glutamic acid standard and hydrolysate of  $\gamma$ -PGA were derivatized using 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethyl chloroformate (BCEOC) as pre-column derivation reagent. The fluorescence excitation and emission wavelengths were 333 and 390 nm. The identification of amino acid derivatives from hydrolyzed emplantic was obtained on the basis of electrospray ionization detection at positive ion mode.

**Molecular size estimation of  $\gamma$ -PGA.** The molecular weight of  $\gamma$ -PGA was estimated by agarose gel electrophoresis (Nanjing Puhui Biotechnology Co. Ltd, China) [17].  $\gamma$ -PGA was subjected to electrophoresis at 6 V/cm for 90 min on 1.0% agarose gels using TAE (40 mM Tris-hydroxylaminomethane, 1 mM EDTA, 0.14% v/v acetic acid) running buffer.  $\gamma$ -PGA on the gels were visualized by staining with methylene blue (0.23% methylene blue, 23% (v/v) ethanol, 0.008% KOH) for 30 min, followed by destaining with water.

## RESULTS AND DISCUSSION

**$\gamma$ -PGA synthetase complex gene of *B. licheniformis* WBL-3.**  $\gamma$ -PGA synthetase complex gene consists of three genes: *pgsB*, *pgsC* and *pgsA*. The three genes constitute an operon (*pgsBCA*). The genome of *B. licheniformis* 14580 has been annotated in 2004. A pair of primers on the basis of *B. licheniformis* 14580 genome was designed in order to get a whole operon, which can maintain the nature structure and function among the three genes. The former researches designed three pairs of primers based on *B. subtilis*, then three genes were linked orderly. The similarity of *pgsBCA* among *B. subtilis* is 98~99%. However, the similarity of  $\gamma$ -PGA synthetase complex gene of *B. licheniformis* WBL-3 (Accession Number: GQ249184) between *B. licheniformis* 14580 and *B. subtilis* IF03336 (Accession Number: AB016245) is 97% and 74% respectively. The comparison of *pgsBCA* among strains was shown in table.

**Construction of recombinant expression plasmid (*pTrc-pgs*).** The pTrc99A vector is tightly regulated by *trc*-promoter, which is useful for the expression of unfused

Comparison of *pgsBCA* among strains

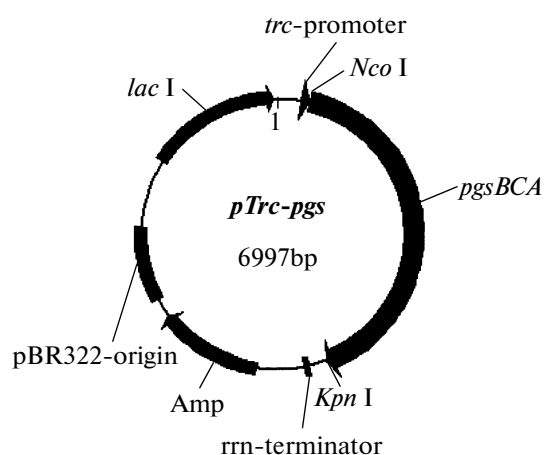
Genes	Strains		
	<i>B. licheniformis</i> 14580	<i>B. licheniformis</i> WBL-3	<i>B. subtilis</i> IF03336
<i>pgsB</i> (bp)	1182	1182	1182
<i>pgsC</i> (bp)	450	450	450
<i>pgsA</i> (bp)	1170	1155	1143
Distance between <i>pgsB</i> and <i>pgsC</i> (bp)	15	15	14
Distance between <i>pgsC</i> and <i>pgsA</i> (bp)	19	19	18
Length of Operon (bp)	2836	2807	2807

proteins in *E. coli*. It can express active proteins easily. So it is useful for the expression of active  $\gamma$ -PGA synthetase complex, which make the host *E. coli* JM109 have the competence of synthesizing  $\gamma$ -PGA. The recombinant expression plasmid is shown in Fig. 1.

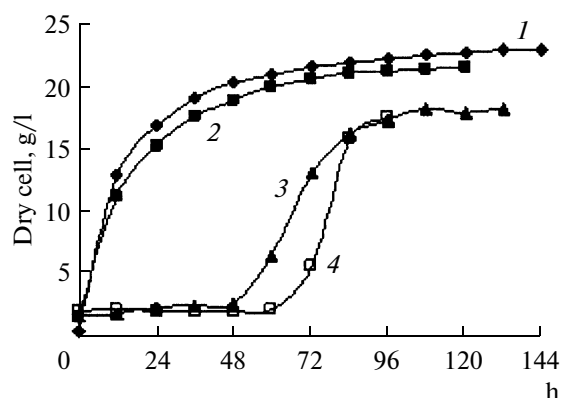
**Cultivation of *E. coli-pgs* to produce  $\gamma$ -PGA.** The salt concentration of  $\gamma$ -PGA media is high to 3.98%, which isn't suitable to cultivate *E. coli* JM109 and *E. coli-pgs* (not induced) but suitable for *B. licheniformis* WBL-3 and *E. coli-pgs* (induced) to produce  $\gamma$ -PGA. *E. coli* JM109 and *E. coli-pgs* (not induced) had an obvious lag phase, which were 48 and 60 h respectively. As shown in Fig. 2, *E. coli-pgs* and *B. licheniformis* WBL-3 can grow well under such high saline conditions and produce plenty of  $\gamma$ -PGA, their property of salt tolerance may be related with  $\gamma$ -PGA, the function of  $\gamma$ -PGA may be a factor to adapt environment. Further research must be conducted to prove such a conclusion, which can provide a theoretic

cal proof for the physiological function of  $\gamma$ -PGA. The  $\gamma$ -PGA yield of *E. coli-pgs* is 8.624 g/l, it is much more than Ashiuchi et al, Jin et al. and Jiang et al. [6, 18, 9] recombinant *E. coli* (24 mg/l, 0.51 g/l, 3.74 g/l respectively). This result may be due to the integrity of nature structure and function of the three genes.

**Analysis of fermentation product.** After centrifuging and precipitating with ethanol, emulsion was present in culture medium. By identifying the emulsion with the methods above-mentioned, it didn't contain byproduct polysaccharides, the units were glutamic acid (chromatogram for hydrolysate of  $\gamma$ -PGA derived with BCEOC is shown in Fig. 3), so the emulsion was  $\gamma$ -PGA. This result implied that *B. licheniformis* and *B. subtilis* had the similar synthesis mechanism of  $\gamma$ -PGA. In *B. licheniformis* WBL-3,  $\gamma$ -PGA's biosynthesis didn't depend on a protein template, and it was catalyzed by an ATP-dependent amide ligase. The molecular size of  $\gamma$ -PGA produced by



**Fig. 1.** Construction of recombinant expression plasmid *pTrec-pgs*.



**Fig. 2.** Growth curve of strains: 1 – *E. coli-pgs* (induced); 2 – *B. licheniformis* WBL-3; 3 – *E. coli* JM109; 4 – *E. coli-pgs* (not induced).



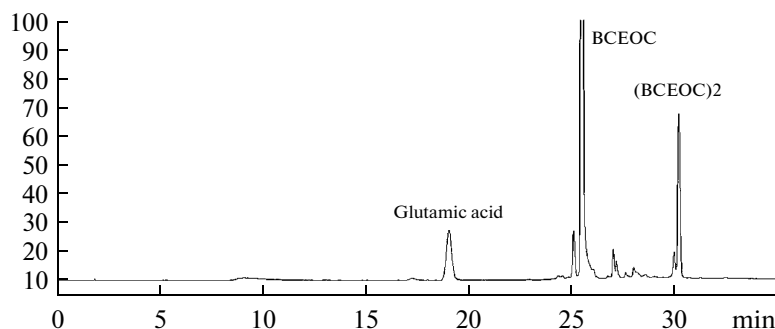


Fig. 3. Chromatogram for hydrolysate of  $\gamma$ -PGA derived with BCEOC.

*E. coli-pgs* and *B. licheniformis* WBL-3 was both higher than marker (average molecular size: 200–700 kDa), and  $\gamma$ -PGA produced by *E. coli-pgs* was higher in average molecular size than that produced by *B. licheniformis* WBL-3. This probably may be owing to little activity of  $\gamma$ -PGA depolymerase in *E. coli* (Fig. 4).

In this paper, the reason why the engineered strain can grow well in  $\gamma$ -PGA media, while *E. coli* can't, has not been clear. This result may imply that the function of  $\gamma$ -PGA may be a factor to adapt environment, and this factor may help bacteria to adapt high saline conditions. Further research will be conducted to prove this conclusion and provide a theoretical proof for the biosynthesis mechanism of  $\gamma$ -PGA. However, like *B. licheniformis* WBL-3, engineered strain produces  $\gamma$ -PGA also de-

pending on the existence of glutamate in the medium, which increases the production cost. This problem could be solved by metabolic engineering on the basis of *E. coli-pgs*. Glutamate dehydrogenase is the crucial enzyme of glutamic acid synthesis. By gene disruption, downstream pathway of glutamic acid metabolism can be weakened. Meanwhile glutamate dehydrogenase gene can be cloned, and co-expressed with *pgsBCA*. These two means may increase the quantity of endogenous glutamic acid, and decrease production cost.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fund of Open Subject of State Key Laboratory of Microbial Resources Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science (No. SKLMR-080606), and the Fund of Nature Science of Shandong Province (No.Y2008D16).

#### REFERENCES

1. Shi, F., Xu, Z.N., and Cen, P.L., *Science in China Series B: Chemistry*, 2007, vol. 50, pp. 291–303.
2. Ashiuchi, M., Kamei, T., and Misono, H., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, vol. 23, pp. 101–106.
3. Troy F.A., *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, pp. 305–316.
4. Gardner, J.M., Troy, F.A., *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, pp. 6262–6269.
5. Ashiuchi, M., Nawa, C., Kamei, T., Song, J.J., Hong, S.P., Sung, M.H., Soda, K., Yagi, T. and Misono, H., *Eur. J. Biochem.*, 2001, vol. 268, pp. 5321–5328.
6. Ashiuchi, M., Soda, K. and Misono, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 263, pp. 6–12.
7. Ashiuchi, M., and Misono, H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 59, pp. 9–14.
8. Urushibata, Y., Tokuyama, S., and Tahara, Y., *J. Bacteriol.*, vol. 184, pp. 337–343.
9. Jiang, H., Shang, L., Yoon, S.H., Sang, Y., and Yu, Z.N., *Biotechnol. Lett.* 2006, vol. 28, pp. 1241–1246.
10. Tarui, Y., Iida, H., Ono, E., Miki, W., Hirasawa, E., Fujita, K.I., Tanaka, T., and Taniguchi, M., *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, vol. 100, pp. 443–448.

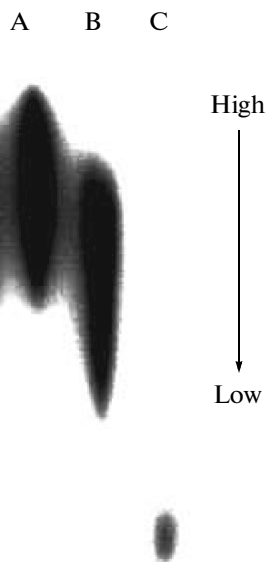


Fig. 4. The molecular size of  $\gamma$ -PGA subjected to agarose gel electrophoresis and visualized by methylene blue staining. Lane A –  $\gamma$ -PGA produced by *E. coli-pgs*; lane B –  $\gamma$ -PGA produced by *B. licheniformis* WBL-3; lane C – marker of  $\gamma$ -PGA (average molecular size: 200–700 kDa). The direction of arrow represents the molecular size of  $\gamma$ -PGA from the high to the low.

11. Yang, G., Chen, J., Qu, Y.B., and Lun, S.Y., *Laser Biol. Acta Chin.*, 2001, vol. 10, pp. 255–260.
12. Chen, J., Du, G.C., Wei, G.Y., and Hua, Z.Z. *Microbial Important Metabolic Products—Fermentation and Process Analysis*, Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
13. Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, Z.J., Tang, M., Leon, A.L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.J., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., and Berka, R.M., *Genome Biology*, 2004, vol. 5, pp. Article R77.1-R77.12.
14. Ashiuchi, M., Tani, K., and Soda, K., *J. Biochem.*, 1998, vol. 123, pp. 1156–1163.
15. Shi, Y.W., Ming, Y.F., Wang, C.P., Zhao, X.E., Zhang, R., and You, J.M., *Chinese J. Anal. Chem.*, 2006, vol. 34, pp. 503–507.
17. Kimura, K., Itoh, Y., *Appl Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 5, pp. 2491–2497.
18. Jin, Y.H., Liu, J., Liu, L., Deng, F., Tao, J., and Song, C.J., *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2008, vol. 41, pp. 57–63.

УДК 547.92;572.152;579.873.21

## ТРАНСФОРМАЦИЯ $\Delta^4$ -3-КЕТОСТЕРОИДОВ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ АКТИНОБАКТЕРИИ *Rhodococcus erythropolis*

© 2011 г. Н. В. Карпова\*, В. А. Андришина\*, В. В. Ядерц\*, А. В. Дружинина\*, Т. С. Стыщенко\*, Б. Л. Шаскольский\*\*, В. И. Лозинский\*\*, Лью Дук Хи\*\*\*, Н. Е. Войшвилло\*

\*Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: andryushina@rambler.ru

\*\* Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН, Москва, 119991

\*\*\* Институт химии, Вьетнамская Академия наук и технологий, Ханой

Поступила в редакцию 16.08.2010 г.

С помощью культуры *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ Ас-1740 из 11 стероидов ряда андростана и прегнана при содержании субстрата в реакционной среде 0.5–10 г/л получены соответствующие  $9\alpha$ -гидроксипроизводные.  $9\alpha$ -Моногидроксилирование протекало независимо от строения заместителя при С17. Однако структура стероидной молекулы влияла на время полной конверсии субстрата и выход продукта трансформации. При максимальном количестве андростендиона (АД) 10 г/л  $9\alpha$ -гидрокси-АД образовывался через 35 ч с выходом 85%.  $9\alpha$ -гидрокси-АД получали также с помощью клеток актинобактерии, включенных в криогель поливинилового спирта. При содержании в среде АД 4.0 г/л проведено 9 последовательных циклов трансформации с помощью иммобилизованных клеток. Содержание  $9\alpha$ -гидрокси-АД, образуемого в 6 циклах продолжительностью 22–24 ч каждый, составляло 98%.

Большинство стероидных лекарственных препаратов, используемых в настоящее время в медицине и ветеринарии, представляет собой структурные модификации природных соединений, по сравнению с которыми модифицированные производные обладают более высокой биологической активностью и меньшими побочными эффектами [1].

В синтезе многих препаратов используется способность микроорганизмов селективно осуществлять нужную трансформацию стероидных молекул заданной структуры, не требующую предварительной защиты имеющихся в молекуле функциональных групп, и в экологически чистых условиях. Более того, такие трансформации стероидов, как гидроксилирование, в частности гидроксилирование в положение С9 полициклической системы стероидной молекулы, химическим способом в промышленных масштабах практически не осуществимы [1–4].

Интерес к  $9\alpha$ -гидроксистероидам обусловлен тем, что они используются в качестве исходных продуктов для синтеза  $11\beta$ -гидрокси- $9\alpha$ -галоид-стероидов ряда прегнана, обладающих высокой антиаллергической, противошоковой и противовоспалительной активностью, таких, как триамцинолон, дексаметазон, синаflan и др. Они могут быть использованы как самостоятельные физиологически активные соединения, так и как интермедиаты в синтезе новых препаратов [2–7].

Способность вводить гидроксигруппу в положение С9 стероидной молекулы установлена у некоторых видов плесневых грибов и актинобактерий родов *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus*. У грибов гидроксилирование атома углерода в то или иное положение молекулы стероида зависит от ее строения, тогда как бактерии способны к образованию  $9\alpha$ -гидроксипроизводных из соединений различных рядов и с самыми различными заместителями [5–10].

Условием эффективного  $9\alpha$ -гидроксилирования является применение ингибиторов 3-кетостероид- $\Delta^1$ -дегидрогеназы или использование мутантных штаммов, у которых блокирован ее синтез [8–14]. Мутант *Nocardia canicruria* ATCC 31548, полученный под действием N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина, превращал в  $9\alpha$ -гидроксипроизводные 10 соединений андростановой и прегнановой серии в течение 30–47 ч при содержании субстрата в среде 1.75 г/л с выходом выделенных продуктов 7–45% [8]. Конверсия андростендиона (АД) за 15 ч в  $9\alpha$ -гидрокси-АД (**9-ОН-АД**) генетически модифицированным штаммом *Rhodococcus erythropolis* DSM 13157 при содержании стероида в среде 10 г/л составляла 92–96% [13].

Цель работы — получение  $9\alpha$ -гидроксипроизводных различных стероидов ряда андростана и прегнана с помощью клеток *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ Ас-1740 и изучение возможности использования указанной бактерии в иммобилизованном состоя-

нии в качестве реагента для 9 $\alpha$ -гидроксилирования стероидов.

## МЕТОДИКА

**Условия культивирования и трансформации.** Культивирование бактерии *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ Ас-1740 [14], а также трансформацию стероидов свободными и иммобилизованными клетками (ИМК), осуществляли в кукурузно-глюкозной среде (КГС, г/л): кукурузный экстракт – 15.0, глюкоза – 10.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1.0, pH – 6.8–7.2, в колбах объемом 750 мл на качалке при 29°C и перемешивании 220 об/мин. Процессы получения посевной материи и инкубирования ИМК проводили в 100 мл КГС, процессы трансформации – в 50 мл КГС в колбах с отбойниками. Среду, предназначенную для трансформации, не стерилизовали, а лишь доводили до кипения, охлаждали до 20–30°C, после чего вносили стероиды. Содержание стероидов для трансформации свободными клетками составляло 0.5–10 г/л; АД, трансформируемого с помощью ИМК, 4 г/л.

**Иммобилизация клеток.** Клетки бактерии *R. erythropolis* ВКПМ Ас-1740 [14] выращивали 7–10 сут на агаровой КГС, агар-агар – 25 г/л. Клетки с агара пересеивали в жидкую КГС и выращивали культуру в течение 70–72 ч. Полученный посевной материал переносили в свежую КГС и осуществляли культивирование в течение 46–48 ч. Биомассу, выделенную из 1.2 л культуральной жидкости центрифугированием при 3000 g (2.16 г в пересчете на вес сухих клеток), иммобилизовали включением в гранулы криогеля поливинилового спирта (ПВС) в соответствии с известной методикой [15, 16], для чего использовали ПВС со степенью деацетилирования 99–100% и молекулярной массой 86000 Да (“Acros”, Бельгия). Гранулы иммобилизованного биокатализатора диаметром 2 мм формировали с помощью специальной криогрануляционной установки [17] из 10%-ной (на влажный вес биомассы) суспензии клеток в 10%-ном водном растворе ПВС согласно методике, подробно изложенной в работе [18]. Температура криогенной обработки составляла –15°C, продолжительность выдерживания в замороженном состоянии 15 ч; полученные гранулы в количестве 220 мл оттаивали 6 ч при +4°C, промывали стерильным физраствором и инкубировали в среде КГС в течение 24 ч.

**Трансформация с помощью ИМК.** Гранулы отделяли от питательной среды с помощью мелкоячеистого сита, ресуспендировали в свежей КГС, содержащей 4 г/л АД и 4% диметилформамида (ДМФА), и помещали на качалку для проведения трансформации.

Об окончании реакции судили с помощью ТСХ. После завершения трансформации гранулы отделяли от среды, промывали физраствором, суспендировали повторно в свежей КГС с АД и аналогично осуществляли все последующие циклы трансформации. В случае невозможности осуществления следующего цик-

ла после окончания предыдущей трансформации гранулы помещали в физраствор и хранили при +4°C 48–72 ч.

**Трансформация в колбах.** Для трансформации стероидов с нагрузкой 0.5–4.0 г/л использовали культуру *R. erythropolis* ВКПМ Ас-1740 в возрасте 22–24 ч, которую вносили в количестве 20 об. % в колбы с КГС и стероидом. Стероид вносили в охлажденную КГС в виде микрокристаллов (до 20 мкм) в растворе ДМФА или в виде комплекса с метилированным по случайным положениям циклодекстрином (МЦД).

**Трансформация в ферментере и выделение 9-ОН-АД.** Процесс гидроксилирования АД осуществляли в ферментере общим объемом 15 л, рабочий объем 6 л, скорость вращения мешалки 800–900 об/мин, концентрация растворенного кислорода (рО<sub>2</sub>) до 70% от насыщения, среда КГС с 20–25 г/л глюкозы (дробное внесение), pH 7.4–7.6, АД (98%-ного содержания, 60 г), температура 27.5–28.2°C, избыточное давление ( $\Delta P$ ) 0.1–0.15 мПа. АД добавляли в КГС в виде пасты стероида, переосажденного в воду из раствора в ДМФА.

Биомассу *R. erythropolis* объемом 2 л вносили дробно с интервалом 10–12 ч. Для получения указанного объема декантировали 4 л культуральной жидкости, находившейся в течение 100–120 ч в холодильнике при +4°C. Вместе со второй порцией биомассы вносили глюкозу в количестве 10 г/л. При необходимости через 10 ч вносили еще одну порцию глюкозы в количестве 5 г/л. По окончании процесса трансформации АД (через 35 ч) культуральную жидкость, pH которой доводили до 3.0, три раза экстрагировали 18 л этилацетата равными объемами. Экстракты объединяли и обрабатывали активированным углем (12 г). Экстракт отфильтровывали от угля и упаривали на роторном испарителе. Остаток после упаривания (62.5 г) в течение 30 мин обрабатывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> при перемешивании. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтрального pH, затем промывали эфиром порциями по 70 мл 3 раза. Осадок сушили при 65°C и получали 53.85 г 9-ОН-АД 98.6%-ного содержания, т. пл. 222–224°C (лит. данные 221–224°C [8]).

**Анализ продуктов реакции.** Конечное содержание в реакционной смеси 9-ОН-АД, образуемого ИМК, оценивали с помощью ВЭЖХ на хроматографе (“Gilson”, США) при 254 нм. Колонка с Silasorb C-18 (4.0 × 250 мм), зернение 10 мкм. Скорость потока 0.8 мл/мин. Подвижная фаза MeOH–H<sub>2</sub>O (70 : 30).

Выход 9 $\alpha$ -гидроксипроизводных, образуемых растущими клетками, определяли по количеству выделенного кристаллического продукта. О ходе процесса и его окончании судили с помощью ТСХ на пластинках “Sorbfil” (“Imid Ltd”, Россия), система хлороформ–ацетон 7 : 3. Строение полученных гидроксистероидов устанавливали сравнением с за-

**Таблица 1.** Гидроксилирование стероидов ряда андростана и прегнана культурой *R. erythropolis* Ac-1740

Трансформируемый стероид	Нагрузка, г/л	Способ внесения	Время трансформации, ч	9 $\alpha$ -гидрокси-производное	
				Выход %	T <sub>пл.</sub> , °C
Андростендион (АД, I),	4.0	в ДМФА	22–24	95	222–224
	10.0		32–36	85	
Тестостерон (II)	1.0	микрористаллы	18–20	85*	221–223
Циангидрин-I (III)	0.5	микрористаллы	18–20	46*	220–223
14 $\alpha$ -гидрокси-АД (IV)	1.0	в ДМФА	18–20	85	238–242
19-нортестостерон (V)	1.0	комплекс с МЦД	19–20	65**	218–223
Спиродиен (VI)	4.0	комплекс с МЦД	15–16	60	240 с разложением
17 $\alpha$ -метил-тестостерон (VII)	4.0	комплекс с МЦД	20–22	70	192–194
		в ДМФА	24–26	70	
17 $\alpha$ -гидрокси-прогестерон (VIII)	1.0	комплекс с МЦД	19–20	57	250–253
16-дегидро-прогестерон (IX)	1.0	комплекс с МЦД	17–19	50	***
Кортексолон (X)	2.0	в ДМФА	20–22	80	>250
16 $\alpha$ -метил кортексолон (XI)	2.0	в ДМФА	24–26	85	255-257
	4.0		46–48	55	

\* Продукт 9 $\alpha$ -гидрокси-АД.

\*\* Продукт 9 $\alpha$ -гидрокси-19-нор-АД.

\*\*\* 9 $\alpha$ -гидрокси-16-дегидропрогестерон получен в смеси с продуктом восстановления 20-кетогруппы.

ведомыми образцами. При отсутствии таковых – определяли методом ПМР-спектроскопии. Спектры снимали на приборе “Varian”-400 (США) в CDCl<sub>3</sub>.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены данные трансформации  $\Delta^4$ -3-кетостероидов ряда андростана: АД (I), тестостерон (ТС, II), циангидрин-АД (III), 14 $\alpha$ -гидрокси-АД (IV), 19-нор-ТС (V), 17 $\beta$ -гидрокси-3-кето-4,6-андростадиен-17 $\alpha$ -пропионовой кислоты  $\gamma$ -лактон (спиродиен, VI), 17 $\alpha$ -метил-ТС (VII) и ряда прегнана: 17 $\alpha$ -гидрокси-прогестерон (VIII), 16-дегидропрогестерон (IX), кортексолон (“S”, X), 16 $\alpha$ -метил-“S” (XI).

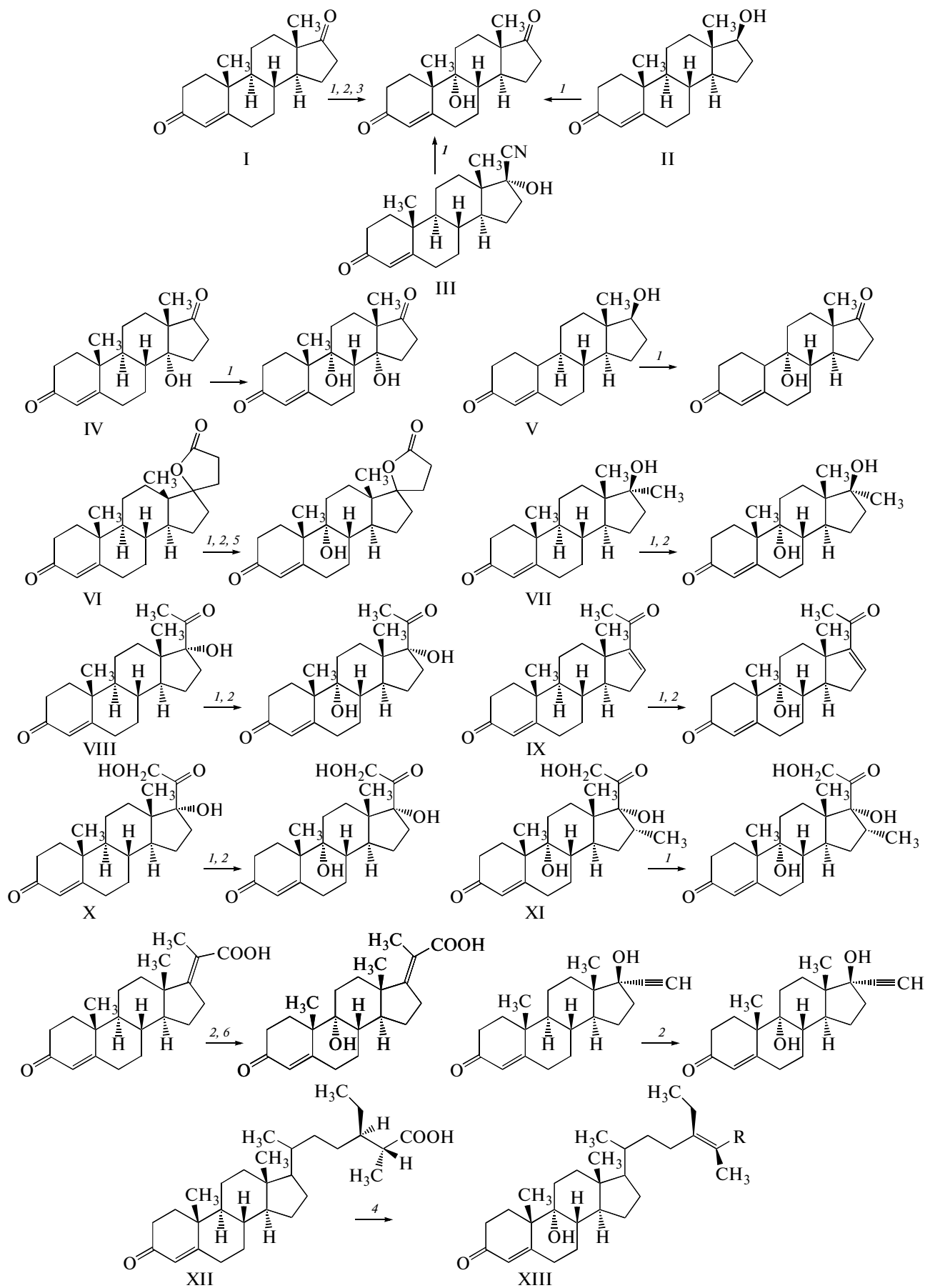
Количество стероидов, указанных в табл. 1, было определено с учетом их растворимости в водной среде и доступности для культуры родококка. Подбор индивидуальных оптимальных условий гидроксилирования I, VI, VII и X (способ внесения стероида, плотность биомассы, концентрация глюкозы, интенсивность аэрации) позволил сократить время

трансформации и увеличить содержание в среде указанных стероидов с 1.75 г/л [8] до 4.0–10 г/л.

Условия, определенные опытами в колбах, подтверждены результатами трансформации 10 г/л I в виде аморфных частиц в ферментере, для увеличения доступности которых к клеткам бактерии в среду добавляли ДМФА. При внесении посевного материала (7.2 г/л на 6 л жидкости по весу сухой биомассы) трансформация 60 г АД полностью заканчивалась через 32–36 ч с выходом кристаллического 9-ОН-АД 85% и чистотой 98.6% согласно ВЭЖХ-анализу.

Результаты трансформации соединений I и XI отражают зависимость эффективности процесса от структуры трансформируемого стероида. В случае I увеличение его количества в трансформационной среде незначительно влияло на выход целевого кристаллического продукта, тогда как при увеличении количества XI всего лишь в 2 раза выход 9-гидроксипроизводного уменьшался на 30% (табл. 1).

Природа заместителей при положении C17 в кольце D всех исследуемых стероидов (рис. 1) не оказывала влияния на направленность гидроксилирования



**Рис. 1.** Структура стероидных субстратов и продуктов трансформации, полученных с помощью: 1 – *R. erythropolis* Ac-1740, 2 – *N. canincuria* ATCC 31548 [8], 3 – *Rhodococcus* sp. [10] 4 – *Mycobacterium* sp. [21], 5 – *R. equi* ATCC 21329 [25], 6 – *Mycobacterium* sp. [6, 12]. Обозначения I–XIII см. в тексте.

культурой *R. erythropolis* Ac-1740. Моно-9 $\alpha$ -гидроксилирование протекало с образованием соответствующих гидроксипроизводных без накопления побочных соединений. Однако трансформация ТС и 19-нор-ТС сопровождалась дополнительным окислением 17-гидроксигруппы и образованием соответственно 9-ОН-АД и 9 $\alpha$ -гидрокси-19-нор-АД. Циангидринная группировка в III легко элиминировалась в условиях проведения ферментации, и конечным продуктом трансформации был также 9-ОН-АД (рис. 1). Трансформация III явилась единственным примером 9 $\alpha$ -гидроксилирования с низким выходом продукта реакции – не более 50% и высоким содержанием неконвертируемого АД. По-видимому, накапливающиеся в результате снятия циангидринной защиты цианиды ингибировали действие 9 $\alpha$ -гидроксилазы. У прегнанов восстановление кетогруппы наблюдалось лишь при трансформации IX, однако в этом случае, в отличие от III, имела место полная конверсия субстрата в 9 $\alpha$ -гидроксипроизводное.

Анализ литературных данных по гидроксилированию стероидов показал, что, в отличие от бактериального процесса, при гидроксилировании грибами наблюдается наличие определенной зависимости направления вводимой гидроксигруппы от структуры стероидной молекулы. Например, при замене 17-кетогруппы на гидроксильную, т.е. замене I на II, вместо образования 14 $\alpha$ -гидрокси-АД мицелием *Curvularia lunata* накапливался 11 $\beta$ -гидрокси-ТС [3, 19].

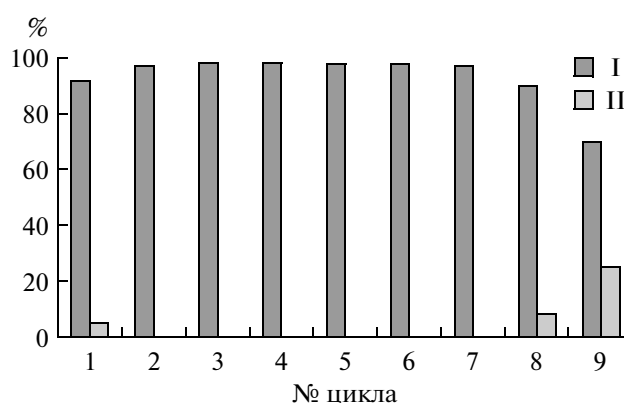
Высокая степень конверсии прегнанов в 9 $\alpha$ -гидроксипроизводные культурами *R. erythropolis* Ac-1740 и родительского штамма [10], вероятно, связана с неспособностью клеток расщеплять боковую цепь при С17. Вследствие этого родококк не трансформировал холестерон и фитостерин в 9 $\alpha$ -гидроксисоединения, которые были получены в результате полного или частичного расщепления боковой цепи стероидов некоторыми мутантными штаммами актинобактерий родов *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* [5, 6, 11, 12, 20]. Условием образования 9 $\alpha$ -гидроксисоединений указанными бактериями являлось наличие кислородного заместителя в модифицированной боковой цепи. Так, генетически измененная микобактерия [20] конвертировала ситостерин сначала в  $\Delta^4$ -3-кето-стигмастен-26-овую кислоту XII, которая затем служила предшественником 9 $\alpha$ -гидроксипроизводного XIII (рис. 1).

Еще в 1973 г, интерпретируя результаты трансформации стероидов грибами, проф. Джонс предложил триангулярную модель гидроксилирования [21]. Согласно этой модели, подробно рассматриваемой в обзорах [3, 22–24], ориентированное гидроксилирование стероидной молекулы происходит при участии двух кислородсодержащих заместителей, кото-

рые выполняют функцию фиксации фермента с субстратом. При наличии только одного центра связывания, закрепленная на ферменте молекула как бы “раскачивается” вокруг центра связывания, подвергая каталитическому действию гидроксилазы непредсказуемые положения полициклической стероидной системы [21].

Анализ результатов, полученных с *R. erythropolis* Ac-1740, и литературных данных [5–12] дает основание считать, что для направленного гидроксилирования стероидов бактериями, так же, как и грибами, необходимо наличие в молекуле более одного кислородного заместителя. Также следует заметить, что данные, представленные в табл. 1, и результаты гидроксилирования стероидов с помощью *N. canincuria* и *Rhodococcus* sp. [8, 10, 25] свидетельствуют о способности актинобактерий вводить 9 $\alpha$ -гидроксигруппу в стероидную молекулу независимо от ее строения (рис. 1).

При осуществлении трансформации с помощью *R. erythropolis* Ac-1740 отсутствует необходимость соблюдения строгой стерильности процессов, что существенно для получения 9-гидроксисоединений в промышленном масштабе. Кроме того, декантированная биомасса может не менее 1 мес храниться при 4 $^{\circ}$ C без потери гидроксилазной активности. Все это позволило получить для 9 $\alpha$ -гидроксилирования биокатализатор длительного действия в виде ИмК. В качестве носителя был выбран криогель ПВС, хорошо зарекомендовавший себя во многих микробиологических процессах [16] и, в частности, как гелевая матрица для иммобилизованных клеток, осуществляющих 1,2-дегидрирование стероидов [26, 27].



**Рис. 2.** Конверсия АД в количестве 4 г/л в 9-ОН-АД в зависимости от длительности применения ИмК *R. erythropolis* Ac-1740. I – 9-ОН-АД, II – АД.

**Таблица 2.** Содержание 9-ОН-АД в конце трансформационных циклов (ИмК)

№ цикла	Интервал между циклами		Время трансформации, ч	9-ОН-АД, %	АД, %
	время, ч	№/№ цикла			
1			20	92	5
2	72*	1/2	23	97	—
3	1	2/3	24	98	—
4	1	3/4	24	98	—
5	48*	4/5	22	98	—
6	1	5/6	22	98	—
7	1	6/7	23	97	—
8	1	7/8	23	90	8
9	72*	8/9	25	70	25

\* Хранение при +4°C.

\*\* Прочерк означает отсутствие субстрата.

В результате включения бактерии *R. erythropolis* Ас-1740 в криогель ПВС нами был получен гранулированный биокатализатор, далее использованный в нескольких последовательных циклах трансформации АД.

Было проведено 9 циклов трансформации I, продолжительность каждого из которых составила 20–25 ч (табл. 2). Таким образом, период использования ИмК составил 403 ч, из них общее время трансформации 206 ч и время нахождения ИмК в нерабочем состоянии 197 ч. В шести циклах (2–7) трансформация закончилась без остаточного АД. В 9-ом цикле активность ИмК уменьшилась примерно на 30% (рис. 2).

Точная причина такого явления нами пока не установлена, хотя снижение активности различных ИмК с увеличением числа рабочих циклов в периодических биотрансформационных процессах вполне обычный эффект, как правило, связанный с постепенным исчерпанием резерва кофакторов, если между циклами не проводится инкубация иммобилизованного биокатализатора в культуральной среде [28]. Для микробных клеток (*Citrobacter intermedius*, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*), включенных в макропористый криогель ПВС, аналогичный эффект в одноферментных биотрансформациях тоже известен [29–32]. В дальнейшем предполагается изучить оптимальные условия хранения ИмК и поддержания их максимальной 9 $\alpha$ -гидроксилазной активности.

Полученные результаты позволяют рассматривать ИмК *R. erythropolis* Ас-1740 как эффективный биокатализатор многократного действия, снижаю-

щий “потребление” биомассы, существенно облегчающий выделение продукта реакции и хранения культуры, что особенно важно для целей масштабирования. Следует также отметить, что в отличие от ранее известного иммобилизованного биокатализатора 1,2-дегидрирования стероидов [25, 26], где в качестве носителя клеток также использовался криогель ПВС, описанная в данной работе новая биокаталитическая система обладала значительно более широкими возможностями в отношении субстратной специфичности, что позволяет получать большой спектр стероидных производных, необходимых для создания новых медицинских препаратов, как было продемонстрировано на примере трансформации соединений I–XI (рис. 1).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tong W.-Y., Dong X.* // Recent Pat. Biotechnol. 2009. V. 3. № 2. P. 141–153.
2. *Zaks A., Dodds D.R.* // Drug Discov. Dev. 1998. V. 1. № 3. P. 290–303.
3. *Holland H.L.* // Steroids. 1999. V. 64. № 3. P.178–186.
4. *Breslow R., Jan J., Belvedere S.* // Tetrahedron Lett. 2002. V. 43. № 3. P. 363–365.
5. *Imada Y., Misuno S.* // Патент США. 1981. № 4255344.
6. *Slijkhuis H., Marx A.F.* // Патент США. 1994. № 5298398.
7. *Донован М.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 41. № 1. С. 1–14.
8. *Marsheck W.J., Jui J., Wang P.T.* // Патент США. 1983. № 4397947.



9. *Fernandes P., Cruz F., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S.* // *Enz. Microb. Technol.* 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
10. *Datcheva V.K., Voishvillo N.E., Kamernitskii A.V., Vlachov R.J.* // *Steroids.* 1989. V. 54. № 3. P. 271–287.
11. *Knight J.C., Wovcha M.G.* // *Steroids.* 1980. V. 36. № 6. P. 723–730.
12. *Jekkel A., Csajagi E., Ilkoy E., Ambrus G.* // *J. Gen. Microbiol.* 1989. V. 135. № 6. P. 1727–1733.
13. *Ван дер Гейзе Р., Хесселс Г., Дейкхейзен Л.* // Патент РФ № 2268935 // Б.И. 2006. № 03.
14. *Войшвилло Н.Е., Родина Н.В., Андриюшина В.А., Стыценок Т.С., Скрябин К.Г.* Патент РФ № 2351645 // Б.И. 2009. № 10.
15. *Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* А.с. № 1400071 // Б.И. 1988. № 20.
16. *Lozinsky V.I., Plieva F.M.* // *Enzyme Microb. Technol.* 1998. V. 23. № 3/4. P. 227–242.
17. *Лозинский В.И., Зубов А.Л.* // Патент РФ № 2036095 // Б.И. 1995. № 15.
18. *Savina I.N., Hanora A., Plieva F.M., Galaev I.Yu., Mattiasson B., Lozinsky V.I.* // *J. Appl. Polym. Sci.* 2005. V. 95. № 3. P. 529–538.
19. *Андриюшина В.А., Дружинина А.В., Ядерец В.В., Стыценок Т.С., Войшвилло Н.Е.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 1. С. 69–74.
20. *Ambrus G., Ilkoy E., Horvath G., Podanyi B., Vocskai Z., Gyurky S., Jekkel A.* // *Tetrahedron Lett.* 1992. V. 33. № 36. P. 5267–5268.
21. *Jones E.R.H.* // *Pure Appl. Chem.* 1973. V. 33. № 1. P. 39–52.
22. *Holland H.L.* // *Chem. Soc. Reviews.* 1982. V. 11. № 4. P. 371–395.
23. *Турута А.М., Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.В.* // *Успехи химии.* 1992. Т. 61. № 10. С. 1883–1932.
24. *Holland H.L.* // *Adv. Appl. Microbiol.* 1997. V. 44. P. 125–165.
25. *Preisig C.L., Laakso J.A., Mocek U.M., Wang P.T., Baez J., Byng G.* // *J. Nat. Prod.* 2003. V. 66. № 3. P. 350–356.
26. *Fokina V., Susina N., Arinbasarova A.Y., Zubov A.L., Lozinsky V.I., Koshcheenko K.A.* // *Immobilized Cells: Basics and Applications* / Ed. R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, J. Tramper. Amsterdam: Elsevier Sci., 1996. P. 90–97.
27. *Фокина В.В., Аринбасарова А.Ю., Зубов А.Л., Лозинский В.И., Кощенок К.А.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1995. Т. 31. № 2. С. 213–219.
28. *Nedovic V., Willaert R.* // *Application of Cell Immobilisation Biotechnology. Ser. Focus on Biotechnology.* Berlin–Heidelberg–New York: Springer, 2005. V. 8B. P. 573.
29. *Lozinsky V.I., Faleev N.G., Zubov A.L., Ruvinov S.B., Antonova T.A., Vainerman E.S., Belikov V.M., Rogozhin S.V.* // *Biotechnol. Lett.* 1989. V. 11. № 1. P. 43–48.
30. *Алебян Г.П., Арзуманов Е.Н., Мкртчян М.Б., Тозалакян П.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С., Рогожин С.В.* // *Биотехнология.* 1990. № 6. С. 29–32.
31. *Ariga O., Sano T., Sano Y.* // *Ferment. Bioeng.* 1993. V. 76. № 3. P. 203–206.
32. *Bielecki S., Bolek R.* // *Immobilized Cells: Basics and Applications* / Ed. R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper. Amsterdam: Elsevier Sci., 1996. P. 472–478.

## Transformation of $\Delta^4$ -3-Ketosteroids by Free and Immobilized Cells of *Rhodococcus erythropolis* Actinobacterium

N. V. Karpova<sup>a</sup>, V. A. Andryushina<sup>a</sup>, V. V. Yaderetz<sup>a</sup>, A. V. Druzhinina<sup>a</sup>, T. S. Stytsenko<sup>a</sup>,  
B. L. Shaskol'skiy<sup>b</sup>, V. I. Lozinsky<sup>b</sup>, Luu Duc Huy<sup>c</sup>, and N. E. Voishvillo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312, Russia*  
e-mail: andrushina@rambler.ru

<sup>b</sup> *Nesmeyanov Institute of Elementoorganic Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991*

<sup>c</sup> *Laboratory of Steroids, Institute of Chemistry, Vietnamese Academy of Sciences and Technology, Hanoi 7/1*

Received August 16, 2010

**Abstract**—9 $\alpha$ -Hydroxy derivatives were prepared from 11 steroids of androstane and pregnane series using *Rhodococcus erythropolis* VKPM Ac-1740 culture with 0.5–20 g/l substrate concentration in the reaction mixture. 9 $\alpha$ -Monohydroxylation proceeded regardless of the substituent structure at C17. However, the structure of the steroid molecule influenced the time of complete conversion of the substrate and the yield of the transformation product. 9 $\alpha$ -Hydroxy-androstenedione was obtained in 35 h in a yield of 85% when the maximum concentration of androstenedione (AD) was 10 g/l. 9 $\alpha$ -Hydroxy-AD was also formed by the actinobacterium cells entrapped in poly(vinyl alcohol) cryogel beads. Nine successive transformation cycles were carried out using immobilized cells at 4.0 g/l concentration of AD in the medium. The yield of 9 $\alpha$ -hydroxy-AD formed during six cycles (from two to eight with the duration of each cycle for 22–24 h) was 98%.

УДК 759.873.088.5:661.185

## МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 НА ГЕКСАДЕКАНЕ

© 2011 г. Т. П. Пирог\*, С. В. Игнатенко\*\*

\*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03680

\*\*Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01601

e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Поступила в редакцию 08.09.2010 г.

Исследованы особенности синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) при периодическом культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 в ферментере АК-210 на среде с н-гексадеканом. Максимальные показатели синтеза ПАВ (концентрация внеклеточных ПАВ – 7.2 г/л, индекс эмульгирования культуральной жидкости – 50%, выход ПАВ 50% от субстрата) наблюдались при концентрации растворенного кислорода 60–70% от насыщения, pH 8.0, дробной подаче субстрата порциями по 0.3–0.4% каждые 5–6 ч до конечной концентрации 2.4% и использовании 10% инокулята, выращенного до середины экспоненциальной фазы на среде с 1.0% н-гексадекана. Реализация процесса биосинтеза ПАВ на ферментационном оборудовании дала возможность повысить почти в 2 раза количество синтезированных ПАВ и сократить в 3.5 раза длительность культивирования продуцента по сравнению с выращиванием в колбах на качалке.

Из загрязненных нефтью образцов почвы нами выделен штамм нефтеокисляющих бактерий, идентифицированный как *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 [1]. Установлена возможность очистки воды от нефти (100 мг/л) иммобилизованными на керамзитовыми клетками *R. erythropolis* ЭК-1 [1] и интенсификации процесса деградации нефти накопительной культурой нефтеокисляющих микроорганизмов при введении в нее активного углеводородокисляющего штамма ЭК-1 [2]. Показано, что при росте на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (глюкоза, этанол) субстратах *R. erythropolis* ЭК-1 образует поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые по химической природе являются комплексом нейтральных липидов и гликолипидов (трегалозомоно- и димиколаты) [3]. Изучение особенностей метаболизма н-гексадекана у штамма ЭК-1 позволило установить условия культивирования бактерий, обеспечивающих повышение синтеза ПАВ [4]. Так, снижение в среде культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 концентрации катионов калия (ингибиторы алкангидроксилазы и НАДФ<sup>+</sup>-зависимой альдегиддегидрогеназы), повышение содержания катионов натрия (активаторы этих ферментов) и железа, необходимого для функционирования алкангидроксилазы, сопровождалось увеличением активности ферментов метаболизма н-гексадекана, а также повышением в 4 раза количества синтезированных ПАВ.

Показатели синтеза ПАВ на н-гексадекане, установленные для *R. erythropolis* ЭК-1, сравнимы с синтезирующей способностью родококков, описанных в литературе [5–7]. Однако по сравнению с другими

представителями рода *Rhodococcus* селекционированный нами штамм имеет следующие преимущества: 1) способен синтезировать ПАВ на среде с общим содержанием солей 3.15 г/л (для других родококков – до 10 г/л); 2) не требует наличия в среде микроэлементов и дрожжевого экстракта; 3) синтезирует ПАВ с более высоким выходом от субстрата.

Необходимым этапом разработки технологии микробного синтеза является масштабирование процесса на ферментационном оборудовании. Культивирование продуцента в ферментере позволяет также исследовать влияние на биосинтез таких важных параметров, как аэрация, скорость перемешивания, режим внесения субстрата, pH и др., что позволяет повысить эффективность технологии.

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных исследованиям микробных поверхностно-активных веществ [5–10], сведения о масштабировании технологий их биосинтеза либо об особенностях образования этих продуктов микробного синтеза при культивировании микроорганизмов-продуцентов в лабораторных биореакторах немногочисленны [5, 11–15]. Первые такие сообщения появились в конце 70-х–середине 80-х годов XX века и касались масштабирования процессов биосинтеза поверхностно-активных трегалозолипидов [16] и рамнолипидов [17, 18]. Позже сведения о культивировании в биореакторах бактерий рода *Rhodococcus*–продуцентов ПАВ были обобщены в обзоре [5].

Отметим, что на сегодняшний день масштабированы многие технологии получения микробных ПАВ на различных промышленных отходах или

продуктах переработки растительного сырья [11, 15, 19, 20]. Так, при культивировании *Bacillus subtilis* LB5a в 40 л ферментере на отходах производства муки из маниоки количество синтезированных липопептидов через 12 ч достигало 10 г/л [15]. Выращивание *Pseudozyma* (ранее *Candida*) *antarctica* ATCC 20509 — продуцента маннозоэритрит-липидов в биореакторе (2 л) на среде, содержащей 80 г/л соевого масла, сопровождалось синтезом 46 г/л гликолипидов [11]. Выход софоролипидов от субстрата при периодическом культивировании *Candida bombicola* ATCC 22214 на среде, содержащей кукурузную муку (100 г/л) и глюкозу (100 г/л) в ферментере (3 л), составлял 60% [19]. Выращивание *Pseudomonas* sp. DSM 2874 в 2 л реакторе с дробным внесением субстрата (рапсовое масло) дало возможность повысить синтез рамнолипидов до 45 г/л [20].

На сегодняшний день в литературе имеются немногочисленные сведения об особенностях культивирования в биореакторах бактерий рода *Rhodococcus*—продуцентов поверхностно-активных веществ. Возможно, одной из причин этого является тот факт, что ПАВ-синтезирующая способность родококков несколько ниже, чем продуцентов других гликолипидов (рамно-, софоро- маннозоэритрит-липиды). Кроме того, недостатком представителей рода *Rhodococcus* как продуцентов ПАВ является их медленный рост и, как следствие, длительный процесс биосинтеза целевого продукта. Так, при культивировании *R. erythropolis* ATCC 4277 в течение 51 ч в ферментере объемом 1.5 л на среде с глицерином (15 г/л) количество синтезированных ПАВ составляло всего лишь 1.7 г/л [13]. При использовании в качестве источника углерода *n*-алканов (20 г/л) количество ПАВ, синтезируемых *R. erythropolis* DSM 43215 в биореакторе (50 л) за 36–38 ч роста, достигало 2 г/л [16], а при культивировании этого же штамма в 20 л ферментере в течение 160 ч на среде, содержащей 100 г/л *n*-алканов — 32 г/л [5]. Штамм *R. erythropolis* SD-74 через 240 ч культивирования в биореакторе объемом 5 л синтезировал из 80 г/л *n*-гексадекана до 40 г/л поверхностно-активных липидов [5]. В большинстве случаев высокая концентрация ПАВ была достигнута в результате синтеза этих соединений покоящимися или иммобилизованными клетками бактерий рода *Rhodococcus*.

Отметим, что недавно появились сообщения о быстрорастущем штамме *Rhodococcus* sp. Moj-3449, который характеризовался высокой скоростью роста (до 0.2 ч<sup>-1</sup>) на средах, содержащих до 180 г/л алканов или сырой нефти [21]. Однако в данной работе нет информации о способности штамма Moj-3449 к синтезу ПАВ.

Цель работы — установление оптимальных условий синтеза поверхностно-активных веществ при периодическом культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 в лабораторном ферментере АК-210.

## МЕТОДИКА

**Объект исследований.** Объект исследования — штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины под номером ИМВ Ас-5017.

**Состав сред и условия культивирования *R. erythropolis* ЭК-1.** Бактерии выращивали на модифицированной нами жидкой минеральной среде Мюнца [22] (г/л): NaNO<sub>3</sub> — 1.3, NaCl — 1.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O — 0.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0.14, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0.1, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O — 0.01, pH 6.8–7.0. В качестве источника углерода и энергии использовали *n*-гексадекан в концентрации 1.0–2.4% (по объему).

В качестве посевного материала использовали культуру в ранней и средней экспоненциальной фазе роста (22–24 и 46–48 ч соответственно), выращенную на жидкой среде указанного состава, содержащей 1.0% (по объему) гексадекана. Для получения инокулята культивирование штамма ЭК-1 осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30°C. Количество посевного материала составляло 10% от объема засеваемой среды, концентрация клеток в посевном материале — 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup>/мл.

Культивирование бактерий осуществляли в ферментере АК-210 (Пушино, Россия) объемом 10 л (рабочий объем 7 л) в течение 40–100 ч при 28°C. В начале процесса скорость перемешивания составляла 250 об/мин, расход воздуха 0.2 л/л среды в мин. В процессе культивирования скорость перемешивания увеличивали до 380–400 об/мин, а расход воздуха — до 1.2 л/л среды в мин для поддержания концентрации растворенного кислорода (рO<sub>2</sub>) на уровне 20–80% (от насыщения кислородом воздухом).

Для предупреждения коагуляции бактериальных клеток и налипания биомассы на стенки ферментера в одном из вариантов в среду культивирования дополнительно вносили препарат химопсин (смесь протеолитических ферментов трипсина и химотрипсина) в концентрации 0.025 и 0.05 мг/л.

В течение процесса культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 значение pH поддерживали на уровне 7.0, 7.5, 8.0 и 8.5 подкислением 1 н. раствором HCl или подщелачиванием 1 н. раствором NaOH.

При исследовании влияния способа подачи субстрата на рост *R. erythropolis* ЭК-1 и биосинтез ПАВ начальную концентрацию *n*-гексадекана в среде снижали до 0.1–0.4% (по объему). В процессе культивирования бактерий осуществляли дробное внесение *n*-гексадекана порциями по 0.2–0.5% каждые 3–8 ч до конечной концентрации субстрата 2.0–2.4%.

Массообменные характеристики ферментера при различных режимах аэрации и перемешивания определяли по сульфитному числу (K<sub>S</sub>), которое анализировали, как описано в работе [23].

### Определение показателей роста и синтеза ПАВ.

Сухую биомассу определяли весовым методом. Перед осаждением клеток (центрифугирование при 5000 g 20 мин, на центрифуге ОПН-8 (Россия) осуществляли двухкратную отмывку культуральной жидкости гексаном для удаления остаточного гексадекана. Необходимость этой операции обусловлена соосаждением части гексадекана с клетками, что zvyšало значение биомассы.

Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям.

1) Поверхностное натяжение ( $\sigma_s$ ) свободной от клеток культуральной жидкости, которое измеряли с помощью полуавтоматического тензиометра ("LAUDA TD1C", Германия). Перед определением показателя  $\sigma_s$  супернатант культуральной жидкости предварительно отмывали гексаном от остатков гексадекана, который обладает поверхностно-активными свойствами и существенно снижает реальное значение поверхностного натяжения.

2) Для экспресс-оценки количественного содержания ПАВ в культуральной жидкости использовали показатель условной концентрации ПАВ (ПАВ\*), который определяли как степень разведения свободной от клеток культуральной жидкости (супернатант) до точки ККМ (критическая концентрация мицеллообразования). Строили график зависимости поверхностного натяжения  $\sigma_s$  от значения логарифма разведения супернатанта. Абсцисса точки перегиба кривой соответствует значению ПАВ\*. Условная концентрация ПАВ выражается в безразмерных единицах [3, 4].

3) Индекс эмульгирования ( $E_{24}$ , %) культуральной жидкости. К 5 мл культуральной жидкости добавляли 5 мл подсолнечного масла (эмульгируемый субстрат) и встряхивали в течение 2 мин. Измерение индекса эмульгирования определяли через 24 ч, как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в пробирке, и выражали в процентах.

4) Количество внеклеточных ПАВ определяли весовым методом после экстракции их смесью хлороформа и метанола (2 : 1) из супернатанта культуральной жидкости. Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин.

В цилиндрическую делительную воронку объемом 100 мл помещали 25 мл супернатанта, добавляли 5 мл 1 н. раствора HCl, воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали 3 мин, затем добавляли 15 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и встряхивали (экстрагирование липидов) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (**органический экстракт 1**), а водную фазу подвергали повторной экстракции. При повторной экстракции к водной фазе добавляли 5 мл 1 н. раствора HCl и 15 мл смеси

хлороформа и метанола (2 : 1) и экстрагировали липиды в течение 5 мин. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая **органический экстракт 2**. На третьем этапе к водной фазе добавляли 25 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и осуществляли экстракцию, как описано выше, получая **органический экстракт 3**. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на роторном испарителе ИР-1М2 (ОАО "Химлаборприбор", Россия) при 50°C и абсолютном давлении 0.4 атм до постоянной массы.

Максимальную удельную скорость роста ( $\mu_{\text{макс}}$ ) и синтеза ПАВ ( $P_{\text{макс}}$ ) определяли по общепринятым формулам [24]. Синтезирующую способность штамма ЭК-1 оценивали как отношение количества синтезированных ПАВ (г/л) к концентрации биомассы и выражали в г ПАВ/г сухой биомассы. Выход ПАВ от субстрата определяли как отношение количества синтезированных ПАВ (г/л) к концентрации заданного субстрата (в г/л) и выражали в процентах.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло 3–5. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли по алгоритму, описанному в работе [25]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее [4] нами было показано, что при культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 в колбах на качалке в течение 168 ч на среде с 2% (по объему) н-гексадекана количество синтезированных ПАВ составляло около 4 г/л (условная концентрация ПАВ\* 4.5). Установлено, что  $K_S$  системы, обеспечивающей максимальный синтез ПАВ при выращивании штамма ЭК-1 в колбах, составляло 0.14 г  $O_2$ /л ч (300 об/мин, объем колбы 750 мл, рабочий объем 100 мл). Эксперименты показали, что  $K_S$  в ферментере достигало этого значения при начальной скорости перемешивания 250 об/мин и расходе воздуха 0.2 л/л среды в мин.

### Влияние способа подачи субстрата на синтез ПАВ.

На первом этапе масштабирования в ферментере культивирование *R. erythropolis* ЭК-1 осуществляли в условиях, обеспечивающих максимальный синтез ПАВ в колбах на качалке (состав среды, подготовка инокулята, показатель  $K_S$ ) [4]. Эксперименты показали, что высокая начальная концентрация гексадекана (2%) ингибировала рост штамма ЭК-1 и образование ПАВ. При таком режиме внесения субстрата концентрация биомассы и ПАВ не превышала 0.6–0.7 г/л даже в течение 110 ч культивирования штамма ЭК-1 в ферментере.

Известно, что эффективным способом интенсификации синтеза микробных метаболитов, в том числе и ПАВ, является дробная подача в среду отно-

сительно невысоких концентраций субстрата [14, 20, 26].

Так, например, известно, что при культивировании *Pseudomonas aeruginosa* S2 в 5 л ферментере на глюкозосодержащей среде (6%) при постоянном pH (6.8 ± 0.3) количество синтезированных рамнолипидов составляло 6 г/л [14]. Снижение начальной концентрации глюкозы до 1% с последующим дробным внесением в течение процесса культивирования до конечной концентрации 6% дало возможность увеличить синтез рамнолипидов до 9.4 г/л [14].

Наши исследования показали, что внесение в среду культивирования штамма ЭК-1 н-гексадекана порциями по 0.1% каждые 7–8 ч сопровождалось повышением в 5 раз показателя условной концентрации ПАВ (до 3.0–3.2) по сравнению с однократным внесением 2% гексадекана. Однако при этом продолжительность лаг-фазы оставалась высокой и составляла 20–25 ч.

В связи с этим на следующем этапе определяли оптимальный для синтеза ПАВ режим внесения субстрата. Эксперименты показали, что повышение начальной концентрации н-гексадекана в среде культивирования штамма ЭК-1 с 0.1 до 0.2–0.3% с последующим дробным внесением порциями по 0.2% через 7–8 ч позволило увеличить показатель условной концентрации ПАВ до 4.2 (табл. 1). При таком способе подачи субстрата наблюдали снижение продолжительности лаг-фазы до 8–10 ч. Далее определяли оптимальный промежуток времени между внесением порций н-гексадекана. Установлено, что уменьшение интервала между подачей субстрата до 5–6 ч позволило активизировать синтез поверхностно-активных веществ (ПАВ\* 5.0) и сократить продолжительность процесса биосинтеза до 65 ч (табл. 2).

Дальнейшие эксперименты показали, что при дробном внесении н-гексадекана порциями по 0.3–0.4% в процессе культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 в ферментере АК-210 показатель ПАВ\* достигал значения 6.0 уже к 60 ч (табл. 3).

**Влияние химопсина на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1.** Характерной особенностью роста *R. erythropolis* ЭК-1 на среде с н-гексадеканом является агрегация клеток и их налипание на рабочих поверхностях реактора. Такой характер роста усложняет транспорт кислорода и субстрата в клетки бактерий. С целью получения гомогенной суспензионной культуры в начале процесса культивирования в среду вносили препарат химопсин. Известно, что подобные препараты широко используются для дезагрегации тканей и конгломератов клеток и отделения клеточного монослоя от субстрата [27, 28].

Эксперименты показали, что при наличии ферментного препарата в среде культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 не наблюдалось агрегации клеток, культуральная жидкость оставалась гомогенной в течение всего процесса биосинтеза. Однако в таких

**Таблица 1.** Зависимость синтеза ПАВ от начальной концентрации н-гексадекана в среде культивирования *R. erythropolis* ЭК-1

Начальная концентрация гексадекана, %	Индекс эмульгирования культуральной жидкости, %	ПАВ*
0.1	58 ± 2.9	3.2 ± 0.16
0.2	55 ± 2.7	4.2 ± 0.21
0.3	50 ± 2.5	4.2 ± 0.21
0.4	27 ± 1.4	2.4 ± 0.12
2.4	20 ± 1.0	0.6 ± 0.03

Примечание. Условия культивирования: pO<sub>2</sub> 20–30%; pH не регулировали; температура 28°C; субстрат добавляли порциями по 0.2% каждые 7–8 ч до конечной концентрации 2.4%; во всех вариантах длительность процесса составляла 80–85 ч.

**Таблица 2.** Зависимость синтеза ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 от интервала внесения н-гексадекана

Интервал внесения н-гексадекана, ч	Продолжительность культивирования, ч	ПАВ*
4	90	4.3 ± 0.22
5	65	5.0 ± 0.25
6	65	5.0 ± 0.25
7	80	4.2 ± 0.21

Примечание. Аналогично табл. 1, только начальная концентрация гексадекана 0.2%.

**Таблица 3.** Влияние концентрации дробно внесенного н-гексадекана на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1

Концентрация дробно внесенного гексадекана, %	Продолжительность культивирования, ч	ПАВ*
0.2	65	5.0 ± 0.25
0.3	60	6.0 ± 0.30
0.4	60	6.0 ± 0.30
0.5	90	4.2 ± 0.21

Примечание. Аналогично табл. 1, только субстрат вносили через 5–6 ч.

условиях продолжительность лаг-фазы увеличивалась до 50 ч и синтез ПАВ снижался. Так, при концентрации химопсина в среде 0.025 мг/л показатель ПАВ\* в течение всего процесса культивирования был почти в два раза ниже, чем на среде без ферментного препарата. Повышение концентрации химопсина до 0.05 мг/л не сопровождалось дальнейшим снижением условной концентрации ПАВ\*. В присутствии ферментного препарата индекс эмуль-

**Таблица 4.** Влияние фазы роста инокулята и концентрации растворенного кислорода на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1

Концентрация растворенного кислорода, %	Время выращивания инокулята, ч	Показатель процесса	
		ПАВ*	длительность лаг-фазы, ч
20–30	22–24	1.0 ± 0.05	30 ± 1.5
	46–48	6.0 ± 0.29	8 ± 0.4
60–70	22–24	0.3 ± 0.01	40 ± 2.0
	46–48	7.0 ± 0.35	0.5 ± 0.02

Примечание. Аналогично табл. 3, только субстрат вносили порциями по 0.3–0.4%. Продолжительность культивирования 60 ч.

гирования культуральной жидкости оставался постоянным и не превышал 30–40%.

**Влияние качества инокулята и концентрации растворенного кислорода на синтез ПАВ.** Независимо от концентрации растворенного кислорода в среде при использовании инокулята из ранней экспоненциальной фазы роста показатели синтеза ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 были невысокими (максимальное значение условной концентрации ПАВ достигало всего лишь 0.3–1.0 к 60 ч культивирования), а длительность лаг-фазы составляла 30–40 ч (табл. 4). Отметим, что в случае применения посевного материала из ранней экспоненциальной фазы повышение  $pO_2$  до 60–70% сопровождалось снижением уровня биомассы и ПАВ по сравнению с культивированием штамма ЭК-1 при более низкой концентрации растворенного кислорода (табл. 4).

Использование инокулята из середины экспоненциальной фазы (46–48 ч роста) сопровождалось существенным повышением показателей синтеза ПАВ (табл. 4). Максимальное значение условной концентрации ПАВ (7.0) наблюдалось при  $pO_2$  60–70%. В таких условиях наблюдали интенсивный рост штамма, длительность лаг-фазы составляла всего 0.5 ч, а синтез ПАВ начинался с первых часов куль-

тивирования продуцента. При  $pO_2$  20–30% показатель ПАВ\* к 60 ч роста достигал значения 6.0, однако продолжительность лаг-фазы увеличивалась до 8 ч. Отметим, что культивирование бактерий при высоких концентрациях растворенного кислорода позволило существенно уменьшить агрегацию клеток и их налипание на стенки ферментера.

Учитывая, что концентрация клеток в посевном материале из разных фаз роста является различной, на следующем этапе исследовали зависимость синтеза ПАВ (при  $pO_2$  20–30 и 60–70%) от физиологического состояния инокулята, стандартизованного по начальному количеству клеток ( $10^4$ /мл). Результаты экспериментов полностью подтвердили установленные ранее закономерности (см. табл. 4), свидетельствующие о зависимости синтеза ПАВ как от концентрации растворенного кислорода, так и от физиологического состояния посевного материала (но не количества клеток в нем).

**Влияние pH на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1.** В предыдущих экспериментах культивирование *R. erythropolis* ЭК-1 осуществляли без регуляции pH. Начальное значение pH среды составляло 6.8–7.0, затем постепенно повышалось до 8.2–8.4 к середине экспоненциальной фазы роста и оставалось на таком уровне до конца процесса культивирования штамма ЭК-1. Поскольку для большинства продуцентов оптимальным для синтеза ПАВ является pH, близкое к нейтральному [5, 6], на следующем этапе исследовали образование метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами в зависимости от pH среды, которое поддерживали постоянным в процессе культивирования *R. erythropolis* ЭК-1.

Как видно из представленных в табл. 5 данных, выращивание штамма ЭК-1 при pH 8.0 сопровождалось интенсификацией синтеза ПАВ. В таких условиях культивирования концентрация внеклеточных ПАВ, удельная скорость их синтеза и ПАВ-синтезирующая способность были максимальными (7.2 г/л, 0.43 ч<sup>-1</sup> и 4.2 г ПАВ/г биомассы соответственно), а выход ПАВ от субстрата достигал 50% (табл. 5).

**Таблица 5.** Зависимость показателей роста и синтеза ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 от pH

pH	$\mu_{\text{макс}}$ , ч <sup>-1</sup>	ПАВ, г/л	$P_{\text{макс}}$ , ч <sup>-1</sup>	$E_{24}$ , %	ПАВ-синтезирующая способность, г/г биомассы	Выход ПАВ, % (от субстрата)
7.0	0.13 ± 0.01	2.1 ± 0.11	0.13 ± 0.01	100 ± 5.0	1.1 ± 0.05	14.8 ± 0.7
7.5	0.12 ± 0.01	4.2 ± 0.21	0.20 ± 0.01	68 ± 3.0	2.0 ± 0.10	29.3 ± 1.4
8.0	0.10 ± 0.01	7.2 ± 0.36	0.43 ± 0.02	50 ± 2.0	4.2 ± 0.17	49.7 ± 2.4
8.5	0.11 ± 0.01	6.4 ± 0.32	0.21 ± 0.01	52 ± 2.0	3.2 ± 0.16	47.4 ± 2.3

Примечание. Режим внесения субстрата аналогично табл. 4. Время достижения максимальной удельной скорости роста ( $\mu_{\text{макс}}$ ) и синтеза ПАВ ( $P_{\text{макс}}$ ) во всех вариантах составляло 6 и 30 ч соответственно;  $pO_2$  60–70%; температура 28°C; длительность культивирования 48 ч; определение индекса эмульгирования проводили для нативной культуральной жидкости; субстрат для эмульгирования — подсолнечное масло.

**Таблица 6.** Сравнительные показатели синтеза ПАВ при культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 и других представителей рода *Rhodococcus* в биореакторах

Штамм, литературная ссылка	Источник углерода, концентрация, г/л	Биомасса, г/л	ПАВ			Длительность процесса, ч
			г/л	выход, % (от субстрата)	г/г биомассы	
DSM 43215 [20]	C <sub>12</sub> –C <sub>18</sub> –н-алканы; 20.0	19.0	2.0	10	0.11	38
DSM 43215 [5]	C <sub>10</sub> –н-алканы; 100	8.0	32.0	32	4.0	160
SD-74 [5]	н-гексадекан; 80.0	12.0	40.0	50	3.3	240
ЭК-1	н-гексадекан; 14.4	1.7	7.2	50	4.2	48

Снижение pH до 7.0–7.5 приводило к ингибированию синтеза ПАВ, однако максимальный индекс эмульгирования культуральной жидкости был зафиксирован при поддержании pH на уровне 7.0 (табл. 5). Эти данные свидетельствовали о преимущественном синтезе при нейтральном значении pH метаболитов с эмульгирующими, но не поверхностно-активными свойствами, а также о возможности изменения направленности процессов биосинтеза у штамма ЭК-1 в сторону образования ПАВ либо эмульгатора изменением pH.

В табл. 6 приведены сравнительные показатели синтеза ПАВ штаммом ЭК-1 и другими представителями рода *Rhodococcus* при культивировании в биореакторах на средах с н-алканами. Как видно из представленных данных, *R. erythropolis* ЭК-1 не уступает, а по некоторым показателям превосходит известные штаммы. Так, при культивировании штамма ЭК-1 в биореакторе (в установленных оптимальных условиях) синтезируются в основном внеклеточные ПАВ, в то время как для других родококков в литературе (см. табл. 6) приводится концентрация суммарных поверхностно-активных веществ (как ассоциированных с клетками, так и внеклеточных).

В работе [29] содержатся сведения о синтезе ПАВ в процессе непрерывного хеMOSTАТНОГО культивирования *R. ruber* IEGM на среде с н-гексадеканом (20 г/л). Однако в этой статье не приводятся данные количественного определения ПАВ (в г/л). Авторы оценивали уровень синтеза поверхностно-активных веществ по значению поверхностного натяжения и показателю разведения культуральной жидкости, при котором сохранялись поверхностно-активные свойства (без пересчета на условную концентрацию ПАВ), в связи с чем сравнение результатов работы [29] с данными табл. 6 не представляется возможным.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что максимальный синтез ПАВ при культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 в ферментере АК-210 наблюдался при таком способе подачи субстрата: начальная концентрация н-гексадекана в среде 0.2–0.3% с последующим дробным внесением через 5–6 ч порциями по 0.3–0.4% до ко-

нечной концентрации 2.4% (по объему). Использование такого способа подачи н-гексадекана дало возможность сократить в 2 раза продолжительность культивирования (со 110 до 60 ч) и повысить более, чем в 6 раз (с 0.6 до 6.0) условную концентрацию ПАВ\* по сравнению с одноразовым внесением субстрата. Установлено, что поддержание pH на уровне 8.0 позволяет интенсифицировать синтез метаболитов с поверхностно-активными свойствами. При дробном внесении н-гексадекана, поддержании в процессе культивирования pH на уровне 8.0 и концентрации растворенного кислорода на уровне 60–70%, а также использовании 10% инокулята, выращенного до середины экспоненциальной фазы на среде с 1.0% н-гексадекана, количество внеклеточных ПАВ через 48 ч составляло 7.2 г/л, а выход ПАВ от заданного субстрата достигал 50%.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 58–63.
2. Карпенко Е.В., Вильданова-Марцишин Р.И., Шеглова Н.С., Пирог Т.П., Волошина И.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 175–179.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 544–550.
4. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 651–658.
5. Lang S., Philp J.C. // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V. 74. № 1–3. P. 59–70.
6. Rosenberg E., Ron E.Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. № 2. P. 154–162.
7. Kuyukina M.S., Ivchina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. // J. Microbiol. Methods. 2001. V. 46. № 2. P. 149–156.
8. Mukherjee S., Das P., Sen R. // Trends in Biotechnology. 2006. V. 24. № 11. P. 509–515.
9. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. // Biotechnol. Adv. 2007. V. 25. № 1. P. 99–121.
10. Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. // J. Antimicrob. Chemother. 2006. V. 57. № 4. P. 609–618.

11. Adamczak M., Bednarski W. // *Biotechnol. Lett.* 2000. V. 22. № 1. P. 313–316.
12. Rau U., Nguyen L.A., Roepert H., Koch H., Lang S. // *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2005. V. 107. № 2. P. 373–380.
13. Ciapina E.M., Melo W.C., Santa Anna L.M., Santos A.S., Freire D.M., Pereira J.N. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006. V. 129–132. № 1–3. P. 880–886.
14. Chen S.Y., Wei Y.H., Chang J.S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 76. № 1. P. 67–74.
15. Barros F.F.C., Ponezi A.N., Pastore G.M. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 35. № 9. P. 1071–1078.
16. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. // *J. Gen. Microbiol.* 1979. V. 115. № 2. P. 491–503.
17. Guerra-Santos L., Käppeli O., Fiechter A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1984. V. 48. № 2. P. 302–305.
18. Reiling H.E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos L.H., Hirt R., Käppeli O., Fiechter A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986. V. 51. № 5. P. 985–989.
19. Pekin G., Vardar-Sukan F., Kosaric N. // *Eng. Life Sci.* 2005. V. 5, № 4. P. 357–362.
20. Trummler K., Effenberger F., Syldatk C. // *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2003. V. 105. № 2. P. 563–571.
21. Binazadeh M., Karimi I.A., Li Z. // *Enzyme Microbial Technol.* 2009. V. 45. № 1. P. 195–202.
22. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Ред. Д.Г. Звягинцев. М.: Изд-во МГУ, 1991. 303 с.
23. Процессы и аппараты пищевых производств. Лабораторный практикум / Ред. В.Н. Стабников. Киев: Вища школа, 1986. 175 с.
24. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
25. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
26. Пирог Т.П., Корж Ю.В. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2003. Т. 39. № 2. С. 180–188.
27. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 264 с.
28. Культура животных клеток. Методы / Ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. 333 с.
29. Philp J.C., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Dunbar S.A., Christofi N., Lang S., Wray V. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 59. № 2–3. P. 318–324.

## Scaling of the Process of Biosynthesis of Surfactants by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 on Hexadecane

T. P. Pirog and S. V. Ignatenko<sup>a</sup>

*Institute of Microbiology and Virusology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 03680 Ukraine*

*e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua*

<sup>a</sup> *National University of Food Technologies, Kiev, 01601 Ukraine*

**Abstract**—Peculiarities of synthesis of surface-active substances (SAS) are studied at periodical cultivation of *Rhodococcus erythropolis* EK-1 in the AK-210 fermenter on medium containing n-hexadecane. Maximum indicators of SAS synthesis (concentration of extra cellular SAS is 7.2 g/l; factor of emulsification of the cultural liquid 50%; SAS yield from the substrate 50%) have been observed at 60–70% concentration of dissolved oxygen from the saturation level with aerial oxygen (pH 8.0) fractional supply of the substrate by portions each being 0.3–0.4% every 5–6 h to a final volume concentration of 2.4% and with the use of 10% inoculate grown until mid-exponential phase on the medium with 1.0 vol % of n-hexadecane. Implementation of the process of SAS biosynthesis with the fermentation equipment provided the possibility to increase almost two-fold the amount of the synthesized SAS and reduce 3.5-fold the time of cultivation of the producer strain compared with the growth in flasks at shake-flask propagator.



УДК 579.222

## ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЭКСТРАКТОВ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ *Acinetobacter calcoaceticus* И ИХ ДЕЙСТВИЕ НА pSoxS-lux БИОСЕНСОР

© 2011 г. И. С. Сазыкин\*, В. Н. Прокофьев\*, В. А. Чистяков\*, М. А. Сазыкина\*, В. В. Внуков\*\*

\* Научно-исследовательский институт биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, 344090  
e-mail: zebra-sis@yandex.ru

\*\* Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344006

Поступила в редакцию 24.08.2010 г.

Исследована  $H_2O_2$ -люминол-индуцированная хемилюминесценция (ХЛ) и Fe(II)-индуцированная ХЛ экстрактов двух штаммов морских нефтеокисляющих бактерий *Acinetobacter calcoaceticus*, выращенных на среде, содержащей нефть, и среде без нефти. Определено действие экстрактов на биосенсор *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux). В присутствии нефти выявлен эффект усиления  $H_2O_2$ -индуцированной люминолзависимой ХЛ, что свидетельствует об увеличении уровня свободнорадикального окисления липидов. В системе Fe(II)-индуцированной ХЛ водные экстракты, полученные из микроорганизмов, выращенных в присутствии нефти, продемонстрировали усиление генерации АФК. Опыты с ацетон-этанольными экстрактами показали активизацию антиоксидантных систем обоих штаммов. Исследование в биологической системе регистрации с использованием биосенсора *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux) показало, что в составе водных экстрактов изучаемых штаммов, выращенных на среде без нефти, присутствовали вещества, способные снижать уровень свободнорадикального окисления.

В последние годы стали появляться работы [1–3], в которых рассматривается совместное применение при ремедиации загрязненных углеводородами грунтов как биологической, так и химической обработки. Последняя включает окисление поллютантов при помощи пероксида водорода или процессов, подобных реакции Фентона, протекающих при естественном рН почвы. При этом идет образование гидроксильного радикала ( $\bullet OH$ ), супероксид-анион радикала ( $O_2^{\bullet -}$ ) и гидропероксидного радикала ( $HO_2^{\bullet}$ ). В этих работах авторы отмечали заметно меньшую эффективность отдельных только химической обработки или микробиологической деградации углеводородов по сравнению с комплексной обработкой, включающей как свободнорадикальное окисление, так и последующую биodeградацию углеводородов. Кроме того, было обнаружено резкое увеличение биологической доступности и уровня деградации тяжелых фракций углеводородов. Комплексная химико-биологическая обработка происходила при естественных значениях рН почвы и в качестве биодеструкторов выступали аборигенные микроорганизмы.

Хорошо известны углеводород-редуцирующие микроорганизмы, активно выделяющие в окружающую среду пероксид водорода. Очевидна важность этого механизма для конкурентной межвидовой борьбы и показана его роль в образовании биопленок [4], но не показан потенциальный вклад в ферментативное окисление углеводородов. Образова-

ние пероксида водорода при переносе 2 электронов на молекулу кислорода характерно для некоторых ферментов, содержащих флаavin (глюкозооксидаза, ксантинооксидаза, оксидазы аминокислот). Эти ферменты восстанавливают  $O_2$  до иона пероксида  $O_2^{2-}$ , который, реагируя с протонами, образует  $H_2O_2$ . Так как ферменты, содержащие флаavin, есть у многих микроорганизмов, становится очевидным, что многие из них являются продуцентами пероксида водорода в заметных количествах и потенциально могут принимать участие в деградации углеводородов.

Косвенно в пользу продукции активных форм кислорода нефтередуцирующими микроорганизмами говорит и наличие связанных с метаболизмом углеводородов пероксидаз, индуцируемых углеводородами [5–7].

Като с соавт. [8] показали, что в термофильной бактерии *Geobacillus thermoleovorans* B23 в процессе инкубации с алканами индуцируются ацетил-КоА-оксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза. На начальном этапе  $\beta$ -окисления алканов при действии ацетил-КоА-оксидазы образуются активные формы кислорода (АФК), а каталаза и супероксиддисмутаза (СОД) защищают клетку от токсического действия АФК. Эти процессы функционально сходны с происходящими в пероксисомах эукариот.

Большой интерес в связи с этим представляет изучение прооксидантных и антиоксидантных соединений, продуцируемых нефтеокисляющими микроорганизмами.

В нашей работе представлены результаты исследования, целью которого являлся анализ вклада процессов свободнорадикального окисления в разложение нефти микроорганизмами.

Цель работы – оценка общего прооксидантного и антиоксидантного потенциала *Acinetobacter calcoaceticus* штаммов № 6 и № 13.

## МЕТОДИКА

Использованы 2 штамма микроорганизмов, отобранных на месте аварии танкера в Керченском проливе в ноябре 2007 г., идентифицированные как *Acinetobacter calcoaceticus* (№ 6 и № 13). Штаммы были выделены путем инкубации проб воды и водных экстрактов донных отложений в минеральной среде Ворошиловой–Диановой [9] ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1.0 г/л;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1.0 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0 г/л;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2 г/л;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.02 г/л; насыщенный раствор  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 200 мкл/л) с добавлением 3% сырой нефти Октябрьского месторождения Ростовской области в качестве единственного источника углерода в течение 10 сут. Затем, для получения чистых культур, материал был посеян на плотную питательную среду, которая была получена добавлением к жидкой среде Ворошиловой–Диановой 2% агара, 0.1% Твин-80 и 2% сырой нефти. Оба штамма являются каталазоположительными.

Идентификация микроорганизмов была проведена во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов ГосНИИГенетика при помощи секвенирования переменных участков гена рибосомальной 16S РНК (<http://www.genetika.ru/vkpm/uslugi-vkpm/>).

Бесклеточные экстракты микроорганизмов готовили с использованием физиологического раствора и смеси органических растворителей. Для этого культуры микроорганизмов выращивали в жидкой среде на термостатируемой качалке ES-20 (“Biosan”, Латвия) при 30°C и 200 об/мин в течение 72 ч. Для выращивания использовали богатую среду LB [10] (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л). Для исследования воздействия углеводов использовали среду LB с добавлением 2% нефти. Бактериальную массу собирали центрифугированием в течение 15 мин (6500 g, 4°C). Для дальнейшего использования клетки микроорганизмов трижды отмывали 0.85%-ным раствором NaCl.

Отмытые клетки использовали для получения экстрактов из бактериальной массы обоих штаммов на основе водного (раствор 0.85% NaCl и 0.1% Трипон Х100 в деионизированной воде) или органического экстрагента (смесь ацетон–этанол 1 : 1). Биомассу растирали с измельченным стеклом в присутствии экстрагента в течение 15 мин в фарфоровой ступке при +4°C.

Определение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) в бактериальных экстрактах в системе

$\text{H}_2\text{O}_2$ -люминол-индуцированной ХЛ проводили на установке для регистрации ХЛ на базе сцинтилляционного счетчика масс-спектрометра RFT 22028 (“RFT”, Германия) по методу Шестакова [11].

Измерение Fe(II)-индуцированной ХЛ проводили следующим образом: суспензию желточных липопротеидов получали путем разведения желтка куриного яйца в дистиллированной воде в соотношении 1 : 10. Для активации ХЛ применяли флуоресцирующий краситель родамин 6Ж [12].

В измерительную кювету помещали 3 мл 25 мМ К-фосфатного буфера, pH 7.7, 50 мкл суспензии желтка, 50 мкл 1 мМ раствора родамина 6Ж и 100 мкл воды (контроль) или экстракт бактериальной массы (опыт), нормированный по содержанию белка. Пробу термостатировали при постоянном перемешивании в течение 100 с при 37°C, регистрируя фоновое свечение, после чего для иницирования ХЛ в систему вводили 500 мкл 0.02 М водного раствора  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и регистрировали уровень ХЛ до достижения максимума свечения медленной вспышки. Раствор сернокислого железа готовили перед опытом и предварительно для предотвращения самоокисления подкисляли 0.1 н. HCl из расчета 200 мкл кислоты на 10 мл водного раствора соли железа.

Водные экстракты были протестированы с биосенсором *Escherichia coli* MG 1655 (pSoxS-lux) [13] в присутствии  $1 \times 10^{-2}$  М метилвиологена, который эффективно вызывает окислительный стресс в клетках данного биосенсора. Бактериальный биосенсор предоставлен Мануховым И.В. (ГосНИИГенетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва). Измерения бактериальной люминесценции проводились на микропланшетном люминометре LM-01T (“Immunotech”, Чехия).

Все измерения проведены в трех повторностях, статистическую обработку проводили по методу Кокунина [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Исследование  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированной люминолазависимой ХЛ.** Мы предположили, что микробиологическая биодegradация нефтепродуктов происходит при участии свободных радикалов, продуцируемых культурой бактерий. Поэтому следовало ожидать на фоне высокой устойчивости липидного компонента бактериальных экстрактов увеличение уровня свободнорадикального окисления в системе. Для проверки данного предположения были исследованы водные и ацетон–этанольные экстракты штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13, выращенных на стандартной питательной среде (контроль) и среде, содержащей 2% нефти (опыт).

При исследовании водных экстрактов данных штаммов бактерий, выращенных на среде с нефтью, выявлен эффект усиления  $\text{H}_2\text{O}_2$ -индуцированной люминолазависимой ХЛ как по высоте быстрой

**Таблица 1.** Показатели  $H_2O_2$ -индуцированной люминолзависимой ХЛ водных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13

Образец		Быстрая вспышка, усл. ед.	Светосумма, с	
			100	500
Штамм № 6	контроль	240 ± 35.3	51 ± 6.8	166 ± 18.8
	опыт	740 ± 86.4*	131 ± 15.7*	318 ± 37.4*
Штамм № 13	контроль	18 ± 2.9	2 ± 0.01	10 ± 1.3
	опыт	151 ± 20.7*	13 ± 2.3*	23 ± 2.65*

\* Отличия от контроля статистически значимы ( $t$  – критерий,  $p < 0.05$ ).

**Таблица 2.** Показатели  $H_2O_2$ -индуцированной люминолзависимой ХЛ ацетон-этанольных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13

Образец		Быстрая вспышка, усл. ед.	Светосумма, с	
			100	500
Штамм № 6	контроль	103 ± 11.3	291 ± 33.4	1006 ± 88.8
	опыт	108 ± 12.4	253 ± 26.2	1543 ± 137.7*
Штамм № 13	контроль	95 ± 8.7	112 ± 10.8	532 ± 75.6
	опыт	101 ± 9.9	166 ± 17.7	1332 ± 150.0*

\* Отличия от контроля статистически значимы ( $t$  – критерий,  $p < 0.05$ ).

вспышки (208–700%), так и по светосумме за 100 и 500 с свечения по сравнению с экстрактами микроорганизмов, выращенных без нефти (табл. 1).

Исследование ацетон-этанольных экстрактов данных штаммов, выращенных на среде, содержащей нефть, также свидетельствует об усилении интенсивности  $H_2O_2$ -индуцированной люминолзависимой ХЛ, проявляемой в увеличении светосуммы за 500 с на 53% для штамма № 6 и на 250% – для штамма № 13 (табл. 2).

Таким образом, выращивание бактерий данных штаммов на среде, содержащей нефтепродукты, приводило к увеличению прооксидантных свойств экстрактов бактериальных клеток и, очевидно, к усилению образования АФК у данных микроорганизмов.

**Исследование Fe(II)-индуцированной люминолзависимой ХЛ.** Для поддержания динамического равновесия между уровнем свободнорадикального окисления и антиоксидантной активностью должна существовать достаточно сильная антиоксидантная защита, чтобы деградация углеводов нефти проходила без негативных последствий для самой бактериальной клетки. Использование фосфолипидов яичного желтка в качестве субстрата для окисления в системе Fe(II)-индуцированной ХЛ позволяет определить баланс между накоплением активных соединений кислорода и активностью антиоксидантных систем бактериальных штаммов.

Для этого исследовали влияние водных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13, выращенных на среде без нефти (контроль), и среде, содержащей нефть (опыт). Сравнение динамики ХЛ выявило увеличение светосуммы быстрой вспышки на 63% для штамма № 6 и на 41% – для штамма № 13, что свидетельствовало об увеличении содержания гидроперекисей липидов (табл. 3).

В то же время сократился индукционный период на 74% для штамма № 6 и на 87% для штамма № 13, что указывало на возрастание скорости окисления ионов двухвалентного железа.

Увеличивается время выхода на максимум свечения и светосуммы до наступления максимума свечения медленной вспышки для штамма № 6 на 15% и 26%, для штамма № 13 на 140% и 400% соответственно. Возрастает высота медленной вспышки на максимуме свечения для штамма № 6 на 15% и для штамма № 13 – на 300%.

Таким образом, водные экстракты данных штаммов, выращенных на среде, содержащей нефть, вызывают возрастание хемилюминесцентного ответа по медленной вспышке, что свидетельствует об усилении образования свободных радикалов, способствующих деградации углеводов нефти.

Исследование хемилюминесцентного ответа ацетон-этанольных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus*, выращенных на среде, содержащей нефть (опыт), в отличие от выращенных на питательной среде без нефти (контроль), выявило возрастание антиокси-

**Таблица 3.** Показатели Fe(II)-индуцированной ХЛ водных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13

Образец		Индукционный период, с	Светосумма за 500 с	Время выхода на максимум свечения медленной вспышки, с	Светосумма медленной вспышки до максимума	Уровень ХЛ на 500 с медленной вспышки, усл. ед.	Высота медленной вспышки, усл. ед.	Светосумма за 100 с от введения соли железа
Штамм № 6	контроль	1560 ± 200.4	59 ± 6.8	4000 ± 387.4	832 ± 94.7	6 ± 1.0	65 ± 9.3	19 ± 2.8
	опыт	400 ± 68.8*	50 ± 7.2	4600 ± 510.3	1049 ± 121.1	6 ± 1.0	75 ± 9.9	31 ± 2.9*
Штамм № 13	контроль	2300 ± 388.5	56 ± 7.1	1200 ± 158.5	150 ± 23.4	8 ± 1.2	35 ± 7.8	22 ± 2.3
	опыт	300 ± 51.3*	46 ± 5.4	2900 ± 360.3*	750 ± 83.2*	10 ± 0.8	140 ± 23.1*	31 ± 3.6

\* Отличия от контроля статистически значимы ( $t$  – критерий,  $p < 0.05$ ).

**Таблица 4.** Показатели Fe(II)-индуцированной ХЛ ацетон-этанольных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13

Образец		Индукционный период, с	Светосумма за 500 с	Время выхода на максимум свечения медленной вспышки, с	Светосумма медленной вспышки до максимума	Уровень ХЛ на 500 с медленной вспышки, усл. ед.	Высота медленной вспышки, усл. ед.	Светосумма за 100 с от введения соли железа
Штамм № 6	контроль	4200 ± 408.1	36 ± 5.5	1600 ± 180.0	90 ± 12.4	17 ± 12.5	28 ± 3.5	0
	опыт	5400 ± 520.0	3 ± 0,6*	1500 ± 167.0	7 ± 0,9*	1 ± 1.1*	2 ± 0.28*	0
Штамм № 13	контроль	4140 ± 400.0	30 ± 3.9	800 ± 100.0	125 ± 16.4	30 ± 4.2	35 ± 4.8	3 ± 0.45
	опыт	5500 ± 510.5	15 ± 2.1*	600 ± 69.9	20 ± 2.9*	10 ± 1.6*	15 ± 1.9*	0*

\* Отличия от контроля статистически значимы ( $t$  – критерий,  $p < 0.05$ ).

дантных свойств как для штамма № 6, так и для штамма № 13, выражающееся в увеличении индукционного периода на 29–33% и уменьшении остальных показателей ХЛ (табл. 4).

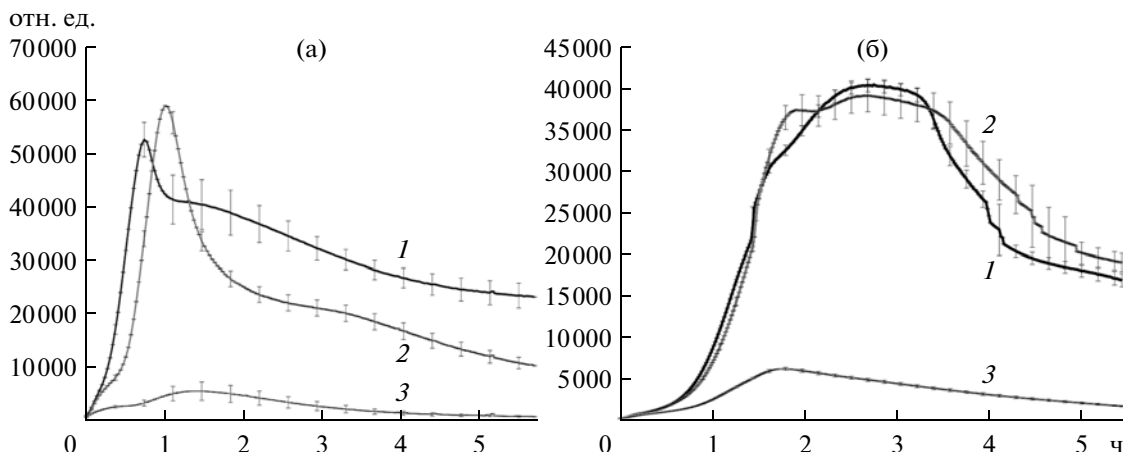
Водные экстракты исследуемых штаммов также были протестированы в биологической системе регистрации с биосенсором *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux), реагирующим на повышение уровня супероксид-анион радикала в клетке, то есть на соединения, индуцирующие окислительный стресс.

Необходимо отметить, что водные экстракты бактериальной массы этих штаммов, выращенных на среде без нефти, значительно снижают уровень генерации АФК, вызванный метилвиологеном в клетках Sox-lux биосенсора. Экстракт штамма № 6 снижал ответ биосенсора *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux) при воздействии метилвиологена в 10 раз (рисунок, а), а экстракт штамма № 13 – в 8 раз (рисунок, б). Экстракты клеток этих штаммов, выращенных на среде с нефтью, не снижали окислительный стресс по сравнению с контролем, а в определенные моменты времени даже увеличивали ответ биосенсора.

Результаты, на первый взгляд, противоречат данным по ХЛ, полученным с бесклеточными экстрактами, однако мы можем предположить наличие конститутивного синтеза антиоксидантов для защиты клетки от АФК. При выращивании микроорганизмов в присутствии нефти, уровень антиоксидантов может падать за счет нейтрализации АФК либо их действие компенсируется возросшим уровнем синтеза прооксидантных соединений в клетке.

Таким образом, можно утверждать, что клетки обоих штаммов *A. calcoaceticus* при выращивании в среде, содержащей сырую нефть, образуют прооксиданты, провоцирующие окислительный стресс в клетках Sox-lux биосенсора и продуцирующие активные формы кислорода. С другой стороны, эти же штаммы образуют антиоксиданты, защищающие клетки биосенсора от окислительного стресса и снижающие ХЛ-ответ при индукции Fe(II). По всей видимости, функцией этих антиоксидантов является защита нефтедеградирующих микроорганизмов от производимых ими же АФК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (проект по



Хемилюминесценция биосенсора *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux) под действием метилвиологена в отсутствие (контроль, 1) и в присутствии экстрактов *A. calcoaceticus* штамма №6 (а) и №13 (б), выращенных на среде с нефтью (2) и без нефти (3).

аналитической ведомственной целевой программе “Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2010 годы)”, грант № 2.1.1/5232).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goi A., Kulik N., Trapido M. // *Chemosphere*. 2006. V. 63. № 10. P. 1754–1763.
- Ndjou'oua A.-Cl., Cassidy D. // *Chemosphere*. 2006. V. 65. № 9. P. 1610–1615.
- Palmroth M.R.T., Langwaldt J.H., Aunola T.A., Goi A., Münster U., Puhakka J.A., Tuhkanen T.A. // *Biodegradation*. 2006. V. 17. № 2. P. 29–39.
- Mai-Prochnow A., Lucas-Elio P., Egan S., Thomas T., Webb J.S., Sanchez-Amat A., Kjelleberg S. // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 15. P. 5493–501.
- Wang R.-F., Wennerstrom D., Cao W.-W., Khan A.A., Cerniglia C.E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 4300–4304.
- Godocíková J., Boháčová V., Zámocký M., Polek B. // *Folia Microbiol (Praha)*. 2005. V. 50. № 2. P. 113–118.
- Bekerman R., Segal G., Ron E. Z., Rosenberg E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 66. № 5. P. 536–541.
- Kato T., Miyanaga A., Kanaya S., Morikawa M. // *BMC Microbiol.* 2009; V. 9 : 60. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/60>.
- Родина А.Г. // *Методы водной микробиологии*. М.: Наука, 1965. 363 с.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 pp.
- Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. // *Вопросы мед. химии*. 1979. № 2. С. 132–137.
- Шерстнев М.П. // *Вопросы хемилюминесценции*. 1990. Т.1. № 1. С.19–21.
- Zavilgelsky G.B., Kotova V.Yu., Manukhov I.V. // *Mutat. Res.* 2007. V. 634. № 1–2. P. 172–176.
- Кокунин В. А. // *Укр. биохим. журн.* 1975. Т. 47. № 6. С. 776–790.

## Chemiluminescence Analysis of Oil Oxidizing Bacteria *Actinobacter calcoaceticus* Extracts: Effects of the Extracts on pSoxS-lux Biosensor

I. S. Sazykin<sup>a</sup>, V. N. Prokofiev<sup>a</sup>, V. A. Chistyakov<sup>a</sup>, M. A. Sazykina<sup>a</sup>, and V. V. Vnukov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Southern Federal University, Research Institute for Biology, Rostov-on-Don, 344090, Russia

e-mail: zebra-sis@yandex.ru

<sup>b</sup> Southern Federal University, Department of Biology and Soil Sciences, Rostov-on-Don, 344006, Russia

Received August 24, 2010

**Abstract**—A comparative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol- and Fe(II)-induced chemiluminescence analysis of extracts of two strains of marine oil oxidizing bacteria *Actinobacter calcoaceticus* cultivated either in the presence or absence of oil was carried out. Effects of these extracts on *E. coli* MG1655 biosensor (pSoxS-lux) were studied. Activation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced chemiluminescence in the presence of oil was observed. This suggests activation of free radical lipid peroxidation. Aqueous extracts of microorganisms cultivated in the presence of oil were shown to activate reactive oxygen species production (ROS) in Fe(II)-induced chemiluminescence reaction mixture. Acetone–ethanol extracts induced antioxidative systems of both strains. Chemiluminescence analysis in a biological system carried utilizing *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) revealed that aqueous extracts of the strains cultivated in the absence of oil contained potential antioxidants.

УДК 582.281

## ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА

© 2011 г. Д. А. Андриянова\*, Я. Э. Сергеева\*, Г. А. Кочкина\*\*\*, Л. А. Галанина\*, А. И. Усов\*\*, Е. П. Феофилова\*

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

\*\*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991

\*\*\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуццоно, 142290

e-mail: feofilov@inmi.host.ru, biolog1@migmail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2010 г.

Разработаны методы получения клеточных стенок (КС) для представителей муконовых грибов и грибов аскомицетного аффинитета на стадии мицелия и покоящихся клеток – спор. Чистоту КС оценивали электронно-микроскопическим способом, специфическими методами окрашивания, контролем промывных вод, по наличию рибозы и дезоксирибозы, а также новым критерием – сравнение содержания хитина в целых клетках и КС грибов. Обсуждается значение предлагаемых методов получения чистых фракций КС и изучения их углеводного состава для хемосистематики мицелиальных грибов.

Клеточная стенка (КС) грибов впервые была описана в начале XVIII столетия, но длительное время практически не изучалась. В начале XX века началось ее интенсивное исследование, но в основном у растений и бактерий. Активное развитие грибоводства и биотехнологических производств, в которых в качестве продуцентов биологически активных веществ использовались мицелиальные грибы, сделали необходимым изучение КС грибов. Результаты исследований КС грибов до 80-х годов прошлого столетия были обобщены в работе [1]. В последующие годы были проведены основополагающие исследования, посвященные изучению химического состава КС, апикального роста и лизиса гиф, метаболизма хитина, антигрибных препаратов, гидрофобин, ковалентно связанных белков, ферментов, участвующих в образовании КС, ветвления гиф и лизиса КС [2–12].

Изучение биологической функции КС и ее химического состава в значительной степени зависит от метода выделения этой структуры и определения степени чистоты фракции КС. Так, например, традиционно считалось, что в КС мицелия муконовых грибов не содержится глюкан, а этот полисахарид характерен только для КС спор [13]. Однако в последние годы было показано, что у муконового гриба *Gongronella butleri* USDB 0201 в мицелии присутствует хитозан-глюкановый комплекс [14]. Между тем, современная хемосистематика грибов рассматривает отсутствие глюкана у Mucorales как один из важнейших систематических признаков. Кроме того, наличие такого аминополисахарида как хитозан, традиционно рассматриваемого в качестве харак-

терного признака при определении муконовых грибов, не установлено у грибов семейства Cunninghamhamellaceae, в частности у *Cunninghamella japonica* [15]. Возможно, что подобные различия в результатах исследований обусловлены методами выделения КС, которые должны обеспечить отсутствие трудно удаляемого цитоплазматического загрязнения во фракции КС.

Особенность предлагаемых в работе методов состоит в том, что они могут быть использованы на разных стадиях онтогенеза, в частности, на стадии активно растущего мицелия (трофофаза), стадии торможения ростовых процессов (идиофаза) и стадии перехода к образованию покоящихся клеток (спор). Использованные методы дают возможность получать чистые фракции КС грибов разных систематических групп как низших (муконовые), так и анаморфных грибов аскомицетного аффинитета, а также таких мало изученных клеточных структур, как половые клетки Mucorales – зигоспоры.

Цель работы – разработка методов выделения КС мицелиальных грибов, проверка чистоты полученных фракций, а также изучение углеводного состава КС грибов на стадии мицелия и образования покоящихся клеток – спор.

### МЕТОДИКА

**Объекты исследования.** Работу проводили с мицелиальными грибами, представителями низших грибов и анаморфных грибов аскомицетного аффинитета.

Исследовали гетероталлические штаммы *Cunninghamella japonica* (синоним — *C. echinulata*) ВКМ F-470(–), ВКМ F-471(+), ВКМ F-776(–), ВКМ F-775(+), ВКМ F-626(–), ВКМ F-1204(–), *C. homotalica* ВКМ F-930 (семейство Cunninghamellaceae) и *Absidia coerulea* ВКМ F-858 (+) и ВКМ F-859 (–), (семейство Mucoraceae), оба семейства входят в порядок Mucorales [16]. Для более подробного изучения были отобраны штаммы *C. japonica* ВКМ F-1204(–) и *Absidia coerulea* ВКМ F-859 (–).

Из анаморфных грибов аскомицетного аффинитета исследовали *Penicillium roqueforti* ВКМ F-3057 (отдел Ascomycota, класс Eurotiomycetes, порядок Eurotiales, семейство Trichocomaceae).

Все штаммы получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Кроме этих штаммов, использовали также гетероталлические штаммы *Blakeslea trispora* Т(+), Т(–) и *Aspergillus niger* из коллекции ИНМИ РАН.

**Методы культивирования.** Для получения максимального количества спор и интенсификации процесса спорообразования в условиях твердофазного культивирования использовали посев в матрацах на агаризованные среды (2%): картофельную, картофельно-морковную, с сусликом (7° по Баллингу), овсяную, 25%-ную глицерин-нитратную, кукурузно-соевую, с молочной сывороткой, Чапека, Чапека с добавлением дрожжевого экстракта и Чапека с добавлением 0.01% трегалозы. Для исследуемых грибов наиболее интенсивный процесс спорообразования наблюдался на суслико-агаре с добавлением трегалозы при температуре 27–28°C.

Зигоспоры муконовых грибов получали на суслико-агаре в чашках Петри, для чего на поверхность среды наносили кусочки агаровой среды с выращенным 3–4-суточным мицелием (+) и (–) штаммов. В процессе роста при смыкании растущего поверхностного мицелия образовывалась темная полоса шириной 1.5–2.0 см, содержащая преимущественно зигоспоры.

Для глубинного культивирования грибов (27–28°C, 250 об/мин) использовали как естественные (с сусликом, картофельно-морковная, кукурузно-соевая), так и синтетические (среда Гудвина с аспарагином и среда Галаниной с нитратом аммония [17]) питательные среды. В качестве посевного материала использовали водную суспензию 10–12-суточных спор, вносимых в колбу с питательной средой в количестве  $3.0 \times 10^6$ – $3.9 \times 10^6$  спор/мл среды. Для анализа использовали мицелий в стадии трофофазы (40–48 ч) или идиофазы (70–75 ч).

**Методы получения чистой фракции КС мицелия.** Для получения КС отделенный от культуральной жидкости мицелий промывали водой и гомогенизировали 15 мин при 4°C (Homogenizer type MPW-324, Poland). Биомассу отфильтровывали на капроновом фильтре, отмывали водой и процедуру гомогениза-

ции повторяли. Отмытый вегетативный мицелий подвергали обработке ультразвуком (Ultrasonic disintegrator type UD-20 Techpan (Poland), 3 мин, 4°C, 22 кГц) с последующей длительной промывкой водой. Предварительно было установлено, что отмывка КС детергентом Na–ДДС или 8 М мочевиной, которые рекомендуются для удаления цитоплазматического загрязнения, может привести к разрушению КС и потере ряда соединений, в частности хитина. Для дальнейшего изучения углеводного состава КС мицелия, полученные КС обезжиривали, используя последовательную обработку смесью этанол–хлороформ (2 : 1 и 1 : 2) и затем либо обрабатывали диэтиловым эфиром, либо лиофилизировали и хранили при температуре 7–8°C в холодильнике.

Следует отметить, что разрушение КС и извлечение липидов у грибов, синтезирующих каротиноиды, имеет свои особенности. В данном случае, для извлечения каротиноидов используется жидкий азот и диметилсульфоксид, после чего проводится экстракция метанолом и хлороформом [19].

**Метод получения фракции спор и их КС.** Для получения фракции спор грибов рода *Cunninghamella* споры смывали с поверхности 12-суточной культуры гриба, растущего на суслико-агаре в матрацах, водой, охлажденной до 4°C. Большее количество спор можно получить, предварительно измельчив в гомогенизаторе волокнообразный поверхностный мицелий, снятый с поверхности чашки Петри [20]. Для того, чтобы избежать прорастания спор эта процедура должна происходить максимально быстро, так как споры этих грибов обладают способностью прорастать в воде через 30–40 мин при температуре 27–28°C. В то же время конидии *P. roqueforti* начинают прорастать в воде только через 23–26 ч, что облегчает условия работы со спорами этой культуры.

Отделение спор от остатков поверхностного мицелия проводили путем встряхивания на шейкере с последующим фильтрованием через капроновый фильтр. Контроль чистоты фракции спор осуществляли методом микроскопии. Осаждение чистой фракции спор грибов рода *Cunninghamella* проводили с помощью центрифугирования (Allegra, Beckman Coulter (USA), 7500 g, 4°C, 35 мин). Конидии *P. roqueforti* гидрофобны, не осаждаются при центрифугировании и для их сбора лучше использовать фильтрование через матерчатый фильтр.

Для получения фракции КС полученные споры дважды замораживали жидким азотом, подвергали оттаиванию и обработке на аналоге пресса Хьюджа (метод твердого продавливания — экструзионная дезинтеграция, прибор Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН). Полученный после разрушения материал многократно промывали водой с последующим центрифугированием и обработкой жидким азотом. При необходимости после микроскопического контроля разрушенные споры отделяли от неразрушенных путем

дополнительного центрифугирования в 4.7 М растворе сахарозы (15 мин), затем фракцию КС подвергли обработке УЗ (5 мин) и центрифугировали. После промывки водой, КС обезжиривали для дальнейшего определения их углеводного состава.

**Получение чистой фракции зигоспор и их КС.** Для отделения зигоспор муконовых грибов темную полосу в центре чашки Петри вырезали с помощью скальпеля, поверхностный мицелий, содержащий в основном зигоспоры, пинцетом отделяли от агара и гомогенизировали с последующей промывкой на капроновом фильтре. Полученный материал подвергли действию УЗ (5 мин, 4°C) в водной среде. После микроскопического контроля разрушенный материал фильтровали через капроновое сито (размер пор около 300 мкм). Полученный фильтрат, в котором кроме зигоспор, могут присутствовать спорангиоспоры, обрывки воздушного мицелия и спораносцы, центрифугировали 10 мин при 3000 g. При необходимости после микроскопического контроля повторяли этапы обработки УЗ и фильтрования [21]. Водную суспензию осадка осторожно насливали на 3.65 М сахарозу и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Находящиеся в верхнем слое зигоспоры отделяли и далее после отмывания водой пропускали через капроновый фильтр и собирали. Для получения КС зигоспор проводили их разрушение методом экструзионной дезинтеграции. Разрушенные зигоспоры многократно промывали водой центрифугировали, подвергали действию УЗ и пропускали через капроновые фильтры. Полученные КС обезжиривали для дальнейшего определения их углеводного состава.

Для контроля чистоты выделяемых КС применяли световую и просвечивающую микроскопию, последнюю проводили на электронном микроскопе JEM-100СХII (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Экстракцию липидов из целых клеток и КС, определение количества общих липидов, анализ фракционного состава фосфолипидов, получение метиловых эфиров жирных кислот проводили согласно [18].

Для определения содержания (% от суммы) нейтральных моносахаров, уроновых кислот и глюкозамина проводили обезжиривание КС с использованием системы растворителей этанол–хлороформ (2 : 1 и 1 : 2). Далее нейтральные моносахариды переводили в ацетаты путем гидролиза образцов КС под действием 2 М трифторуксусной кислоты (100°C, 8 ч) и анализировали методом ГЖХ на хроматографе Hewlett Packard 5890А (USA), снабженном пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-1MS в токе азота при градиенте температур от 160 до 260°C, со скоростью 7°C в мин. Идентификацию проводили при сравнении времени удерживания компонентов смеси со стандартами, количественное определение – с помощью

программы Мультихром 15 (Россия). Определение уроновых кислот в этом же гидролизате проводили реакцией с 3,5-диметилфенолом и серной кислотой. Глюкозамин определяли по цветной реакции с ацетилацетоном и реактивом Эрлиха после гидролиза образцов 8 М соляной кислотой (100°C, 8 ч).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований подобраны условия глубинного культивирования грибов, обеспечивающие высокий выход биомассы. Установлено, что на среде Галаниной рост исследуемых грибов более стабильный и величина накопленной воздушно-сухой биомассы составляет для мукового гриба *S. japonica* в трофофазе 9–10 г/л, в идиофазе – 14–16 г/л, для *P. roqueforti* – в трофофазе – 6–7 г/л, в идиофазе – 16–19 г/л.

Проведенные нами электронно-микроскопические исследования показали, что в процессе роста мицелия и в зависимости от действия окружающих факторов, например, температуры, морфология КС значительно изменялась. Это особенно заметно у грибов аскомицетного аффинитета, например, у *A. niger* в условиях культивирования при 30–31°C на конечной стадии идиофазы в отсутствие лизиса КС (т.е. при закислении среды) толщина КС может увеличиваться почти в 2 раза по сравнению с контролем (28°C), появляются инвагинации, при этом в клетках практически отсутствует цитоплазматическое содержимое. У муконовых грибов толщина КС также заметно изменялась при действии повышенной температуры. Например, у *S. japonica* толщина КС при 32°C достигала 27–28 мкм, в контроле при 27°C – 20–21 мкм. Кроме того, клетки мицелиальных грибов, особенно в стадии ранней трофофазы, характеризовались большим количеством цитоплазматического содержимого, например, водорастворимых белков, а в идиофазе – преобладали липидные включения, которые у грибов семейства Cunninghamellaceae могут составлять до 47–48% от веса сухого мицелия. При подготовке КС для анализа углеводного состава эти липиды извлекаются, что позволяет получать более чистую фракцию КС.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что КС можно получить в большем количестве из клеток грибов, находящихся в стадии идиофазы, а процедура очистки КС при этом может быть несколько облегчена из-за меньшего количества цитоплазматического содержимого на данной стадии развития.

Использованные методы (см. Методику) позволили получить фракции КС, чистоту которых оценивали следующими методами.

1. Окрашивание с флуоресцентным красителем (4',6-диамидино-2-фенилиндол) в концентрации 1 мкг/мл в 50% этаноле. Отсутствие флуоресценции



**Таблица 1.** Состав сахаров мицелия (М) и клеточной стенки мицелия (КСМ) на стадии идиофазы *C. japonica* ВКМ F-626(–)

Образец	Моносахариды, % от суммы				Хитин КСМ/хитин М
	фукоза	манноза	глюкоза	галактоза	
Клеточная стенка	–	5.1	69.6	25.9	1.75
Мицелий	1.0	22.7	62.4	13.9	

**Таблица 2.** Состав целых спор (ЦС) и клеточной стенки спор (КСС) на терминальной стадии спорогенеза *C. japonica* ВКМ F-626(–)

Образец	Моносахариды, % от суммы			Хитин КСС/хитин ЦС
	манноза	глюкоза	галактоза	
Клеточная стенка	18.9	64.26	16.5	1.85
Целые споры	21.4	65.35	13.4	

(голубой свет) свидетельствует об отсутствии ядер в образцах выделенных КС. Если в выделенных препаратах отсутствует ДНК, то можно предположить, что молекулы внутриклеточного содержимого, имеющие меньшую молекулярную массу, отсутствуют в полученных образцах [22].

2. Метод, основанный на реакции взаимодействия йода с хитозаном. Изолированные чистые КС с раствором Люголя окрашиваются в розовый или фиолетовый цвет, в то время как интактные стенки имеют ярко красную окраску [1].

3. Измерение экстинкции промывных вод, которая при 260 и 280 нм не должна быть выше 0.1 (при отмывке 10–15 мг материала в 15–20 мл воды).

4. Микроскопический контроль чистоты КС.

5. ГЖХ углеводов на отсутствие рибозы и дезоксирибозы в гидролизатах КС [23].

Кроме этих критериев для установления чистоты КС, ценную информацию может дать сравнение содержания преобладающих соединений, таких, как, например, углеводы и липиды в целых клетках и КС мицелиальных грибов.

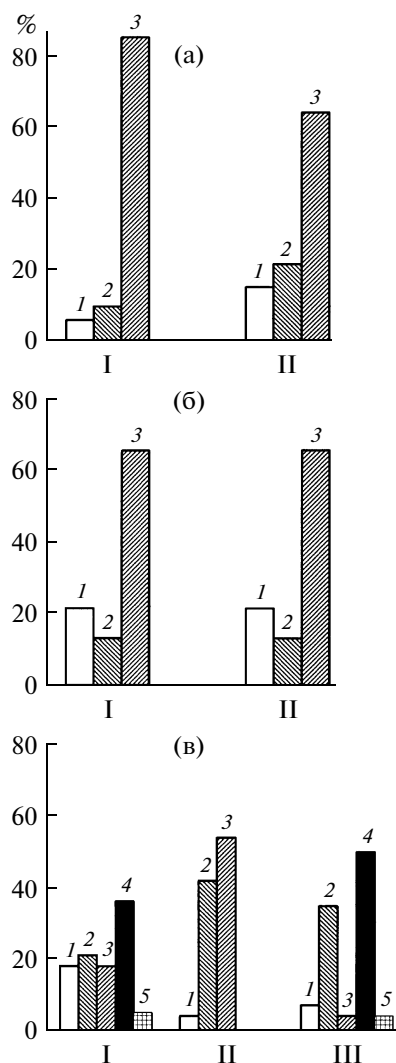
Из результатов, приведенных в табл. 1, следует, что КС *C. japonica* содержит значительно больше хитина, чем мицелий. Содержание этого основного полисахарида может рассматриваться в качестве критерия чистоты КС. Об этом свидетельствует тот факт, что повторная очистка КС не приводит к увеличению содержания хитина в КС гриба и все указанные выше тесты также свидетельствовали о чистоте КС.

Указанный выше критерий чистоты КС – содержание хитина, выявляется еще более наглядно при анализе сахаров КС спор *C. japonica* (табл. 2). Как известно, спора имеет более толстые по сравнению с мицелием КС с повышенным содержанием хитина [1]. Нами показано, что в КС спор *C. japonica* содержится почти в два раза больше хитина, чем в целой покоящейся клетке.

Оценить чистоту КС можно также путем сравнения содержания липидов в целых клетках и КС спрангиоспор и зигоспор мукоровых грибов.

В целых клетках спорангиоспор *A. coerulea* содержится 5.0–6.5% липидов, в то время как в КС их содержание увеличивалось более, чем в 2 раза (13.5–14.3%). Целые зигоспоры характеризовались высоким содержанием липидов (около 40%), содержание которых в КС составляло около 16% (совместные исследования с И.В. Писаревской, Институт иммунологии Минздрав РФ). В то же время, если при получении КС зигоспор пропустить этап их обработки УЗ, то содержание липидов в КС зигоспор увеличивалось практически в 2 раза, за счет цитоплазматического загрязнения, что подтвердило необходимость соблюдения указанных выше обработок. Интересно отметить и тот факт, что зигоспоры *A. coerulea* отличались повышенным содержанием липидов, что характерно и для других представителей порядка Mucogales, например, *Blakeslea trispora* [24].

Различия в составе КС отдельных таксономических групп грибов были установлены еще в начале XVIII в., но этот признак в систематике грибов использовали впервые только в 1921 г. [25]. С тех пор



Изменение в составе моносахаридов (%) клеточных стенок мицелия (I), спор (II) и зигот (III) в процессе дифференцировки *P. roqueforti* (а), *C. japonica* ВКМ F-1204(-) (б), *A. coerulea* (в): 1 – манноза, 2 – галактоза, 3 – глюкоза, 4 – фукоза, 5 – рамноза.

состав КС, как таксономический критерий прочно вошел в систематику грибов [26]. Однако в последние годы состав КС стал широко использоваться и в установлении корреляций между морфогенетическими особенностями грибов и составом биополимеров их КС [27], например, в случае диморфных грибов, когда форма клетки, дрожжевая или мицелиальная, зависит от ее химического состава.

Проведенные в настоящей работе исследования по разработке способов получения КС и определения их химического состава в процессе онтогенеза грибов позволяют высказать ряд соображений о таксономии грибов порядка Mucorales. В настоящее время изучению грибов этого порядка уделяется большое внимание, что связано с их природной деятельностью, патогенностью и использованием в

биотехнологии [28]. В 70-е годы прошлого столетия при исследовании КС грибов рода *Mucor* были установлены закономерности, отличающие мукоровые грибы от других грибов царства Fungi [29]. В процессе онтогенеза этих грибов происходят изменения в составе КС: в споре преобладают глюкоза и меланин, а в мицелии – мукоран и хитозан. Мукоран – полимер КС мицелия практически не содержит глюкозы, а в его составе основным сахаридом является фукоза и уроновые кислоты. Это связано с тем, что при прорастании споры ее КС лизируется, а КС мицелия образуется de novo. Эти изменения получили название “онтогенетической рекапитуляции филогенетической истории КС” грибов порядка Mucorales, так как состав КС их спор предполагал происхождение от Chytridiomycetes и соответствовал остальным грибам царства Fungi.

Согласно данным 2008 года [16], к порядку Mucorales было отнесено 9 семейств. Однако последующие исследования по систематике рода *Absidia* привели к выделению еще двух монородовых семейств – Mucocladaceae и Lichthemiaceae [30]. Именно этот порядок (Mucogales) в последние годы подвергается наибольшей ревизии со стороны микологов-таксономистов. В связи с этим на следующем этапе исследований было проведено сравнение состава КС представителей грибов этого порядка, различающихся по типу спороношения – односпоровые спорангии у *C. japonica* (сем. Cunninghamellaceae), и многоспоровые у *A. coerulea* (сем. Mucogaseae). Для сравнения изучали состав КС у представителя анаморфных грибов аскомицетного аффинитета – *P. roqueforti*. В задачу исследования входило сравнение моносахаридного состава КС грибов на стадии мицелия и зрелых спор (спорангиоспор, конидий и зигоспор).

Из данных, представленных на рисунке, следует, что состав моносахаридов КС спор всех изученных грибов практически идентичен и основными моносахарами являются глюкоза и галактоза. Основные отличия у грибов, принадлежащих к семействам Mucogaseae и Cunninghamellaceae, выявляются только в период активного роста, т.е. на стадии мицелия. На данной стадии онтогенеза отмечены существенные различия в составе КС мицелия: преобладающим моносахаридом у *C. japonica* была глюкоза, а у *A. coerulea* – фукоза.

Таким образом, сравнение моносахаридного состава КС мицелия свидетельствует о существенной разнице между грибами – представителями семейств Cunninghamellaceae и Mucogaseae, различающиеся типами спороношения. При этом состав моносахаров *C. japonica* очень сходен с таковым гриба аскомицетного аффинитета *P. roqueforti*. Кроме того, состав ацильных цепей липидов, который в настоящее время является одним из ведущих хемосистематических признаков, также показывает, что *C. japonica* отличается по жирнокислотному составу липи-

**Таблица 3.** Состав основных жирных кислот (% от суммы) фосфолипидов целых клеток гетероталлических штаммов *B. trispora* и *C. japonica* ВКМ F-1204(–)

Жирная кислота	<i>B. trispora</i> T(–) штамм	<i>B. trispora</i> T(+) штамм	<i>C. japonica</i> (–) штамм	<i>C. japonica</i> (–) штамм (общие липиды)
C <sub>16:0</sub>	15.1	15.1	16.9	18.2
C <sub>16:1</sub>	6.6	3.3	1.5	1.0
C <sub>17:0</sub>	6.0	3.1	–	сл.
C <sub>18:0</sub>	3.8	1.0	5.5	16.2
C <sub>18:1</sub>	13.7	16.5	42.1	46.7
C <sub>18:2</sub>	51.5	26.4	18.0	11.0
C <sub>18:3</sub>	–	20.0	5.0	6.1

дов от других представителей пор. *Mucorales*, например, *Blakesalea trispora* (табл. 3) по соотношению ацилов C<sub>18:1</sub>/C<sub>18:2</sub> в составе общих липидов и фосфолипидов. Совокупность полученных данных соответствуют последним представлениям о систематике зигомизетов, согласно которым эти грибы не являются монофилетической группой, а представляют собой полифилетическую или парафилетическую группу организмов [16].

С точки зрения филогении и эволюции мицелиальных грибов, представляют интерес данные о моносахаридном составе половых спор – зигоспор – по сравнению с вегетативными спорами на примере *A. coerulea*. Из данных рисунка следует, что состав моносахаридов КС зигоспор значительно отличается от состава моносахаридов КС спорангиоспор, и обнаруживает некоторое сходство с таковым мицелия, так как в мицелии и зигоспорах преобладающими сахарами являются фукоза и галактоза, что свидетельствует о наличии полисахарида мукорана. Если исходить из предположения о том, что наиболее древними являются такие компоненты КС грибов как хитин и глюкан, а предками грибов считают *Chytridiomycetes* [31], то можно предположить, что половой процесс у *Mucorales* возник значительно позднее, что согласуется с современными представлениями, о том, что половой процесс возник на более поздних ступенях эволюции и более примитивным следует рассматривать процесс бесполой репродукции с участием спорангиоспор [32].

Таким образом, приведенные выше данные свидетельствуют о несомненной значимости изучения состава КС грибов для их таксономии и филогении, а такой критерий как состав моносахаридов полностью зависит от методов выделения КС и установления их чистоты, т.е. отсутствия цитоплазматического загрязнения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09–04–00430.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Феофилова Е.П.* Клеточная стенка грибов. М.: Наука, 1983. 248 с.
2. *Gooday G.W.* // Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi. / Eds. P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey, L.G. Copping. Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris: Springer-Verlag, 1990. P. 60–79.
3. *Kuhn P.J., Trinci A.P.J.* // Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi / Eds. P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey, L.G. Copping. Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris: Springer-Verlag, 1990. P. 1–30.
4. *Канарская З.А., Гамаюрова В.С., Шабрукова Н.В., Гогелашвили Г.Ш., Грунин Ю.Б., Канарский А.В., Избранова С.И.* // Биотехнология. 2000. № 3. С. 63–66.
5. *Chitnis M., Ghormade V., Deshpande M.V.* // Chitin Metabolism / Ed. R.A.A. Muzzarelli. Italy: Atec, 2001. P. 541–551.
6. *Wösten H.A.B.* // Annu. Rev. Microbiol. 2001. V. 55. P. 625–646.
7. *Cheng J., Park T.S., Fisci A., Ye X.S.* // Mol. Cell. Biol. 2001. V. 1. № 18. P. 6198–6209.
8. *El Gueddan N.E., Rauchhaus U., Moerschbacher B.M., Deising H.B.* // New Phytologist. 2002. V. 156. P. 103–112.
9. *Harris S.D., Momany M.* // Fungal Genet. Biol. 2003. V. 41. № 4. P. 391–400.
10. *De Groot P.W.J., Ram A.F., Klis F.M.* // Fungal Genet. Biol. 2005. V. 42. № 8. P. 657–675.
11. *Bowman S.M., Free S.J.* // BioEssays. 2006. V. 28. № 8. P. 799–808.
12. *Klis F.M., Ram A.F.J., De Groot P.W.J.* // Biology of the Fungal Cell, 2<sup>nd</sup> Edition. The Mycota VIII / Eds. R.H. Howard, N.A.R. Gow. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 111–151.
13. *Bartnicki-Garcia S., Nickerson W.I.* // Biochim. Biophys. Acta. 1962. V. 58. P. 102–119.
14. *Nwe N., Stevens W.F., Tokura S., Tamura H.* // Enzyme Microb. Technol. 2008. V. 42. P. 242–251.

15. Феофилова Е.П., Терешина В.М. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 444–448.
16. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. Dictionary of the Fungi. 10<sup>th</sup> Edition. Wallingford, Oxon: CABI Publishing, 2008. 771 p.
17. Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Андриянова Д.А., Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 576–581.
18. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 332 с.
19. Valduga E., Valerio A., Tatsch P., Treichel H., Furigo A., Di Luccio M. // Food Bioprocess Technol. 2009. V. 2. № 2. P. 234–238.
20. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Полотебнова М.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. № 4. С. 500–506.
21. Писаревская И.В., Феофилова Е.П., Марченко И.В. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 1. С. 124–129.
22. Мейчик Н.Р., Матвеева Н.П., Николаева Ю.И., Чайкова А.В., Ермаков И.П. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 8. С. 1103–1111.
23. Слонекер Дж. Методы исследования углеводов. / Ред. А.Я. Хорлин. М.: Мир, 1975. С. 22–25.
24. Терешина В.М., Меморская А.С., Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 449–453.
25. Schmidt M. // Arch. Microbiol. 1936. V. 7. P. 241–260.
26. Феофилова Е.П. // Микология и фитопатология. 1982. Т. 16. № 2. С. 166–174.
27. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 220 с.
28. Кочкина Г.А. // Новое в систематике и номенклатуре грибов. М.: Национальная Академия микологии – медицина для всех, 2003. С. 106–135.
29. Bartnicki-Garcia S. // Annu. Rev. Microbiol. 1968. V. 22. P. 87–108.
30. Voigt K., Hoffmann K., Einax E., Eckart M., Papp T., Vágvölgyi C., Olsson L. // Current Advances in Molecular Mycology / Eds. Y. Gherbawy, R.L. Mach, M.K. Rai. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009. P. 313–332.
31. Белякова Г.А., Дьяков Ю.Т., Тарасов К.Л. Водоросли и грибы. М.: Издательский Центр “Академия”, 2006. 320 с.
32. Левкина Л.М., Тарасов К.Л. // Микология и фитопатология. 1980. Т. 14. № 2. С. 170–172.

## Filamentous Fungi’s Cell-Wall Extraction at Different Stages of Ontogenesis and Exploration of Their Carbohydrate Composition

D. A. Andriyanova<sup>a</sup>, Ya. E. Sergeeva<sup>a</sup>, G. A. Kochkina<sup>c</sup>, L. A. Galanina<sup>a</sup>,  
A. I. Usov<sup>b</sup>, and E. P. Feofilova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Vinogradskii Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

<sup>b</sup> Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>c</sup> Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

e-mail: feofilov@inmi.host.ru, biolog1@migmail.ru

Received November 23, 2010

**Abstract**—Methods of obtaining cell walls (CW) for specimens of mucoraceous molds and ascomycetic affined fungi are developed at the stage of mycelium and resting cells, or spores. CW purity was assessed by electron microscopy, specific staining methods, scourage control, presence of ribose and desoxyribose, and the comparison of chitin content in whole cells and CW of fungi (a new criteria). The authors discuss the significance of the proposed methods of obtaining pure fractions of CW and of the study of their carbohydrate content for the chemotaxonomy of filamentous fungi.

UDC 577.154.3:582.28

## AN EXTRACELLULAR GLUCOAMYLASE PRODUCED BY ENDOPHYTIC FUNGUS EF6

© 2011 P. Tangngamsakul\*, A. Karnchanatat\*\*, P. Sihanonth\*\*\*, P. Sangvanich\*\*\*\*

\*Biotechnology Programme, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

\*\*Research Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

\*\*\*Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

\*\*\*\*Research Centre for Bioorganic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

e-mail: polkit@gmail.com

Received April 12, 2010

A strain of endophytic fungus EF6 isolated from Thai medicinal plants was found to produce higher levels of extracellular glucoamylase. This strain produced glucoamylase of culture filtrate when grown on 1% soluble starch. The enzyme was purified and characterized. Purification steps involved  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation, anion exchange, and gel filtration chromatography. Final purification fold was 14.49 and the yield obtained was 9.15%. The enzyme is monomeric with a molecular mass of 62.2 kDa as estimated by SDS-PAGE, and with a molecular mass of 62.031 kDa estimated by MALDI-TOF spectrometry. The temperature for maximum activity was 60°C. After 30 min for incubation, glucoamylase was found to be stable lower than 50°C. The activity decrease rapidly when residual activity was retained about 45% at 55°C. The pH optimum of the enzyme activity was 6.0, and it was stable over a pH range of 4.0–7.0 at 50°C. The activity of glucoamylase was stimulated by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , glycerol, DMSO, DTT and EDTA, and strongly inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ . Various types of starch were test, soluble starch proved to be the best substrate for digestion process. The enzyme catalyzes the hydrolysis of soluble starch and maltose as the substrate, the enzyme had  $K_m$  values of 2.63, and 1.88 mg/ml and  $V_{\max}$  values of 1.25, and 2.54 U/min/mg protein, and  $V_{\max}/K_m$  values of 0.48 and 1.35, respectively. The internal amino acid sequences of endophytic fungus EF6 glucoamylase; RALAN HKQVV DSFRS have similarity to the sequence of the glucoamylase purified from *Thermomyces lanuginosus*. From all results indicated that this enzyme is a glucoamylase (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase).

Glucoamylases (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.3), also referred to as amyloglucosidases or  $\alpha$ -amylases, is a biocatalyst capable of hydrolyzing  $\alpha$ -1,4 glycosidic linkages in raw (sparsely soluble) or soluble starches and related oligosaccharides with the inversion of the anomeric configuration to produce  $\alpha$ -glucose. In addition to acting on  $\alpha$ -1,4-linkages, the enzyme slowly hydrolyzes  $\alpha$ -1,6-glycosidic linkages of starch [1–4]. These enzymes have many applications in industry, being used for dextrose production, in the baking industry, in the brewing of low calorie beer and in whole grain hydrolysis for the alcohol industry, but the most important application of glucoamylase is the production of high-glucose syrups. Others dextrose products formed as a result of the glucoamylase action are high fructose corn syrup and high conversion syrups. The conversion of starch to sugars is one of the most important biotechnological processes [5].

Many fungal species are capable of producing glucoamylase under different fermentation conditions and techniques. Most attempts involved seeking fungal species capable of hydrolyzing raw starch at elevated temperatures. The various fungi synthesizing glucoamylase that is active at higher temperatures include *Aspergillus awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Mucor rouxians*, *M. javanicus*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus delmar*,

*R. oryzae* [6]; and *Arthrotrichy amerospora* [7, 8]. However, the industrial focus has been on glucoamylase from *A. niger* and *R. oryzae*. The employment of glucoamylases from these sources in the starch processing industries is due to their good thermostability and high activity at near neutral pH values [9, 10].

Endophytes are obviously a rich and reliable source of bioactive metabolites with huge medical, agricultural and industrial potentials [11]. Although the enzymes vary from isolate to isolate, the endophytic fungi tested all synthesize in vitro the enzymes necessary for penetrating and colonizing their plant hosts [12]. Such enzymes including pectinases, xylanase, cellulases and lipases, proteinase and phenol oxidase have been documented with some endophytes [11]. However, only little has been reported about glucoamylase production by endophytic fungi up to date.

The objective of this work is to isolate endophytic fungi capable to producing glucoamylase and describe the purification and partial characterization of a glucoamylase from endophytic fungi.

### MATERIALS AND METHODS

**Fungal strain and culture condition.** Isolated strains of endophytic fungi were obtained from stock cultures of

Research Centre of bioorganic Chemistry (RCBC), Chulalongkorn University. The fungal cultures were grown on a screening starch agar plate. After that, the cultures were incubated at room temperature for 8–10 days. The media were flooded with iodine solution (0.1% I<sub>2</sub> and 1.0% KI) for 15 s and the iodine solution was removed. Clear zones were observed around the growing colony and the colonies which have a largest clear zone were isolated for further studied. The selected isolate of endophytic fungi was prepared on PDA at 25°C. Unless otherwise stated, actively growing fungal mycelium from a 7 day old culture was transferred to a 250-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of Mandels' medium [13]; composed of (g/l): urea – 0.3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2.0, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0.4, MgSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O – 0.3, peptone – 1.0; (mg/l): FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 5.0, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O – 1.6, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 1.4, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 2.0, and Tween 80 – 2.0 ml/l, pH 5.5 to which 1% soluble starch per l of distilled water. The incubation was carried out at room temperature on a rotary shaker at 200 rpm for 14 days. After the cultivation was completed, the culture was filtrated through a Whatman filter paper No.1 and the filtrate was used as the crude enzyme.

**Molecular Identification.** Genomic DNA was prepared from the fresh mycelial culture of selected isolate of endophytic fungi and extracted with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as described in [14]. PCR amplification of the internal transcribed spacer (ITS) was performed in a total volume of 50 µl which comprised approximately 100 ng genomic DNA, 1x PCR Master Mix (Fermentas, California, USA), and the primer ITS1F [15]; and ITS4 [16]. The amplification was performed in a thermocycler TGradient (Biometra, Germany) with 94°C for 5 min, followed by 38 cycles of 94°C for 1 min, 51°C for 1 min and 72°C for 1 min, with final extension of 72°C for 5 min. PCR product was purified using the NucleoSpin® (Macherey-Nagel Inc., Easton, USA) and sequenced externally by Macrogen (Seoul, Korea) using the same primer as for amplification.

**Assay of glucoamylase.** Glucoamylase activity was determined by measuring the production of reducing sugar using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) as described by Miller [17]. The assay was carried out at 50°C, using a 1.0% starch solution in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0. One unit of glucoamylase activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 µmol of glucose per minute.

**Purification of glucoamylase.** All of the procedures were performed at the 4°C, unless otherwise stated.

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation.** To 5.0 l of culture supernatant, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to give 80% saturation. After standing overnight the precipitate formed was collected by centrifugation at 10000 g for 20 min (Beckman Coulter, USA), and dissolved in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. The dissolved sample was dialyzed against the same buffer and concentrated by lyophilization (Labconco, USA).

**Anion exchange chromatography.** The sample solution was applied to a column (1.6 × 20 cm) of a Q Sepharose Fast Flow (Sigma, USA) equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. Elution was undertaken with the same buffer at a flow rate of 1.0 ml/min. A linear gradient of 0–1.0 M NaCl in the same buffer was then applied. Fractions of 10.0 ml each were collected and assayed for glucoamylase activity. The fractions containing glucoamylase activities from the column were pooled and dialyzed against the same buffer for further purification.

**Gel filtration chromatography.** The active fraction from Q Sepharose Fast Flow was applied to a column (1.6 × 60 cm) of Superdex 75 high resolution (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) equilibrated with 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 containing 100 mM NaCl at a flow rate of 1.0 ml/min. Fractions of 5.0 ml were collected and assayed for glucoamylase activity. The active fractions containing glucoamylase activities from the column were pooled and dialyzed against the same buffer for further analysis.

**Protein determination.** Protein concentrations in the enzyme preparations were determined by the method of Bradford [18]; with reference to a standard calibration curve for bovine serum albumin (Fluka, USA). During the column chromatographic separations the elution profiles of proteins were determined by measuring the absorbance at 280 nm.

**Molecular mass determination.** *SDS polyacrylamide gel electrophoresis.* The gel was prepared with 0.1% SDS in 12.5% separating gels and 5.0% stacking gels. Tris-glycine buffer pH 8.3 containing 0.1% SDS was used as the electrode buffer. Discontinuous SDS-PAGE in reducing conditions was performed according to the procedure of Laemmli [19]. Samples to be analyzed were treated with sample buffer and boiled for 5 min before application to the gel. Electrophoresis was run from the cathode to anode at a constant current of 20 mA per slab at room temperature in a Mini-Gel Electrophoresis unit (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). High and low molecular weight standards were used to determine the subunit molecular weight of the enzyme. After electrophoresis, proteins in the gel were visualized by staining with coomassie blue R-250.

**Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight.** The purified glucoamylase from Superdex 75 HR column was analyzed. Desalting of enzyme was performed using reusable reverse-phase cartridge. The desalted enzyme was dried using a freeze dryer. The dried enzyme was dissolved in 50% acetonitrile in trifluoroacetic acid. Mass spectra of glucoamylase were acquired using a MALDI-TOF mass spectrometer operating in linear and reflectron modes (Biflex, Bruker, Germany).

**Effect of temperature on glucoamylase activity and stability.** The optimum temperature for enzyme activity was determined by monitoring each activity at 0.1 M acetate sodium acetate buffer pH 5.0 at various temperatures from 30 to 80°C. Stability was measured by incubating the enzyme in 0.1 M acetate buffer pH 5.0 for 30 min at tem-

peratures from 30 to 80°C. Following incubation, the enzyme solution was cooled, and the remaining activity was determined under standard enzyme assay conditions.

**Effect of pH on glucoamylase activity and stability.** The optimum pH of activity was determined by monitoring each activity at 50°C at various pH values ranging between 3.0 to 9.0. The following buffers were used: 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.0–6.0); 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0–7.0) and 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0–9.0). The glucoamylase stability was examined at the pH values 3.0–9.0. Enzyme samples were pre-incubated in the above-cited buffers at 30°C for 1 h before adding the substrate. After adjustment of the pH the residual activity was determined under standard enzyme assay conditions.

**Effect of metals and reagents.** The effects of various metal ions and reagents at 1 mM on glucoamylase activity were determined by preincubating the enzyme with the individual reagents in 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 at 50°C for 30 min. Activities were then measured at 50°C in the presence of the metal ions or reagents. The activity assayed in the absence of metal ions or reagents was recorded as 100%.

**Substrate specificity of enzyme activity.** The effects of different raw starches as substrate were determined by the reaction of enzyme preparation in the presence of various raw starches (soluble starch, corn, tapioca, wheat, rice, sticky rice starch). 1 ml of enzyme was added to 1 ml of 1% (w/v) raw starches in 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 and incubated at 50°C for 10 min. The reaction was stopped by placing them in boiling water for 5 min. The amount of reducing sugar was assayed by standard procedure as described earlier. The control was reaction mixture with soluble starch.

**Kinetic properties of gluamylase.** Kinetics constants as  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $V_{max}/K_m$  were measured by estimating hydrolysis with soluble starch and maltose as substrate. Initial velocity studies were carried out under the standard condition. The concentrations of substrate were varied from 0.2–20 mg. The Lineweaver-Burk of initial velocity against substrate concentration was plotted.

**Internal amino acid sequence of glucoamylase by liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry (LC/MS/MS).** *In situ (in gel) trypsinization.* The sample preparation process followed the published method of Mortz [20]. Each band in the electrophoretic gel was excised, cut into small pieces (ca. 1 mm<sup>3</sup>) and washed with 100 µl deionized water. The gel pieces were destained by adding 200 µl of a 2 : 1 (v/v) ratio of acetonitrile: 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> for 15 min, and this step was performed several times until the gel pieces were completely destained. The supernatant was removed and gels were then dehydrated by adding 200 µl acetonitrile for 15 min prior to drying in a vacuum centrifuge. Then 50 µl of a 10 mM DTT solution in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> was added, and the proteins were reduced for 1 h at 56°C. After cooling to room temperature, the DTT solution was replaced with the same volume of 55 mM iodoacetamide in 100 mM

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and gels were incubated for 45 min at room temperature in the dark. The solution was then removed, the gel pieces were dehydrated in acetonitrile and the solvent evaporated off before adding 10 µl of a trypsin solution (proteomics grade, Sigma) (10 ng/µl in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). After allowing the gel plug to swell for 15 min at 4°C, 30 µl of 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> was added and the digestion allowed to proceed at 37°C overnight. The supernatant was then harvested following centrifugation at 10000 g for 1 min. The remaining peptides in the gel were extracted with a solution of 50% (v/v) acetonitrile containing 5% (v/v) formic acid for 10 min with shaking, and subsequently pooled with the supernatant and taken to dryness.

**LC/MS/MS and peptide blasting.** The likely amino acid sequence of each internal fragment of the trypsinized was analyzed by LC/MS/MS mass spectrometry. The extracted tryptic peptides were then subjected to LC-nano ESI/MS/MS (Sigma-Aldrich, USA). All collected LC/MS/MS data were processed and submitted to a Mascot (<http://www.matrixscience.com>) search of the NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The following criteria were used in the Mascot search: trypsin cleavage specificity with up to three missed cleavage sites, cysteine carbamidomethyl fixed modification, methionine oxidation variable modifications, ±0.2 Da peptide tolerance and MS/MS tolerance, and ESI-TRAP fragmentation scoring [20].

## RESULTS AND DISCUSSION

**Screening of endophytic fungi for glucoamylase activity.** Isolated strains of endophytic fungi were investigated for their ability to hydrolyze starch after 8 days of growth on starch agar. When the medium was flooded with iodine solution, clear zones were observed around growing colonies of the fungi. Isolate EF6 produced clear zones, with sizes around 15 mm diameter. The clear zones suggested that isolate EF6 can produce amylolytic enzymes to digest soluble starch in starch agar. Differences in the ability of the endophytic fungi to hydrolyze soluble starch could be due to the amount of enzyme excreted into starch agar and the different growth rates of the strains [21]. Isolate EF6 showed the largest clear zones when compared with other positive strain and were chosen for further investigation.

**Molecular identification of endophytic fungi EF6.** The mycelium of endophytic fungus isolate EF6 was prepared by slide culture technique and observed under light microscope. Isolate EF6 is mycelia sterile because it showed septate hyphae with non spore formation were then identified by molecular technique. Endophytic fungi EF6 was sent for identification by molecular methods at the Macrogen, Seoul, Korea. The rDNA ITS region of endophytic fungi EF6 was amplified with the conserved fungal primer ITS<sub>1F</sub> and ITS<sub>4</sub>. Endophytic fungi EF6 produced a single ITS band, containing a part of the 18S, ITS1, 5.8S and 28S rDNA. The nucleotide sequence data reported in this

Purification table of glucoamylase from endophytic fungi EF6

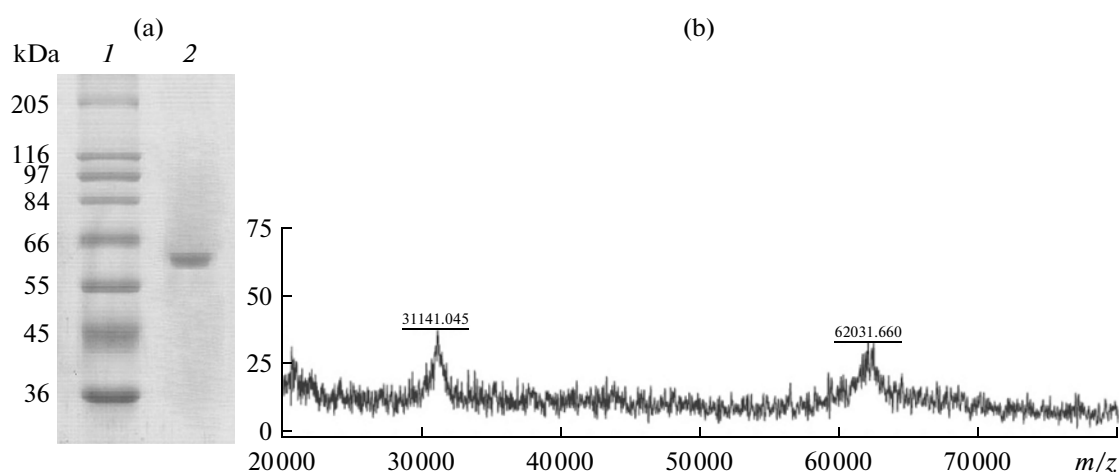
Purification step	Total protein, mg	Total activity, U	Specific activity, U/mg	Yield, %	Purification, fold
Culture filtrate	519.35	27.157.85	52.29	100.00	1.00
80% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Precipitation	302.51	22.593.04	74.69	83.19	1.43
Q Sepharose FF	23.47	7.808.44	332.70	28.75	6.36
Superdex 75 HR	3.28	2.486.19	757.98	9.15	14.49

paper will appear in the DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence databases with the accession number AB284189.

**Purification of glucoamylase.** Endophytic fungus EF6 was cultivated in the of Mandels medium [22] containing 2% soluble starch per liter, at pH 5.0, 200 rpm for 10 days which was optimal condition determined by glucoamylase activity measuring the production of reducing sugar using DNS method [17]. The myceliums were removed by filtration, and the crude enzyme in the supernatant fraction was collected. Through the step of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation to give 80% saturation, and dialyzed against 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. The purification of glucoamylase was increased by 1.43 fold and 83.19% yield was obtained, the glucoamylase was concentrated by lyophilization to dryness. Then concentrated glucoamylase solution was applied onto Q Sepharose chromatography. The major active peak contained glucoamylase activity was adsorbed onto the Q Sepharose column and eluted from the column at 0.75–0.80 M NaCl, whereas the minor active peak was not adsorbed on the resin and eluted

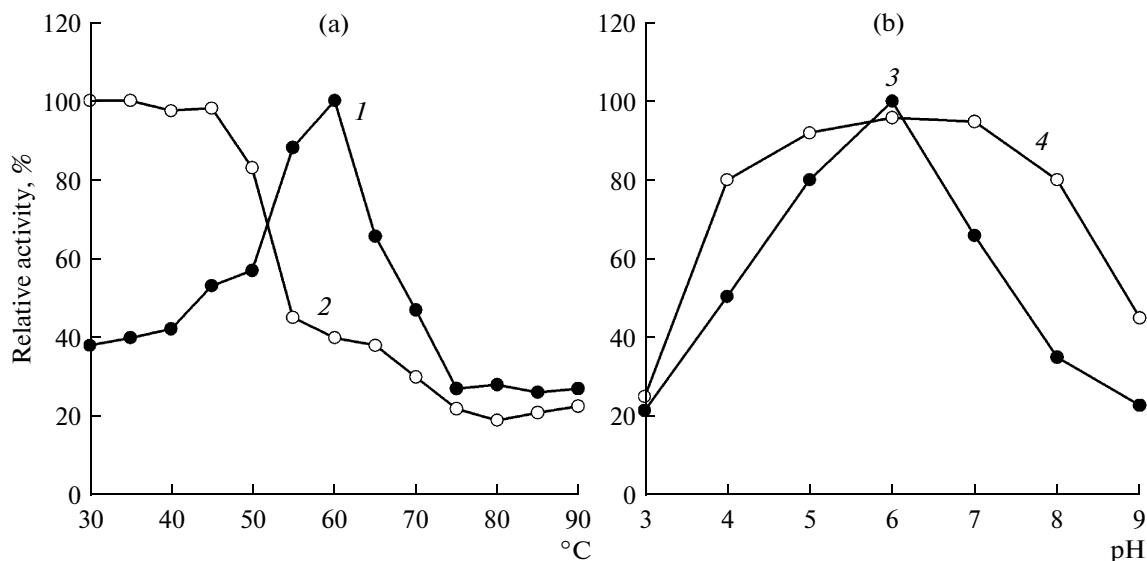
with most of the loading protein in the starting wash period. Then active fractions were pooled, and dialyzed against 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, for this step the enzyme with 6.36 purification fold and 28.75% yield was obtained. Before the next Superdex 75 chromatography, the glucoamylase was concentrated by lyophilization to dryness. Superdex 75 chromatography column profiles of glucoamylase separation which was well isolated from other proteins. The fraction which contains glucoamylase was the major peak. The overall purification steps of glucoamylase from endophytic fungi EF6 are summarized in Table 1. Finally, the glucoamylase was purified to 14.49 fold with the yield of 9.15%. Specific glucoamylase activity was increased from 52.29 of the crude enzyme to 757.98 U/mg protein of the purified enzyme. Although the recovery rate was relatively low, the purification steps were far more rapid than some other methods [5, 23–28].

**Molecular mass determination.** Molecular weight of extracellular glucoamylases of endophytic fungi EF6 was determined by SDS-PAGE and it was about 62.2 kDa (Fig. 1a). These values are in agreement with the literature



**Fig. 1.** SDS-PAGE of purified glucoamylase from endophytic fungi EF6: (a): 1 – molecular weight marker of protein standard, i.e., myosin (205 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97 kDa), fructose-6-phosphate kinase (84 kDa), albumin (66 kDa), glutamic dehydrogenase (55 kDa), ovalbumin (45 kDa), and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), 2 – purified glucoamylase from endophytic fungi EF6. (b) – MALDI-TOF mass spectrum of purified glucoamylase from Superdex-75 high resolution column.





**Fig. 2.** Effect of temperature (a) and pH (b) on glucoamylase activity and stability; (a): 1 – temperature activity, 2 – temperature stability. The following buffer systems were used 0.1 M acetate buffer pH 5.0 for 30 min; (b): 3 – pH activity, 4 – pH stability. The following buffer systems were used: 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.0–6.0), 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0–7.0) and Tris-HCl buffer (pH 7.0–9.0). The values shown represent averages from triplicate experiments.

that reports that the molecular masses of fungal glucoamylases are in the range 45–90 kDa [29]; as those of *Termomyces lanuginosus* [30]; *Chaetomium thermophilum* [31]; and *Sclerotinia sclerotiorum* [26]. However, a higher value of MW of 125 kDa was reported for *A. niger* glucoamylase [32]. To confirm the mass of analyse, mass spectrometry was used (Fig. 1b). The  $m/z$  of 62.031 and 31.141 Da were recorded and were related to singlet and doublet charge species of purified glucoamylase, respectively. This result is supported the MW which performed by SDS-PAGE.

**Effect of temperature on glucoamylase activity and stability.** To determine the effect of temperature on purified glucoamylase from endophytic fungi EF6, enzyme activities were estimated over the temperature range of 30–90°C. This enzyme exhibited optimum activity in the range from 55–60°C (Fig. 2a). Similar finding were also reported for glucoamylase from *A. oryzae* [33]; *Monascus* sp. [34]; and *M. javanicus* [35]. After 30 minutes for incubation, glucoamylase was found to be stable at temperature lower than 50°C. The activity is rapidly decreased and the remaining residual activity was about 45% of original at 55°C (Fig. 2a). On the other hand, the enzymes which was isolated from several mesophilic fungi, was shown to be highly susceptible to thermal denaturation at temperature above 50°C [28, 36].

**Effect of pH on glucoamylase activity and stability.** The optimum pH of the purified glucoamylase from endophytic fungi EF6 was determined by measuring its activity at different pH values. The result suggested that purified glucoamylase was active with pH optimal of 6.0 (Fig. 2b). Similar results were obtained for extracellular glucoamylase from *Humicola grisea* [23]; and *A. awamori* [37]. Most

fungal starch-degrading enzymes have optimum pH values of 5.0–7.0 [38]. Generally, glucoamylases obtained from fungi are active at acidic pH values. However, several forms have variable values of pH optimum. The pH stabilities of the enzyme at 50°C were determined by incubating the enzyme in the respective buffers of different pH values for 1 h. The enzyme was stable over an acidic pH range of 4.0–7.0 at 50°C (Fig. 2b).

**Effect of metals and reagents.** The effect of various metal ions on purified glucoamylases activity was determined using soluble starch as substrate. The assays were carries out in the presence of 1 mM concentrations of each of the metal ions and reagents. The activity assayed in the absence of cations or reagents was taken as 100%. The inhibitory effect has been shown in the present of  $Hg^{2+}$  (8.4%). Moreover,  $Cu^{2+}$  (65.3%) and  $Fe^{2+}$  (75.5%) have inhibited the glucoamylases activity. The chelating agent; EDTA (100.3%) did not affect glucoamylases activity which indicating that glucoamylases is not a metalloprotein. Furthermore, DTT (106.9%) was not an inhibitor suggested that disulfide bonds were not involved for enzyme activity. Activation by  $Ca^{2+}$  (107.5%),  $Co^{2+}$  (102.4%),  $Mn^{2+}$  (121.5%),  $Mg^{2+}$  (121.5%), glycerol (104.5%) and DMSO (104.5%) may be explained by stabilization of the enzyme structure. Glucoamylase of *Chaetomium thermophilum* was more active in the presence of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^{+}$ , and  $K^{+}$ , and inhibited by  $Fe^{2+}$ ,  $Ag^{+}$ , and  $Hg^{2+}$  [39].  $Mn^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  enhanced glucoamylase activity from *Himicola grisea* var. *thermoidea* [27]; and lower concentrations of  $Mn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  enhanced the activity of glucoamylase of *Sclerotinia sclerotiorum* [26].

**Substrate specificity.** The ability of hydrolysis on various substrates by glucoamylase was determined using var-

		5	10	15		Accession Number
Endophytic fungi EF6		R A L A N H K Q	V V D S F R S			
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	305	R A L A N H K Q	V V D S F R S			319 Q58HN1
<i>Aspergillus shirousami</i>	296	R A L A N H K E	V V D S F R S			310 P22832
<i>Aspergillus niger</i>	297	R A L A N H K E	V V D S F R S			311 P69328
<i>Aspergillus awamori</i>	296	R A L A N H K E	V V D S F R S			310 Q76L97
<i>Fusarium verticillioides</i>	297	R A L A N H K E	V V D S F R S			311 B0Z3Y3
<i>Aspergillus oryzae</i>	300	R A L A N H K E	V V D S F R S			314 Q59846
<i>Talaromyces emersonii</i>	302	R A L A N H K V	V T D S F R S			316 Q9C1V4
<i>Aspergillus flavus</i>	299	R A L A N H K V	V T D S F R S			313 B8NX52
<i>Penicillium notatum</i>	295	R A L S N H K E	Y V D S F R S			308 Q76KF7
<i>Neurospora crassa</i>	309	R A L A N H K V	V V D S M R			322 P14804

**Fig. 3.** Amino acid sequences from the fragment obtained by tryptic digestion of the purified glucoamylase from endophytic fungi EF6. Comparisons are made with other glucoamylase family. Shaded regions represent regions of identity.

ious substrates. The results suggested that glucoamylase has the highest hydrolyzing activity on soluble starch (100.0%). Tapioca (95.8%), corn (88.3%), rice (67.3%), wheat (64.7%), and sticky rice (55.4%) flour also showed similar activity but slightly lower. This differential rate of digestion was due to the existence of starch granules, which in turn depends upon its botanical source [40]. These results suggest that hydrolysis of raw starches is not only a property of the enzyme but that it also depend on the type of starch [21].

**Kinetics properties.** Reaction kinetics of the purified glucoamylase was determined from Lineweaver-Burk plots with soluble starch and maltose as substrate under defined assay conditions. The enzyme had  $K_m$  values of 2.63, and 1.88 mg/ml and  $V_{max}$  values of 1.25, and 2.54 U/min/mg protein, and  $K_m/V_{max}$  values of 0.48 and 1.35, respectively. The enzyme possesses greater affinity to maltose which was confirmed by the values of catalytic efficiency. Therefore these data are consistent with values expected for complete hydrolysis, the small difference observed in the yields of the product in the case of starch could be due to the inability of the enzyme to attack  $\alpha$ -D-1,6-glucosidic linkages [41].

**Identification of glucoamylase.** The internal sequence analysis of the purified glucoamylase was obtained by digestion with trypsin and sequence analysis with LC-MS/MS and the identified tryptic fragment was found to be RALAN HKQVV DSFRS. Then this peptide sequence was used to perform the database searching using SwissProt database. The search result is shown in Fig. 3. From the results of database searching, partial amino acid sequences of purified protein is similar to glucoamylase from *T. lanuginosus*, *A. shirousami*, *A. niger*, *A. awamori*, *F. verticillioides*, *A. oryzae*, *T. emersonii*, *A. flavus*, *P. notatum*, and *Neurospora crassa*. From all result suggested that the purified enzyme from endophytic fungi EF6 is glucoamylase (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucohydrolase).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Chulalongkorn University graduate school thesis grant, the National Research University Project of CHE, the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (AG001B, AM1019A), and the Thai Government Stimulus Package 2

(TKK2555), for financial support of this research, as well as the Research Institute of Biotechnology and Genetic Engineering and Biotechnology program, the Faculty of Science, Chulalongkorn University for support and facilities. We also wish to thank Dr. Robert Butcher (Publication Counselling Unit, Chulalongkorn University) for his constructive comments in preparing this manuscript.

#### REFERENCES

- Weil, C.E., Burch, R.J., and Van Dyk, J.W., *Cereal Chem.*, 1954, vol. 31, pp. 150–158.
- Pazur, J.H. and Ando, T., *J. Biol. Chem.*, 1960, vol. 235, pp. 297–302.
- Koshland, D.E.Jr., *Biol. Rev.*, 1953, vol. 28, pp. 416–436.
- Fierobe, H.P., Stoffer, B.B., Frandsen, T.P., and Svensson, B., *Biochemistry*, 1996, vol. 35, pp. 8696–8704.
- James, J.A. and Lee, B.H., *J. Food Biochem.*, 1997, vol. 21, pp. 1–52.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, V.T., Singh, D., and Mohan, R., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000, vol. 31, pp. 135–152.
- Jaffar, M.B., Bharat, R.P., Norouzian, D., Irani, S.D., and Shetty, P., *Indian J. Exp. Biol.*, 1993, vol. 31, pp. 87–89.
- Norouzian, D. and Jaffar, M.B., *Indian J. Exp. Biol.*, 1993, vol. 31, pp. 680–681.
- Frandsen, T.P., Christensen, T., Stoffer, B., Lehmback, J., Dupont, C., and Hanzatic, R.B., *Biochemistry*, 1995, vol. 34, pp. 10162–10169.
- Reilly, P.J., *Starch*, 1999, vol. 51, pp. 269–274.
- Tan, R.X. and Zou, W.X., *Nat. Prod. Rep.*, 2001, vol. 18, pp. 448–459.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.K., and Krohn, K., *Mycol. Res.*, 2002, vol. 106, pp. 996–1004.
- Mandels, M. and Reese, E.T., *J. Bacteriol.*, 1957, vol. 73, pp. 816–826.
- Zhou, Z., Miwa, M. and Hogetsu, T., *New Phytol.*, 1999, vol. 144, pp. 55–63.
- Gardes, M. and Bruns, T.D., *Mol. Ecol.*, 1993, vol. 2, pp. 113–118.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Eds. M.A.,

- Innis, D.H., Gelfand, J.J., and Sninsky T.J., White San Diego: Acad. Press, 1990.
17. Miller, G.L., *Anal. Chem.*, 1959, vol. 31, pp. 426–428.
  18. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–257.
  19. Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
  20. Mortz, E., Vorm, O., Mann, M., and Roepstorff, P., *Biol. Mass Spect.*, 1994, vol. 23, pp. 249–261.
  21. Marlida, Y., Saari, N., Radu, S., and Bakar, F.A., *Bio-tech. Lett.*, 1999, vol. 22, pp. 95–97.
  22. Mandels, M. and Weber, J., *Adv. Chem.*, vol. 95, pp. 391–414.
  23. Campos, L. and Felix, C.R., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, pp. 2436–2438.
  24. Kleinman, M.J., Wilkinson, A.E., Wright, I.P., Evans, I.H., and Bevan, E.A., *Biochem. J.*, 1988, vol. 249, pp. 163–170.
  25. Li, D.C., Yang, Y.J., Peng, Y.L., and Shen, C.Y., *Mycol. Res.*, 1998, vol. 102, pp. 568–572.
  26. Martel, M.B., Herve, D.P.C., Letoublon, R., and Fevre, M., *Can. J. Microbiol.*, 2002, vol. 48, pp. 212–219.
  27. Tosi, L.R.O., Terenzi, H.F., and Jorge, J.A., *Can. J. Microbiol.*, 1993, vol. 39, pp. 846–852.
  28. Yamasaki, Y., Suzuki, Y., and Ozawa, J., *Agric. Biol. Chem.*, 1977, vol. 41, pp. 755–762.
  29. Norouzzian, D., Rostami, K., Nouri, I.D., and Saleh, M., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, vol. 16, pp. 155–161.
  30. Thorsen, T.S., Johnsen, A.H., Josefsen, K., and Bensen, B., *Biochem. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1764, pp. 671–676.
  31. Chen, J., Li, D., Zhang, Y., and Zhou, Q., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2005, vol. 55, pp. 175–181.
  32. Suresh, C., Dubey, A.K., Srikanta, S., and Kumar, U.S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, vol. 51, pp. 673–675.
  33. Mitsue, T., Saha, B.C., and Ueda, S.J., *Appl. Biochem.*, 1979, vol. 1, pp. 410–422.
  34. Yasuda, M., Kuwae, M., and Matsushita, J., *Agric. Biol. Chem.*, 1989, vol. 53, pp. 247–249.
  35. Yamasaki, Y. and Konno, H., *Agric. Biol. Chem.*, 1991, vol. 55, pp. 2429–2430.
  36. Yamasaki, Y., Suzuki, Y., and Ozawa, J., *Agric. Biol. Chem.*, 1977, vol. 41, pp. 2149–2161.
  37. Fang, T.Y. and Clark, F., *Protein Eng.*, 1998, vol. 11, pp. 383–388.
  38. Norouzzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J.M., and Young, M.M., *Biotechnol. Adv.*, 2006, vol. 24, pp. 80–85.
  39. Cereia, M., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Green, L.J., Rosa, J.C., and Polizeli, M.L.T.M., *J. Basic. Microbiol.*, 2000, vol. 2, pp. 83–92.
  40. Ray, R.R. and Chakraverty, R., *Mycol. Res.*, 1998, vol. 102, pp. 1563–1567.
  41. Basaveswara, R.V., Sastri, N.V.S., and Subba, R.P.V., *Biochem. J.*, 1981, vol. 193, pp. 379–387.

УДК 582.287.237:615.322

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr.

© 2011 г. Д. Н. Оленников\*, Л. М. Танхаева\*, С. В. Агафонова\*\*

\*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

Поступила в редакцию 22.09.2010 г.

Проведено исследование антиоксидантной активности плодовых тел *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. (Polyporales), полученных методом природных плантаций в условиях Прибайкалья (Иркутская область). Установлено, что наиболее выраженное действие характерно для этилацетатной фракции, из которой в результате хроматографического разделения выделено 7 соединений, идентифицированных, как кверцетин, кемпферол, (+)-катехин, п-кумаровая, галловая, кофейная и хлорогеновая кислоты. Все соединения выделены у данного базидиального вида впервые. Методом ВЭЖХ определено количественное содержание веществ в плодовых телах *L. sulphureus*. Установлено, что наличие фенольных соединений обуславливает антиоксидантную активность препаратов *L. sulphureus*.

В последние десятилетия возрос интерес к источникам биологически активных соединений грибного происхождения, обладающих протеолитической, иммуномодулирующей, антиоксидантной, антибиотической и другими видами активностей [1, 2]. Возможность использования трутовых грибов как наиболее доступных объектов в биоконверсии органических отходов, в пищевой индустрии и медицине предопределяет необходимость более глубокого исследования их химического состава, а также определения условий, влияющих на накопление биологически активных соединений.

Ксилотрофный базидиомицет *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. (сем. Polyporales), относящийся к грибам бурой гнили, является перспективным биотехнологическим объектом. По экологическим характеристикам *L. sulphureus* относится к термофилам, легко культивируется как в лабораторных, так и в природных условиях, образуя в короткий срок плодовые тела значительной биомассы.

Химический состав плодовых тел *L. sulphureus* разнообразен и представлен различными классами соединений [3]. Исследования биологической активности *L. sulphureus* выявили наличие в суммарных фракциях и индивидуальных соединениях иммуностимулирующее, противоопухолевое [4], гем-агглютинирующее [5], антикоагулянтное [6, 7], цитотоксическое [8, 9], апоптоз-индуцирующее [8], ан-

тиоксидантное [10, 11], антимикробное [11] и инсулино-тропное действие [12]. Изучение антиоксидантной активности ранее было проведено в виде экспериментов без определения соединений, ответственных за проявление данного вида биологической активности [10, 11].

Цель работы – исследование антиоксидантной активности плодовых тел *L. sulphureus* в условиях *in vitro* и выделение наиболее активных компонентов.

### МЕТОДИКА

**Плодовые тела *L. sulphureus*.** Материалом для исследования служили зрелые плодовые тела *L. sulphureus*, полученные, как описано ранее [13], на опытных плантациях, заложенных в Слюдянском, Усть-Кутском и Иркутском районах Иркутской области в 2005–2008 гг.

В работе использовали галловую, кофейную кислоты, кверцетин, ионол, β-каротин, краситель Прочный синий Б (“Fluka”, Швейцария), глюкозу (“Roquete”, Франция), олеиновую кислоту, диметилсульфоксид (ДМСО, “Sigma”, США), Тритон X-100 (“Ferak”, Германия), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (ДФПГ, “MP Biomedicals Inc.”, США).

**Фракционирование экстрактивных веществ плодовых тел *L. sulphureus*.** Измельченные и высушенные плодовые тела *L. sulphureus* (700 г, образец № Л-1Х) экстрагировали 70%-ным этанолом в соотношении 1 : 20 на кипящей водяной бане пятикратно. Полученную вытяжку концентрировали под вакуумом; сухой остаток суспендировали в воде и подвергали экстракции последовательно н-гексаном, хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом. В результате получены гексановая (ЛФ-1, 4.30 г), хлороформная

**Используемые сокращения.** ДФПГ – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил, ЛФ-1 – ЛФ-7 – фракции экстрактивных веществ плодовых тел *L. sulphureus*, ОАП – общий антиоксидантный потенциал, ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография, МС – масс-спектрометрия, ОФС – общее содержание фенольных соединений, ОФЛ – общее содержание флавоноидов, ОКР – общее содержание каротиноидов, ОПС – общее содержание полисахаридов.

(ЛФ-2, 2.10 г), этилацетатная (ЛФ-3, 1.40 г), бутанольная (ЛФ-4, 3.60 г) фракции и водный остаток (ЛФ-5, 26.40 г). Плодовые тела после обработки этанолом высушивали и экстрагировали водой в соотношении 1 : 30 на кипящей водяной бане трехкратно. Водные вытяжки концентрировали под вакуумом до объема 200 мл. К водному остатку приливали 95%-ный этанол (1 : 10) и оставляли на 2 ч. Выпавший осадок центрифугировали при 6000 г, промывали 70%- и 95%-ным этанолом и высушивали. Получено 12.20 г, фракция ЛФ-6. Супернатант после удаления ЛФ-6 концентрировали под вакуумом до суха. Получено 4.40 г, фракция ЛФ-7.

**Химический анализ фракций.** Во фракциях *L. sulphureus* определяли общее содержание фенольных соединений (ОФС) по методу Фолина [14] в пересчете на галловую кислоту, общее содержание флавоноидов (ОФЛ) методом спектрофотометрии [15] в пересчете на кверцетин, общее содержание каротиноидов (ОКР) методом хромато-спектрофотометрии [16] в пересчете на латипоровую кислоту А ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 635$  при 450 нм) и общее содержание водорастворимых полисахаридов (ОПС) антрон-серным методом [17] в пересчете на глюкозу.

**Антиоксидантная активность.** Общий антиоксидантный потенциал (ОАП) определяли молибдатным методом [18], антирадикальную активность (АРА) — с применением стабильного свободного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (ДФПГ) по методу [19], восстановительную способность (ВС) — по методу [20].

**Пероксидная деградация β-каротина (ПДБК) в системе олеиновая кислота—ДМСО—H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** 2 мг β-каротина, 16 мг олеиновой кислоты и 160 мг Тритона X-100 растворяли в 50 мл хлороформа, после чего органический растворитель удаляли под вакуумом при 30°C. Остаток растворяли в бидистиллированной воде, раствор переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки бидистиллированной водой. Для приготовления реакционной смеси в пробирку с пробкой со шлифом вносили 0.2—1.0 мл исследуемого раствора, 2 мл ДМСО, 2 мл раствора β-каротина и 2 мл 3%-ного раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Общий объем раствора доводили до 8 мл бидистиллированной водой. Полученную смесь термостатировали при 50°C в течение 120 мин. Оптическую плотность исследуемого раствора определяли при 460 нм, используя в качестве раствора сравнения бидистиллированную воду.

**Выделение и идентификация компонентов фракции ЛФ-3.** Фракцию ЛФ-3 (1 г) разделяли с применением колоночной хроматографии на силикагеле (2 × 40 см) с использованием в качестве элюента градиентной системы хлороформ—метанол (100 : 0 → 70 : 30, по объему). Полученные фракции рехроматографировали на Сефадексе LH-20 (“Pharmacia”, Швеция, колонка 2 × 60 см) с использованием в

качестве элюента градиентной системы метанол—вода (100 : 0 → 0 : 100, по объему). Контроль по разделению фракций проводили с использованием высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Подфракции дополнительно очищали с применением препаративной тонкослойной хроматографии на силикагеле в системах растворителей петролейный эфир—диэтиловый эфир (1 : 2) и толуол—этилацетат—муравьиная кислота (5 : 4 : 1). В результате хроматографического разделения из фракции ЛФ-3 выделено 7 соединений: ЛФ-3/1 (12 мг), ЛФ-3/2 (4 мг), ЛФ-3/3 (3 мг), ЛФ-3/4 (12 мг), ЛФ-3/5 (4 мг), ЛФ-3/6 (15 мг) и ЛФ-3/7 (8 мг). Идентификацию выделенных соединений проводили по данным температуры плавления, МС, УФ-, ИК- и <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии.

1. ЛФ-3/1 (4-гидроксикоричная кислота, п-кумаровая кислота). Т. пл. 207°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 230, 298 пл, 310. МС (*m/z*): 164 [M]<sup>+</sup>. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3395, 3031, 2845, 1679, 1630, 1604, 1514, 1451, 1424, 1380, 1329, 1315, 1285, 1175, 1217, 1175, 1106, 980, 944, 861, 832, 797, 690. <sup>13</sup>С-ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, δ/м.д.): 115.1 (С-8), 116.3 (С-3, С-5), 125.0 (С-1), 130.2 (С-2, С-6), 144.6 (С-7), 157.8 (С-4), 168.6 (СООН).

2. ЛФ-3/2 (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаван, кверцетин). Т. пл. >300°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 255, 268, 370. МС (*m/z*): 302 [M]<sup>+</sup>. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3418, 3290, 1670, 1615, 1512, 1457, 1429, 1354, 1315, 1242, 1211, 1162, 1139, 1094, 999, 932, 879, 848, 818, 787, 771, 706, 690. <sup>13</sup>С-ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, δ/м.д.): 93.7 (С-8), 98.5 (С-6), 104.8 (С-4а), 115.2 (С-2'), 116.0 (С-5'), 122.0 (С-1'), 122.5 (С-6'), 134.6 (С-3), 145.3 (С-3'), 147.3 (С-2), 148.8 (С-4'), 146.3 (С-8а), 161.5 (С-5), 164.7 (С-7), 178.5 (С-4).

3. ЛФ-3/3 (3,5,7,4'-тетрагидроксифлаван, кемпферол). Т. пл. >300°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 265, 368. МС (*m/z*): 286 [M]<sup>+</sup>. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3422, 2929, 1655, 1606, 1567, 1511, 1441, 1369, 1316, 1254, 1223, 1174, 1116, 1087, 1007, 977, 886, 838, 704, 636. <sup>13</sup>С-ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, δ/м.д.): 94.4 (С-8), 99.0 (С-6), 103.9 (С-4а), 116.2 (С-3',5'), 123.4 (С-1'), 130.4 (С-2',6'), 136.5 (С-3), 147.6 (С-2), 157.9 (С-5), 160.3 (С-9), 162.2 (С-4'), 165.2 (С-7), 176.7 (С-4).

4. ЛФ-3/4 (3,4-дигидроксикоричная кислота, кофейная кислота). Т. пл. 202°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 247, 300, 330. МС (*m/z*): 180 [M]<sup>+</sup>. ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3401, 3217, 1641, 1597, 1528, 1445, 1374, 1351, 1293, 1273, 1211, 1171, 1117, 969, 934, 893, 848, 813, 800, 776, 736, 697. <sup>13</sup>С-ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>, δ/м.д.): 114.7 (С-8), 114.9 (С-2), 115.6 (С-5), 121.2 (С-6), 125.7 (С-1), 145.0 (С-3), 148.2 (С-4), 144.2 (С-7), 169.2 (СООН).

5. ЛФ-3/5 [3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаван, (+)-катехин]. Т. пл. 175°C. УФ-спектр (λ макс, нм): 220, 277. [α]<sub>D</sub> +15°. МС (*m/z*): 290 [M]<sup>+</sup>. ИК-спектр

( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3260, 1604, 1519, 1457, 1366, 1282, 1234, 1180, 1144, 1110, 1076, 1026, 976, 866, 820, 763.,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО- $d_6$ ,  $\delta/\text{м.д.}$ ): 27.9 (С-4), 83.2 (С-2), 68.4 (С-3), 95.0 (С-8), 95.9 (С-6), 100.4 (С-4а), 115.2 (С-2'), 116.0 (С-5'), 120.2 (С-6'), 132.4 (С-1'), 146.3 (С-3', С-4'), 157.4 (С-5), 156.9 (С-8а), 158.2 (С-7).

6. ЛФ-3/6 (3,4,5-тригидроксibenзойная кислота, галловая кислота). Т.пл. 248°C. УФ-спектр ( $\lambda$  макс, нм): 220, 263. МС ( $m/z$ ): 170  $[\text{M}]^+$ . ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3263, 1655, 1607, 1579, 1560, 1524, 1509, 1489, 1459, 1425, 1386, 1316, 1256, 1219, 1096, 1024, 958, 900, 865, 799, 767, 733, 685, 634.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО- $d_6$ ,  $\delta/\text{м.д.}$ ): 108.9 (С-2, С-6), 121.0 (С-1), 138.1 (С-4), 144.8 (С-3, С-5), 167.4 (СООН).

7. ЛФ-3/7 [5-(3',4'-дигидроксициннамоил)-хинная кислота, 5-кофеил-хинная кислота]. Т.пл. 220°C. УФ-спектр ( $\lambda$  макс, нм): 240, 301 пл., 331. МС ( $m/z$ ): 354  $[\text{M}]^+$ . ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3338, 1685, 1637, 1599, 1516, 1441, 1321, 1284, 1249, 1181, 1157, 1131, 1110, 1085, 1034, 969, 906, 852, 817, 767, 739.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр (125 МГц, ДМСО- $d_6$ ,  $\delta/\text{м.д.}$ )\* : 36.0 (С-2<sup>Хин</sup>), 37.2 (С-6<sup>Хин</sup>), 68.4 (С-4<sup>Хин</sup>), 70.2 (С-5<sup>Хин</sup>), 71.9 (С-3<sup>Хин</sup>), 73.0 (С-1<sup>Хин</sup>), 114.3 (С-8<sup>Коф</sup>), 114.9 (С-5<sup>Коф</sup>), 115.7 (С-2<sup>Коф</sup>), 121.2 (С-6<sup>Коф</sup>), 125.4 (С-1<sup>Коф</sup>), 145.2 (С-7<sup>Коф</sup>), 145.6 (С-3<sup>Коф</sup>), 148.0 (С-4<sup>Коф</sup>), 166.2 (С-9<sup>Коф</sup>), 175.6 (СООН<sup>Хин</sup>).

**Анализ ВЭТСХ.** Использовали пластины Сорбфил ПТСХ-АФ-В (“Имид Ltd.”, Россия) 15 × 10 см. По 2 мкл исследуемого раствора и 0.1%-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 60 мм, после чего пластины высушивали, обрабатывали методом погружения в 0.03%-ный раствор красителя Прочного синего Б в смеси дихлорэтан–метанол (5 : 1) и высушивали в токе воздуха в течение 10 с. Денситограммы получали с использованием планшетного сканера Bear Paw 2400CU Plus (“Mustek System Inc.”, Япония) и пакета программ Сорбфил ТСХ Видеоденситометр 2.0 (“Имид Ltd.”, Россия).

**ВЭТСХ/ДФПГ-аутография.** Анализ проводили в условиях, аналогичных ВЭТСХ, с использованием в качестве системы смесь растворителей толуол–этилацетат–муравьиная кислота (5 : 4 : 1). Для проявления применяли 0.05%-ный раствор ДФПГ в метаноле. Полученные хроматограммы сканировали через 20 мин после проявления.

**Спектроскопические исследования.** Исследования проводили на спектрофотометре UV-Vis mini (“Shimadzu”, Япония) в кварцевых кюветах 10 мм.

\* Хин – остаток хинной кислоты,  
Коф – остаток кофейной кислоты.

**МС-анализ.** Анализ проводили на масс-спектрометре высокого разрешения МАТ 8200 (“Finnigan”, США).

**ИК-спектроскопия.** ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре ФТ-801 (“Симекс”, Россия) с использованием универсальной приставки нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, “Симекс”, Россия) в интервале 4000–600  $\text{см}^{-1}$  на кристалле-подложке из селенида цинка.

**Спектроскопия ЯМР.** Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S (“Varian”, США), рабочая частота 125.7 МГц. Спектры получены для 1%-ных растворов в ДМСО- $d_6$ .

**Анализ ВЭЖХ.** Проводили на жидкостном хроматографе Summit (“Dionex”, США) на колонке Prodigy ODS 3 (250 × 4.6 мм, 5 мкм, “Phenomenex”, США). Подвижная фаза – смесь 0.1%-ного водного раствора ТФУ (А) и ацетонитрила (Б) в условиях линейного градиента концентрации А : Б (10 : 90) → (70 : 30) от 0 до 30 мин, скорость подвижной фазы 1 мл/мин, температура колонки 20°C. Детектирование проводили с использованием УФ-детектора UVD 170S (“Dionex”, США) при 280 нм.

**Регрессионный анализ.** Выполняли с применением пакета программ Advanced Grapher 2.11 (“Alentum Software Inc.”, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения исследования антиоксидантной активности *L. sulphureus* экстрактивные вещества плодовых тел данного базидиального вида были подвергнуты предварительному фракционированию, в ходе которого получено 7 фракций: гексановая (ЛФ-1), хлороформная (ЛФ-2), этилацетатная (ЛФ-3), бутанольная (ЛФ-4), полисахаридная (ЛФ-6) и две водные фракции (ЛФ-5 и ЛФ-7). Наибольший выход наблюдался для фракций ЛФ-5 (3.77%) и ЛФ-6 (1.74%), наименьший – для ЛФ-3 (0.20%) и ЛФ-2 (0.30%). Изучение химического состава полученных фракций показало, что максимальное накопление фенольных соединений и флавоноидов характерно для фракции ЛФ-3 (174.73 и 90.77 мг/г соответственно), каротиноидов – для фракции ЛФ-2 (1.099 мг/г), а полисахаридов – для фракции ЛФ-6 (45.74 мг/г) (табл. 1).

Определение фракции, обладающей наибольшей антиоксидантной активностью, проводили с применением ДФПГ-метода (табл. 1). Установлено, что активность исследуемых фракций распределяется следующим образом: ЛФ-3 ( $\text{IC}_{50} = 74.98$  мкг/мл) > ЛФ-4 > ЛФ-2 > ЛФ-7 > ЛФ-5 > ЛФ-1 > ЛФ-6 ( $\text{IC}_{50} > 2000$  мкг/мл). Применение регрессионного анализа показало, что присутствие фенольных соединений оказывало выраженное влияние на проявление антиоксидантного действия фракций (рис. 1). Величины коэффициента корреляции для уравне-

**Таблица 1.** Химический состав и антирадикальная активность фракций *L. sulphureus*

Фракция	Выход, %*	ОФС, мг/г	ОФЛ, мг/г	ОКР, мг/г	ОПС, мг/г	ДФПГ, IC <sub>50</sub> мкг/мл
ЛФ-1	0.61	0.74 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.120 ± 0.002	н.о.**	1080.01 ± 21.63
ЛФ-2	0.30	22.57 ± 0.68	14.82 ± 0.44	1.099 ± 0.021	н.о.	334.85 ± 6.70
ЛФ-3	0.20	174.73 ± 5.24	90.77 ± 2.72	н.о.	н.о.	74.98 ± 1.49
ЛФ-4	0.51	44.03 ± 1.32	27.14 ± 0.81	н.о.	н.о.	229.79 ± 4.58
ЛФ-5	3.77	7.23 ± 0.22	5.28 ± 0.16	н.о.	н.о.	783.75 ± 15.67
ЛФ-6	1.74	н.о.	н.о.	н.о.	45.74 ± 0.82	>2000
ЛФ-7	0.63	11.70 ± 0.35	9.22 ± 0.27	н.о.	н.о.	687.33 ± 13.75

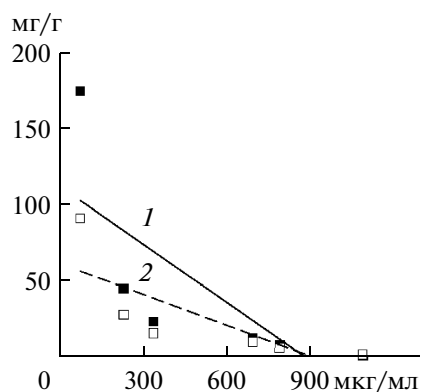
\* От массы возд.-сух. сырья. \*\* Не обнаружено.

ний зависимости антиоксидантной активности от содержания фенольных соединений составляли 0.7426 и 0.7710 соответственно для общего содержания фенольных соединений и общего содержания флавоноидов.

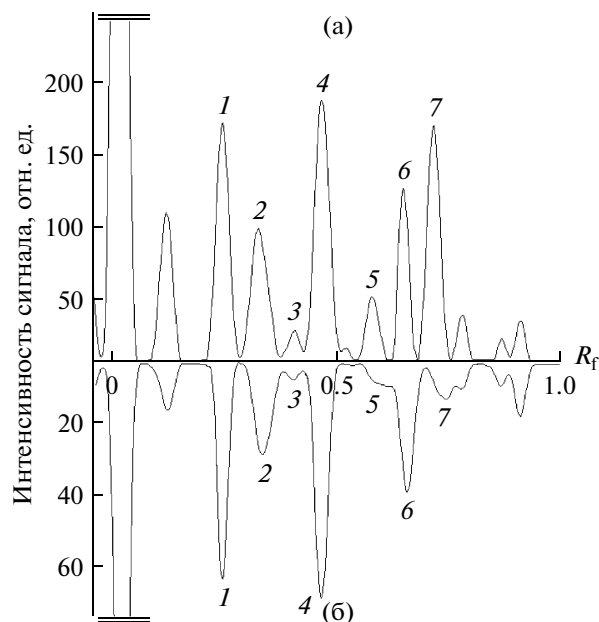
Более детальное химическое исследование было проведено для фракции ЛФ-3. С применением колоночной хроматографии на силикагеле и Сефадексе LH-20 с последующей препаративной хроматографией было выделено семь соединений (ЛФ-3/1–ЛФ-3/7), которые, по результатам ВЭТСХ/ДФПГ-автографии, оказывали наиболее выраженное антиоксидантное действие (рис. 2). Согласно данным по температуре плавления, МС, УФ-, ИК- и <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии соединения были идентифицированы, как п-кумаровая кислота (ЛФ-3/1), кверцетин (ЛФ-3/2), кемпферол (ЛФ-3/3), кофейная кислота (ЛФ-3/4), (+)-катехин (ЛФ-3/5), галловая кислота (ЛФ-3/6) и 5-кофеилхинная кислота (ЛФ-3/7) (рис. 3). Все вещества были выделены из плодовых тел *L. sulphureus* впервые. Ранее данные соединения были обнаружены в плодовых телах других видов ле-

карственных и пищевых грибов: п-кумаровая кислота – *Sparassis crispa*, кофейная кислота – *Flammulina velutipes*, *Phellinus linteus*, *S. crispa*, галловая кислота – *Agaricus bisporus*, *A. blazei*, *F. velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edoles*, *P. linteus*, *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus*, *S. crispa*, 5-кофеилхинная кислота – *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *S. crispa*, (+)-катехин – *A. blazei*, *G. lucidum*, *L. edoles*, кверцетин – *A. blazei*, *F. velutipes*, *G. lucidum*, (*S. crispa*, кемпферол – *Inonotus obliquus*, *G. lucidum*, *S. crispa* [21].

Для всех выделенных соединений характерна антиоксидантная активность разной степени выраженности (табл. 2). Наиболее активным радикалсвязывающим действием обладала галловая кислота (ЛФ-3/6; IC<sub>50</sub> = 0.98 мкг/мл), а наиболее эффектив-



**Рис. 1.** Графики корреляционных зависимостей антиоксидантная активность (IC<sub>50</sub>, мкг/мл)–содержание фенольных соединений (мг/г): 1 – общее содержание фенольных соединений ( $y = -0.129x + 111.910$ ), 2 – общее содержание флавоноидов ( $y = -0.068x + 60.837$ ).



**Рис. 2.** Денситограммы фракции ЛФ-3 после обработки Прочным синим Б солью (а) и ДФПГ (б): 1 – хлорогеновая кислота, 2 – (+)-катехин, 3 – кемпферол, 4 – галловая кислота, 5 – кверцетин, 6 – кофейная кислота, 7 – п-кумаровая кислота.

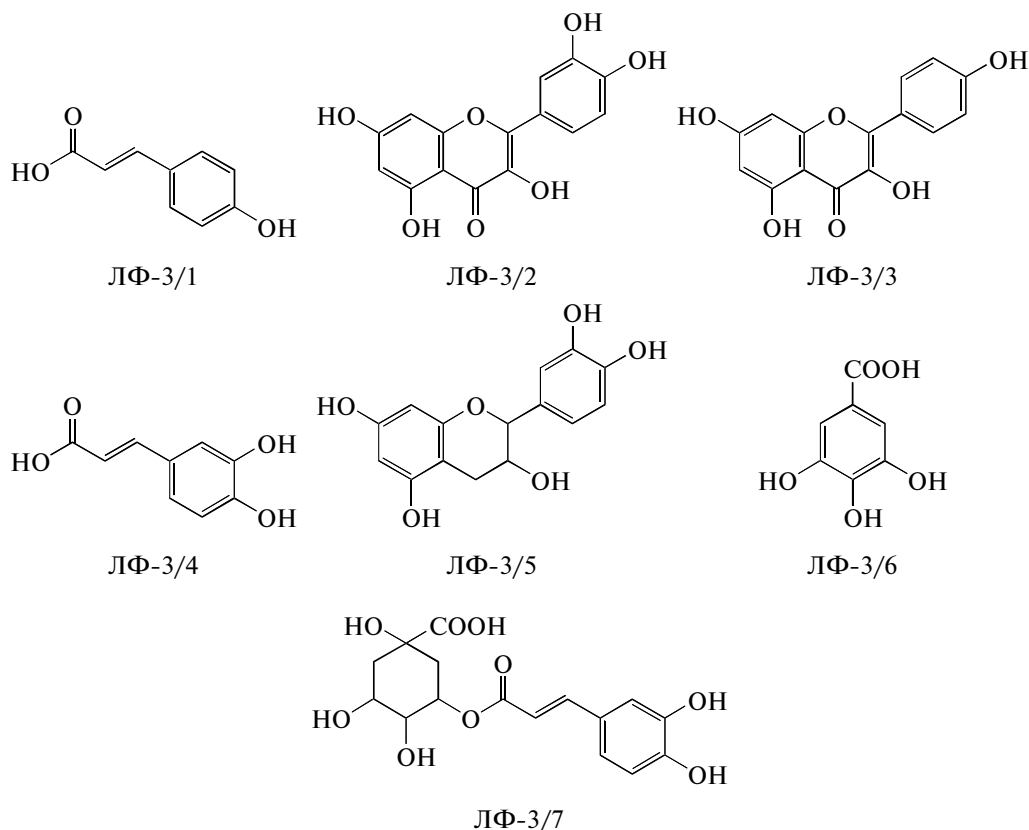


Рис. 3. Структурные формулы выделенных соединений.

ным протектором  $\beta$ -каротина при его пероксидной деструкции был кверцетин (ЛФ-3/2;  $IC_{50} = 6.02$  мкг/мл).

Количественный анализ выделенных соединений проводили с применением метода ВЭЖХ (рис. 4). Установлено, что содержание кверцетина, кемпферола, (+)-катехина, галловой, хлорогеновой, кофейной и п-кумаровой кислот во фракции ЛФ-3 составляет  $11.37 \pm 0.27$ ,  $5.01 \pm 0.12$ ,  $14.04 \pm 0.38$ ,  $28.57 \pm 0.68$ ,  $22.61 \pm 0.54$ ,  $20.07 \pm 0.52$  и  $18.84 \pm 0.47$  мг/г соответственно; содержание указанных соединений в

плодовых телах *L. sulphureus* (образец № Л-1Х) –  $1.12 \pm 0.03$ ,  $0.87 \pm 0.02$ ,  $4.7 \pm 14$ ,  $15.97 \pm 0.45$ ,  $9.73 \pm 0.26$ ,  $8.43 \pm 0.21$  и  $8.02 \pm 0.20$  мкг/г соответственно. Общее содержание идентифицированных соединений во фракции ЛФ-3 и плодовых телах *L. sulphureus* –  $120.51$  мг/г и  $48.85$  мкг/г соответственно.

Исследование химического состава и антиоксидантной активности спиртовых (70%-ный этанол) вытяжек из плодовых тел *L. sulphureus*, полученных с применением метода природных плантаций в

Таблица 2. Антиоксидантная активность фенольных соединений, выделенных из *L. sulphureus*

Соединение	ДФПГ, $IC_{50}$ , мкг/мл	ПДБК, $IC_{50}$ , мкг/мл
n-Кумаровая кислота (ЛФ-3/1)	$9.07 \pm 0.27$	$30.75 \pm 0.92$
Кверцетин (ЛФ-3/2)	$9.95 \pm 0.20$	$6.02 \pm 0.18$
Кемпферол (ЛФ-3/3)	$24.88 \pm 0.75$	$15.23 \pm 0.46$
Кофейная кислота (ЛФ-3/4)	$11.63 \pm 0.34$	$42.89 \pm 1.29$
(+)-Катехин (ЛФ-3/5)	$14.64 \pm 0.42$	$133.68 \pm 4.01$
Галловая кислота (ЛФ-3/6)	$0.98 \pm 0.03$	$12.30 \pm 0.37$
5-Кофеилхинная кислота (ЛФ-3/7)	$22.16 \pm 0.61$	$50.12 \pm 1.51$



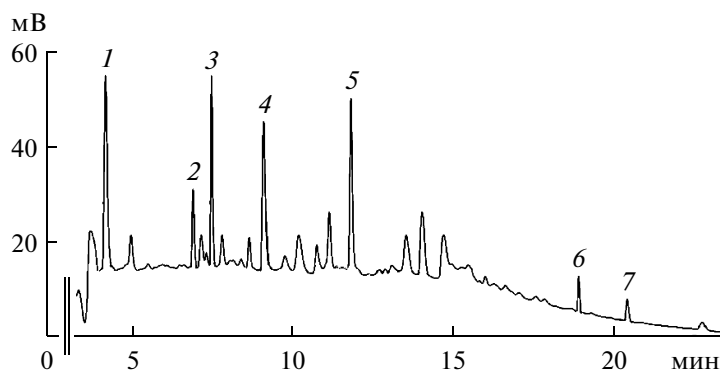


Рис. 4. Хроматограмма (ВЭЖХ) фракции ЛФ-3. Идентифицированные соединения: 1 – галловая кислота, 2 – (+)-катехин, 3 – хлорогеновая кислота, 4 – кофейная кислота, 5 – п-кумаровая кислота, 6 – кверцетин, 7 – кемпферол.

3 районах Иркутской области показало, что общее содержание фенольных соединений в сырье составило 1.44–5.34 мг/г, а общее содержание флавоноидов – 1.01–4.12 мкг/г (табл. 3).

Показатели общей антиоксидантной емкости – 105.41–354.73 мг/г, антирадикальной активности – 98.16–904.04 мкг/мл и восстановительной способности – 8.14–377.04 мМ Fe<sup>2+</sup>/г. Спиртовые вытяжки *L. sulphureus* оказывали выраженное защитное действие на модели пероксидной деструкции β-каротина: значения IC<sub>50</sub> находятся в диапазоне 71.14–167.28 мкг/мл. Применение корреляционного анализа показало, что для всех исследованных пар антиоксидантная активность–химический состав наблюдается удовлетворительная линейная зависимость со значениями коэффициента корреляции >0.6 (табл. 4).

Наличие фенольных соединений оказывало наибольшее влияние на показатели общего антиоксидантного потенциала и восстановительной способности.

Максимальные показатели содержания и активности характерны для плодовых тел *L. sulphureus*, собранных с плантаций Усть-Кутского района (сырье № Л-VIII, Л-IX, Л-X, табл. 3). Учитывая сведения о климатических условиях данного района, относящегося к среднетаежным ландшафтам, можно предположить, что определяющим фактором на характер накопления соединений оказывает температурный режим. Благодаря высокой теплообеспеченности в дневное время в данной местности образуется температурный оптимум для развития и плодоношения *L. sulphureus*. В то же время низкие ночные температуры, являющиеся неблагоприятными для гриба-термофила, приводят к накоплению компонентов

Таблица 3. Химический состав и антиоксидантная активность этанольных вытяжек *L. sulphureus*

Сырье*	ОФС, мг/г	ОФЛ, мкг/г	ОАП, мг/г	ДФПГ, IC <sub>50</sub> , мкг/мл	ВС, мМ Fe <sup>2+</sup> /г	ПДБК, IC <sub>50</sub> , мкг/мл
Л-1	1.94	1.26	111.32	365.32	10.84	153.88
Л-II	1.44	1.01	105.41	904.04	8.14	167.28
Л-III	1.89	1.21	118.69	403.49	20.60	142.98
Л-IV	2.10	2.66	210.00	708.44	136.12	117.50
Л-V	2.08	1.29	126.20	424.87	23.32	162.88
Л-VI	2.94	1.63	222.55	222.73	248.68	79.67
Л-VII	3.74	2.77	254.11	174.33	264.11	71.14
Л-VIII	5.34	4.12	354.73	98.16	377.04	50.12
Л-IX	4.87	3.47	304.57	104.75	322.47	58.14
Л-X	4.52	3.31	271.67	120.72	297.48	69.35

\* Дата и место сбора плодовых тел: с. Быстрая, Слюдянский район – Л-1 (20.VIII.2005), Л-II (18.VIII.2006), Л-III (21.VIII.2007); пос. Большое Голоустное, Иркутский район – Л-IV (19.VIII.2005), Л-V (18.VIII.2006), Л-VI (25.VIII.2007), Л-VII (20.VIII.2008); г. Усть-Кут, Усть-Кутский район – Л-VIII (19.VIII.2005), Л-IX (20.VIII.2006), Л-X (21.VIII.2007).

**Таблица 4.** Уравнения регрессии и коэффициенты корреляции ( $r$ ) зависимости антиоксидантной активности (ОАП, ДФПГ, ВС, ПДБК) от химического состава (ОФС, ОФЛ)

Показатель	ОАП	ДФПГ	ВС	ПДБК
ОФС	$y = 59.82x + 23.31$ $r = 0.9526$	$y = -156.68x + 836.20$ $r = 0.8184$	$y = 97.77x - 130.84$ $r = 0.9474$	$y = -30.29x + 200.75$ $r = 0.9270$
ОФЛ	$y = 75.98x + 35.21$ $r = 0.9595$	$y = 149.29x + 692.02$ $r = 0.6183$	$y = 117.83x - 96.95$ $r = 0.9053$	$y = 36.30x + 186.81$ $r = 0.8811$

фенольной природы, наличие которых оказывает первостепенное значение на проявление антиоксидантной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 08-04-98045).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wasser S.P., Weis A.L. // Int. J. Med. Mushrooms. 1999. V. 1. № 1. P. 31–62.
2. Zjawiony J.K. // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. № 2. P. 300–310.
3. Raduc N., Injac R., Strukelj B. // Int. J. Med. Mushrooms. 2009. V. 11. № 2. P. 103–116.
4. Kang Ch.Y., Lee Ch.O., Chung K.S., Choi E., Kim B.K. // Arch. Pharm. Res. 1982. V. 5. № 2. P. 39–43.
5. Kanska G., Guillot J., Dusser M., Damez M., Botton B. // J. Biochem. 1994. V. 116. № 3. P. 519–523.
6. Okamura T., Takeno T., Fukuda Sh., Mohri A., Noda A., Iemoto A., Horie N., Ohsugi M. // Bull. Mukogawa Women's Univ. Nat. Sci. 2000. V. 48. № 1. P. 65–68.
7. Okamura T., Takeno T., Dohi M., Yasumasa I., Hayashi T., Toyoda M., Noda K., Fukuda S., Horie N., Ohsugi M. // J. Biosci. Bioeng. 2000. V. 89. № 5. P. 474–478.
8. Leon F., Quintana J., Rivera A., Estevez F., Bermejo J. // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. № 12. P. 2008–2011.
9. Yoshikawa K., Bando S., Arihara S., Matsumura E., Katayama S. // Chem. Pharm. Bull. 2001. V. 49. № 3. P. 327–329.
10. Keller C., Maillard M., Keller J., Hostettmann K. // Pharm. Biol. 2002. V. 40. № 7. P. 518–525.
11. Turkoglu A., Duru E.M., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. // Food Chem. 2007. V. 101. № 2. P. 267–273.
12. Hwang H.S., Lee S.H., Baek Y.M., Kim S.W., Jeong Y.K., Yun J.W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 78. № 3. P. 419–429.
13. Olennikov D.N., Agafonova S.V., Borovskii G.B., Penzina T.A., Rokhin A.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 5. P. 536–543.
14. Vermerris W., Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry. N.Y.: Springer, 2006. P. 151–196.
15. Gálvez M., Martín-Cordero C., Houghton P.J., Ayuso M.J. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 6. P. 1927–1933.
16. Ren D., Zhang Sh. // Food Chem. 2008. V. 106. № 1. P. 410–414.
17. Olennikov D.N., Tankhaeva L.M., Samuelsen A.B. // Chem. Natural Comp. 2006. V. 42. № 3. P. 265–268.
18. Preto P., Pineda M., Aguilar M. // Anal. Biochem. 1999. V. 269. № 2. P. 337–341.
19. Lee Y., Howard L.R., Villalon B. // J. Food Sci. 1995. V. 60. № 3. P. 473–476.
20. Mathew S., Ablaham T.E. // Food. Chem. 2006. V. 94. № 2. P. 520–528.
21. Kim M.-Y., Seguin Ph., Ahn J.-K., Kim J.-J., Chun S.-Ch., Kim E.-H., Seo S.-H., Kang E.-Y., Kim S.-L., Park Y.-J., Ro H.-M., Chung I.-M. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 16. P. 7265–7270.

## Antioxidant Components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. Fruit Bodies

D. N. Olennikov<sup>a</sup>, L. M. Tankhaeva<sup>a</sup>, and S. V. Agafonova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Sakhyanovoi 6, Ulan-Ude, Buryatia Republic, 670047 Russia

e-mail: oldaniil@rambler.ru

<sup>b</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Lermontova 137, Irkutsk, 664033 Russia

Received September 22, 2010

**Abstract**—Antioxidant activity of fruit bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. (Polyporales) obtained by the natural plantation growing method in Pribaikal'e (Irkutsk region) has been studied. It was determined that the ethyl acetate fraction of *L. sulphureus*, which was chromatographically separated into seven compounds identified as quercetin, kaempferol, (+)-catechin, *p*-coumaric, gallic, caffeic, and chlorogenic acids was characterized with more expressed antioxidant activity. All compounds were extracted from this basidiomycete species for the first time. The quantitative amount of the substances isolated from *L. sulphureus* was determined by HPLC. It was found that antioxidant activity of preparations obtained from *L. sulphureus* is conditioned by phenolic compounds.

УДК 582.282.123.2:547

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРИБОВ РОДА *Penicillium* – ПРОДУЦЕНТОВ ЭРГОАЛКАЛОИДОВ И ХИНОЦИТРИНИНОВ

© 2011 г. А. Г. Козловский, В. П. Желифонова, Т. В. Антипова, Н. Ф. Зеленкова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушchino, 142290

e-mail: Kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 05.07.2010 г.

Четыре культуры грибов рода *Penicillium*, относящихся к различным видам подрода *Furcatum* Pitt: *P. citrinum* Thom 1910, *P. corylophilum* Dierckx 1901, *P. fellutanum* Biourge 1923 и *P. waksmanii* Zaleski 1927, продуцировали эргоалкалоиды агроклавин-1, эпоксиагроклавин-1, их N–N-димеры – димер эпоксиагроклавина-1 и смешанный димер эпоксиагроклавина-1 и агроклавина-1, а также хинолиновые метаболиты – хиноцитринины А и Б. Изучена физиолого-биохимическая характеристика продуцентов. Определены оптимальные условия биосинтеза компонентов метаболома. Добавка цинка в среду стимулировала биосинтез эргоалкалоидов во всех случаях, продукция же хиноцитрининов возрастала только у *P. citrinum*, а у *P. corylophilum*, *P. fellutanum* и *P. waksmanii* подавлялась. Это свидетельствует о том, что гены путей биосинтеза этих метаболитов находятся у продуцентов в разных кластерах.

Грибы рода *Penicillium* представляют интерес как источник метаболического разнообразия из-за их хорошо известной способности к синтезу вторичных метаболитов разнообразной структуры, обладающих широким спектром биологической активности, в том числе алкалоидов, антибиотиков, микотоксинов, иммуномодуляторов, иммунодепрессантов. С древних времен широко используются в медицине представители уникального класса соединений, называемого эргоалкалоидами, традиционным продуцентом которого является спорынья – гриб-паразит *Claviceps purpurea* [1]. К паразитирующим на травах относятся также многочисленные продуценты эргоалкалоидов, относящиеся к семейству Clavicipitaceae. К настоящему времени накоплен большой объем экспериментальных данных по продукции эргоалкалоидов пенициллами в сапрофитных условиях, в том числе на средах определенного состава [2]. Среди этих метаболитов эргоалкалоиды – эпоксиагроклавин-1 и агроклавин-1 (ЭА), биосинтез которых был установлен ранее в процессе скрининга продуцентов эргоалкалоидов у *P. corylophilum* ВКМ F-2156 (Д) и *P. fellutanum* ВКМ F-1073 (= *P. sizovae*) [3, 4]. Недавно эти соединения были обнаружены у *P. citrinum* ВКМ FW-800 и *P. waksmanii* ВКМ FW-2875, выделенных из мерзлых древних отложений [5, 6]. Штамм *P. fellutanum* продуцировал также N–N-димеры эргоалкалоидов – димер эпоксиагроклавина-1 (ДЭД) и смешанный димер эпоксиагроклавина-1 и агроклавина-1 (ДЭА) [7, 8]. У штаммов *P. citrinum* и *P. waksmanii* была также обнаружена способность синтезировать хинолиновые алкалоиды хиноцитринины А и Б (ХЦ) [9].

Цель работы – изучение компоненты метаболома грибов *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. fellutanum* и

*P. waksmanii*, идентифицировать биологически активные вещества алкалоидной природы, а также исследовать физиолого-биохимические характеристики их роста и развития в связи с биосинтезом вторичных метаболитов.

### МЕТОДИКА

Использовали культуры из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ РАН – *P. citrinum* Thom 1910 ВКМ FW-800, *P. corylophilum* Dierckx 1901 ВКМ F-2156 (Д), *P. fellutanum* Biourge 1923 ВКМ F-1073 (= *P. sizovae*) и *P. waksmanii* Zaleski 1927 ВКМ FW-2875. Грибы культивировали глубинным способом на контрольной среде следующего состава (г/л): маннит – 50.0, янтарная кислота – 5.4,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.3,  $KH_2PO_4$  – 1.0, pH доводили до 5.4 конц. раствором  $NH_4OH$ . Цинк вносили в контрольную среду в виде соли  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  в концентрации 4.4 мг/л. Грибы выращивали в 150 мл среды в колбах объемом 750 мл при  $24 \pm 1^\circ C$  на качалке (200–220 об/мин). Засев среды осуществляли водной суспензией конидий ( $1-2 \times 10^7$  спор/мл) 14-суточных культур, выращенных на скошенном суслоагаре. Рост культур оценивали по сухой массе мицелия ежедневно.

Извлечение метаболитов из фильтрата культуральной жидкости, их выделение, очистку и идентификацию проводили по методикам, разработанным ранее [10]. Анализ экстрактов осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках силикагеля (Silica gel 60 F254, “Merck”, Германия) в системах: хлороформ–метанол–25%-ный  $NH_4OH$  90 : 10 : 0.1 (I) и 80 : 20 : 0.2 (II). ЭА обнаружи-

вали по поглощению в УФ-свете и после опрыскивания пластин реактивом Эрлиха. Для детекции N-N-димеров эргоалкалоидов использовали их свечение в УФ-свете при 366 нм и окрашивание после обработки реактивом Драгендорфа. Этот реактив применяли также для визуализации ХЦ. Количественный анализ суммарной смеси эргоалкалоидов (СЭА) и ХЦ проводили по методике [10]. Для количественного определения димеров использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого давления (ВЭЖХ). Работу выполняли на хроматографе с УФ-детектором переменной длины волны и системой обсчета хроматограмм фирмы "LKB-Prilbori A" (Швеция). Рабочая длина волны 280 нм, расход подвижной фазы 0.9 мл/мин, объем пробы 20 мкл. Подвижная фаза состояла из метанола, воды и 25%-ного водного раствора аммиака в соотношении 78 : 22 : 0.0036 (об. %), температура анализа 30°C. Разделение выполняли на колонке, заполненной обращенно-фазовым сорбентом Nova-Pak C 18, 150 × 3.9 мм, ("Waters", США). Общая продолжительность анализа составляла 20 мин. Времена удерживания ДЭЭ и ДЭА составляли 6.20 и 16.04 мин соответственно. Идентификацию соединений проводили, сопоставляя параметры удерживания стандартов и анализируемых соединений. Количественное определение выполняли методом абсолютной градуировки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Идентификация метаболитов.** В "кислых" экстрактах культуральной жидкости *P. corylophilum* и *P. fellutanum* методом ТСХ на пластинах силикагеля были обнаружены два метаболита с  $R_f$  0.14 и 0.12 (I); 0.67 и 0.62 (II), дающие ярко оранжевую окраску с реактивом Драгендорфа (азотсодержащие соединения), но реактив Эрлиха — реagent на индольные соединения, давал отрицательный результат. Оба метаболита имели одинаковую хроматографическую подвижность в системах растворителей (I) и (II) со стандартными образцами хинолиновых алкалоидов — ХЦ А и Б соответственно. УФ-спектры образцов метаболитов были идентичны и совпадали со спектрами ХЦ ( $\lambda_{\text{макс}}$ , метанол: 216, 248, 256, 300, 314, 328 нм) [9]. На основании этих данных нами был сделан вывод о том, что соединения, выделенные из "кислых" экстрактов *P. corylophilum* и *P. fellutanum* являются хинолиновыми алкалоидами — ХЦ А и Б.

На хроматограммах "щелочных" экстрактов культуральной жидкости штаммов *P. citrinum*, *P. corylophilum* и *P. waksmanii* помимо основных метаболитов ЭА было обнаружено вещество с  $R_f$  0.35 (I) и 0.75 (II), дающее положительную реакцию с реактивом Драгендорфа, но не окрашиваемые с реактивом Эрлиха. У штаммов *P. citrinum*, *P. corylophilum* был также обнаружен второй метаболит с аналогичными характеристиками, но отличающийся по хроматографической подвижности с  $R_f$  0.30 (I) и 0.74 (II). Выделенные соединения флуоресцировали под УФ-све-

том при 366 нм. УФ-спектры метаболитов были практически идентичны и содержали полосы поглощения, соответствующие замещенному индольному хромофору при 271, 284 и 292 нм, причем максимально интенсивное поглощение наблюдалось при 271 нм, что характерно для N-N-димеров эргоалкалоидов, таких, как ДЭЭ и смешанный ДЭА [7, 8]. Данные ВЭЖХ по хроматографической подвижности и параметрам удерживания исследованных метаболитов и стандартных образцов ДЭЭ и ДЭА также свидетельствовали об их идентичности. Времена удерживания для первого метаболита и для ДЭЭ равны 6.20 мин. Форма размывания пика второго метаболита и время удерживания (16.04 мин) совпали с соответствующими характеристиками для стандартного образца ДЭА. На основании приведенных выше данных, в том числе и по отсутствию реакции с реактивом Эрлиха, специфической для N-N-димеров эргоалкалоидов, можно сделать вывод, что выделенные метаболиты представляют собой соответствующие N-N-димеры эргоалкалоидов — ДЭЭ и ДЭА, ранее обнаруженные у *P. fellutanum* ВКМ F-1073 [7, 8].

**Физиолого-биохимические характеристики продуцентов.** Культуры, синтезирующие эргоалкалоиды и ХЦ, были выделены в разных географических регионах из почвенных образцов различного геологического возраста. Представителями современной микробиоты являются *P. corylophilum* и *P. fellutanum* [3, 4], а древней, датируемой 100–200 тыс. лет и 1.8–3 млн. лет, *P. waksmanii* и *P. citrinum* соответственно [5, 6]. Логично предположить, что функционирование путей биосинтеза этих вторичных метаболитов обеспечило выживание культур в условиях изменения местообитаний под влиянием внешних факторов в течение значительного времени даже в масштабах эволюции. Гены или кластеры генов путей биосинтеза не перешли в разряд "спящих" или "молчащих", а экспрессируются в довольно широком интервале условий культивирования [11]. Это фактически означает, что ферменты, осуществляющие реакции биосинтеза этих компонентов метаболома, являются конститутивными.

Изученные культуры-продуценты отличались по интенсивности продукции алкалоидов. Наибольшие показатели биосинтеза СЭА и ХЦ в контрольной среде наблюдались у *P. waksmanii*, а у других были значительно ниже (табл. 1). Низкое накопление биомассы (4–8 г/л) и раннее конидиообразование при росте культур на контрольной среде, содержащей большое количество источников углерода, азота и макроэлементов, свидетельствует о недостатке в среде других компонентов, например микроэлементов. Ранее было показано, что только внесение в среду культивирования цинка приводило к стимулированию биосинтеза алкалоидов *P. citrinum* [9]. Внесение этого микроэлемента в среду культивирования для других продуцентов приводило к усилению ростовых процессов и биосинтеза эргоалкалоидов этими культурами (табл. 1). При этом у исследу-

**Таблица 1.** Влияние ионов цинка на максимальные показатели роста и биосинтеза алкалоидов изученными продуцентами

Продуцент	Наличие цинка	Биомасса, г/л	СЭА, мг/л	$Y_{\text{СЭА/Х}}$ , мг/г	ХЦ, мг/л	$Y_{\text{ХЦ/Х}}$ , мг/г
<i>P. corylophilum</i>	Контроль (без $\text{Zn}^{2+}$ )	8.2	9	1.1	1.0	0.12
	Опыт ( $\text{Zn}^{2+}$ )	18.4	54	2.9	1.0	0.05
<i>P. citrinum</i>	Контроль	4.1	4	1.0	2.4	0.59
	Опыт	10.4	140	6.7	7.8	0.75
<i>P. fellutanum</i>	Контроль	7.0	9	1.3	1.0	0.14
	Опыт	15.7	93	5.9	0.9	0.06
<i>P. waksmanii</i>	Контроль	7.1	27	3.8	9.6	1.35
	Опыт	15.9	52	3.3	5.6	0.35

емых штаммов прирост биомассы был практически одинаков, а продукция СЭА различалась. Увеличение их синтеза происходило за счет более активного биосинтеза этих алкалоидов мицелием грибов, поскольку выходы СЭА в расчете на единицу биомассы ( $Y_{\text{СЭА/Х}}$ ) по сравнению с контрольной средой выросли в 2–13 раза. Возможно, как в случае других индолсодержащих алкалоидов, стимулирующий эффект ионов цинка на биосинтез эргоалкалоидов связан с активированием триптофансинтетазы [12].

У разных продуцентов влияние добавок цинка на биосинтез ХЦ продуцентами существенно различалось. Внесение цинка в среду культивирования *P. citrinum* приводило к увеличению накопления ХЦ в 3.3 раза, в основном, за счет усиления ростовых процессов, так как выход ХЦ в расчете на единицу биомассы ( $Y_{\text{ХЦ/Х}}$ ) по сравнению с контрольной средой оставался примерно на том же уровне. У *P. waksmanii* наблюдалось снижение продукции ХЦ в 1.7 раза по сравнению с контрольной средой, а у *P. corylophilum* и *P. fellutanum* ионы цинка не оказали влияния на биосинтез этих алкалоидов (табл. 1). Дальнейшие сравнительные исследования культур продуцентов проводили на среде с добавками цинка.

Динамика роста культур (рисунок) характеризовалась диауксией, что обусловлено наличием в среде двух источников углерода. У *P. citrinum* и *P. waksmanii* на протяжении культивирования наблюдался мицелиальный рост без дифференцировки, а у *P. corylophilum* и *P. fellutanum* конидиообразование начиналось с 4 сут культивирования.

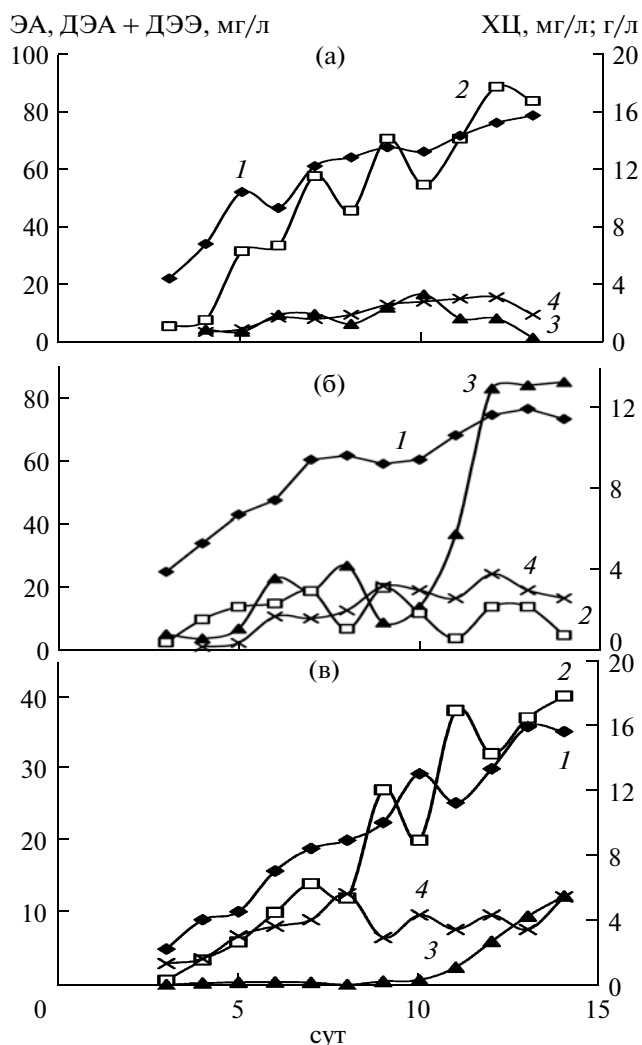
Процесс биосинтеза алкалоидов у изученных культур проходил параллельно росту и имел циклический характер. Наблюдалось падение концентрации ЭА, их димеров и ХЦ и снижение удельной скорости их накопления в культуральной жидкости.

Причем у *P. citrinum* [10] и *P. waksmanii* падение концентрации алкалоидов происходило во вторую лаг-фазу и в начале стационарной фазы роста (10–11 сут), а у *P. corylophilum* и *P. fellutanum* снижение концентрации алкалоидов не так четко соотносилось с ростовыми фазами продуцентов, но происходило также в начале стационарной фазы (8–9 сут). У всех продуцентов максимальная концентрация алкалоидов наблюдалась в стационарной фазе.

К индивидуальным особенностям метаболизма продуцентов можно отнести также и состав эргоалкалоидов. Изучение этого состава у продуцентов показало различия как в соотношении ЭА и их димеров, так и в составе димеров (табл. 2). У *P. citrinum*, *P. corylophilum* и *P. waksmanii* ЭА преобладали и составляли 100, 86 и 77% от общего количества эргоалкалоидов соответственно, а у *P. fellutanum* 86% занимал ДЭЭ. Состав димеров также зависел от продуцента: *P. citrinum*, *P. corylophilum* и *P. fellutanum* синтезировали ДЭЭ и ДЭА, а *P. waksmanii* только ДЭЭ. Причем у *P. corylophilum* в смеси продуцируемых димеров преобладал ДЭА и его содержание составило 62% от их суммарного количества.

**Таблица 2.** Состав и максимальное содержание (мг/л) эргоалкалоидов у изученных продуцентов

Продуцент	СЭА	ЭА	ДЭЭ	ДЭА
<i>P. corylophilum</i>	88	71	6.5	10.50
<i>P. citrinum</i>	140	140	0.3	0.05
<i>P. fellutanum</i>	98	14	84.0	0.05
<i>P. waksmanii</i>	52	40	12.0	не обнаружен



Динамика роста и биосинтеза алкалоидов при глубинном культивировании *P. corylophilum* (а), *P. fellutanum* (б) *P. waksmanii* (в): 1 – биомасса, г/л; 2 – ЭА, мг/л; 3 – ДЭА + ДЭЭ, мг/л; 4 – ХЦ, мг/л.

Таким образом, нами проведено сравнительное изучение четырех культур–продуцентов вторичных метаболитов, синтезирующих одновременно ЭА (эпоксиагротоклавин-1 и агротоклавин-1), их N-N-димеры, а также хинолиновые алкалоиды (хиноцитринин А и хиноцитринин Б) – *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, *P. citrinum* и *P. waksmanii*. Метаболическая взаимосвязь путей биосинтеза клавиновых и хинолиновых алкалоидов следует из того, что обе ветви биосинтеза соединений эрголиновой и хинолиновой природы биогенетически связаны шикиматным путем образования их предшественников – триптофана и антраниловой кислоты. Необходимо отметить, что механизмы регуляции синтеза этих аминокислот и их взаимопревращений хорошо известны. Ранее на примере культуры *P. citrinum* нами было однозначно показано, что процессы биосинтеза и экскреции, а

также поглощения как ЭА, так и ХЦ клетками продуцента отражают способы регуляции баланса внутриклеточного триптофана [13].

В последние годы было показано, что гены вторичного метаболизма у грибов находятся в виде кластеров, контролируя синтез ферментов, осуществляющих реакции определенных стадий биосинтеза компонентов метаболома. Это было доказано на культурах, синтезирующих разнообразные по структуре вторичные метаболиты, такие, как антибиотики (пенициллин) [14], алкалоиды (эргоалкалоиды) [15] и микотоксины (паксиллин) [16]. Резонно предположить, что у исследованных нами культур также имеются кластеры генов синтеза эргоалкалоидов – ЭАС-кластер, отвечающий за синтез эргоалкалоидов и ХА – кластер, контролирующий путь синтеза хинолиновых алкалоидов. Имеющиеся немногочисленные данные показывают, что регуляция экспрессии генов метаболических путей находится под влиянием локализации генов в генных кластерах, например пенициллина [14]. Аналогично можно объяснить имеющиеся различия в физиолого-биохимических особенностях изученных штаммов специфичностью организации генов в виде кластеров.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tudzynski P., Correia T., Keller U.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. № 5–6. P. 593–605.
2. *Kozlovsky A.G.* // Medicinal and Aromatic Plant – Industrial Profiles. Ergot, the Genus *Claviceps* / Eds. V. Kren, L. Cvak. Chur. Harwood Acad., 1999. P. 479–499.
3. *Козловский А.Г., Соловьева Т.Ф., Сахаровский И.Г., Аданин М.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 4. С. 535–541.
4. *Козловский А.Г., Веприцкая И.Ю., Гаязова Н.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1986. Т. 12. № 2. С. 205–209.
5. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М., Антипова Т.В., Озерская С.М., Кочкина Г.А., Грефе У.* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 816–821.
6. *Антипова Т.Е., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Козловский А.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 318–323.
7. *Зеленкова Н.Ф., Веприцкая И.Г., Аданин В.М., Сахаровский В.Г., Нефедова М.Ю., Козловский А.Г.* // Докл. АН СССР. 1990. Т. 313. № 6. С. 1494–1496.
8. *Козловский А.Г., Зеленкова Н.Ф., Аданин В.М., Сахаровский В.Г., Аринбасаров М.У.* // Прикл. биохим. и микробиология. 1995. Т. 31. № 5. С. 540–544.
9. *Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Adanin V.M., Ozerskaya S.M., Kochkina G.A., Schlegel B., Dajhse H.M., Gollmick F.A., Grafe U.* // 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., Зеленкова Н.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 572–576.
12. Ловкова М.Я., Бузук Г.Н., Пономарева С.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т. 31. № 1. С. 80–86.
13. Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Лысанская В.Я. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 334–341.
14. Brakhage A.A., Broun P., Turner G. // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 242. № 1. P. 57–64.
15. Lorenz N., Wilson E.V., Machado G., Shardl C.L., Tudzynski P. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 22. P. 7185–7191.
16. Young C., McMillan L., Telfer E., Scott B. // Mol. Microbiol. 2001. V. 39. № 3. P. 754–764.

## Physiological and Biochemical Characteristics of Fungi of the Genus *Penicillium* as Producers of Ergot Alkaloids and Quinocitrinins

A. G. Kozlovskii, V. P. Zhelifonova, T. V. Antipova, and N. F. Zelenkova

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia  
e-mail: kozlovski@ipbm.pushchino.ru

Received July 5, 2010

**Abstract**—Four cultures of fungi of the genus *Penicillium* belonging to *Furcatum* Pitt subgenus, such as *P. citrinum* Thom, 1910; *P. corylophilum* Dierckx, 1901; *P. fellutanum* Biourge, 1923; and *P. waksmanii* Zaleski, 1927, produced the ergot alkaloids, namely, agroclavine-I, and epoxyagroclavine-I; their N–N-dimers, such as dimer of epoxyagroclavine-I and the mixed dimer of epoxyagroclavine-I and agroclavine-I; and also quinoline metabolites, namely, quinocitrinin A and quinocitrinin B. Physiological and biochemical characteristics of the producers were studied. Optimal conditions for the biosynthesis of metabolome components were determined. Zinc additive to the medium stimulated the biosynthesis of the ergot alkaloids in all cases; citrinin production was increased only in *P. citrinum*, and that was suppressed in *P. corylophilum*, *P. fellutanum*, and *P. waksmanii*. This testifies that genes of the biosynthesis pathways are located in the different clusters of the producers.

УДК 577.123:612.014.43

## ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ *Polyscias filicifolia* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ТЕМПЕРАТУР

© 2011 г. Н. В. Кириллова, Ю. В. Белых, А. И. Спасенков

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, 197376

e-mail: biochem@spsca.ru

Поступила в редакцию 20.07.2010 г.

В клетках культуры ткани *Polyscias filicifolia*, выращенных на модифицированной среде Мурасиге–Скуга, в присутствии салициловой кислоты возрастало содержание как ДНК, так и РНК (от 20 до 50%). Обработка культуры ткани салициловой кислотой приводила к достоверному повышению содержания внутриклеточного белка и снижению общей протеолитической активности. В обработанных салициловой кислотой клетках содержание ДНК и РНК было выше как в условиях теплового (3 ч, 45°C), так и холодного (24 ч, 7°C) стресса по сравнению с клетками, подвергнутыми воздействию неблагоприятных температур без предварительной обработки салициловой кислотой.

Известно, что растения более зависимы от климатических условий по сравнению с животными, поэтому ответные реакции растительных клеток на температурный стресс занимают особое место среди механизмов адаптации растений к неблагоприятным условиям их среды обитания. В ответ на воздействие неблагоприятных температур, как правило, происходит общее снижение метаболической и функциональной активности клеток растений [1, 2]. В то же время установлено, что предобработка растительных тканей салициловой кислотой (СК) нивелирует неблагоприятные для жизни растения последствия воздействий как биотических, так и абиотических факторов. Показано, что СК участвует в сложных взаимодействиях сигнальных систем, индуцирующих развитие адаптации растительных клеток к неблагоприятным условиям среды, и, тем самым, способствует их выживанию [2–4]. Однако проявление защитных функций СК зависит от многих факторов, в том числе ответная реакция на воздействие СК может различаться у различных растений, а иногда переходить в свою противоположность – индукцию восприимчивости болезни [3–7]. Поэтому роль СК в патогенезе растений и при стрессе в настоящее время представляется достаточно сложной и противоречивой.

В настоящее время культивируемые растительные ткани широко используются в качестве адекватной модели для изучения на клеточном уровне адаптации растений к различным неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Преимущество культивируемых растительных тканей заключается в том, что они выращиваются в строго контролируемых условиях и существуют в автономном режиме, в отсутствие характерных для интактного растения метаболических связей, а также фитогормональной регуляции, поэтому интерпретация от-

ветных реакций растительных клеток на строго определенные воздействия конкретного фактора окружающей среды может быть более однозначной. В связи с этим применение культур тканей растений позволяет изучить метаболические процессы, протекающих в клетке, с целью их практического применения. [8].

Культуры растительных клеток являются объектом биотехнологии для получения целевых продуктов [9], в частности, штамм тропического растения *Polyscias filicifolia* был введен в культуру изолированных тканей *in vitro* как обладающий высокой биологической активностью [10]. Дальнейшие исследования показали, что фармакологические препараты, полученные из биомассы данной культуры ткани, обладали адаптогенной, иммуномодулирующей, тонизирующей и стресспротекторной активностями [11].

Цель работы – изучение влияния СК на содержание ДНК и РНК в клетках культуры ткани *Polyscias filicifolia*, выращенных в стандартных условиях, а также сочетанное воздействие СК и высоко- или низкотемпературных шоков.

### МЕТОДИКА

Объектом изучения служила культура ткани растения полисциас папоротниковолистный *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey (сем. Araliaceae) в процессе ее длительного культивирования на модифицированной агаризованной среде Мурасиге и Скуга [12, 13] в темноте при  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , относительной влажности воздуха 70%, с циклом культивирования 30–35 сут (один пассаж). После этого разрыхленную культуру ткани весом около 5 г пересаживали на свежую питательную среду объемом 70 мл. В работе ис-



пользовали культуру ткани 20-суточного возраста, отобранную из 5–7 сосудов одного пассажа, повторности опытов – 5–6 пассажей. Навески ткани гомогенизировали в ступке на холоду с 0.05 М фосфатным буфером (рН 7.8) в соотношении 0.5 мл буфера/г сырой массы в присутствии 0.05 мл 3%-ного тритона X-100. Полученный гомогенат оставляли в течение 30 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 12000 g. Осадок отбрасывали, а в супернатанте определяли белок по методу Лоури. Оценку общей протеиназной активности проводили по приросту свободных аминокислот после предварительного осаждения белков из проб трихлоруксусной кислотой [14].

Холодовой и тепловой стрессы моделировали следующим образом: культуру ткани полисиас 20-суточного возраста подвергали высоко- (3 ч при 45°C) и низкотемпературной (24 ч при 7°C) обработке, что составляло  $\pm 19^\circ\text{C}$  по сравнению со стандартной температурой культивирования. Выбранные температурные режимы широко используются при изучении влияния температурных стрессов на растительные ткани [15–17].

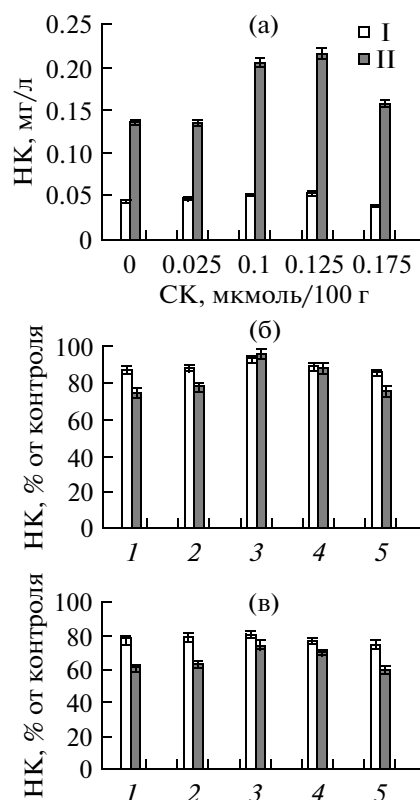
Спектрофотометрическое количественное определение РНК и ДНК проводили по методикам, описанным ранее [18]. Непременным условием использованных методик является удаление пигментов, а также кислоторастворимого и липидного фосфора.

Стерильные исходные 0.05 мМ растворы СК вносили в асептических условиях в каллусы 20-суточного возраста. Через 24 ч после выдерживания культуры в стандартных условиях выращивания оценивали уровень содержания нуклеиновых кислот и белка в растительных клетках по сравнению с контрольными образцами. Во второй серии опытов культивируемые клетки после их предобработки СК подвергали температурному стрессу, как описано выше, и также рассчитывали содержание нуклеиновых кислот и внутриклеточного белка. В клетках культуры ткани, выращенной в стандартных условиях, содержание нуклеиновых кислот принимали за 100%.

Представленные в данной работе данные обрабатывали статистически. Результаты выражали в средних значениях со стандартным отклонением (SD). Для оценки различий между экспериментальными данными использовали критерий – непарный *t*-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне вероятности  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

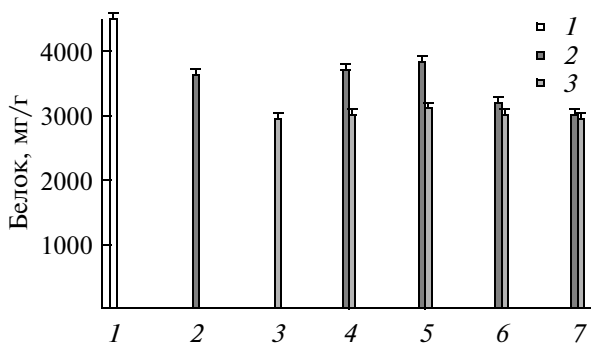
Данные о содержании ДНК и суммарного пула РНК в клетках культуры ткани полисиас, выращенных в стандартных условиях и в присутствии экзогенной СК, приведены на рис. 1а. В работе использовали СК в низких концентрациях, которые, как правило, применяются при изучении регулятор-



**Рис. 1.** Влияние СК на содержание ДНК (I) и РНК (II) в контроле (а), при высокой (б) и низкой (в) температурах. Воздействие неблагоприятных температур (I), совместное влияние температуры и СК в концентрациях 0.025 (2), 0.1 (3), 0.125 (4) и 0.175 (5) мкмоль/100 г сырой биомассы.

ной функции экзогенного салицилата в растительных объектах ( $10^{-7}$ – $10^{-9}$  М) [19–21]. Как видно из представленных данных, в культивируемых клетках культуры полисиас, выращенных в среде в присутствии СК, достоверно повышалось содержание ДНК и РНК по сравнению с контролем.

Наименьший эффект на содержание нуклеиновых кислот СК оказывала в концентрации 0.175 мкмоль/100 г культивируемых клеток. Воздействие СК на растительные ткани, по мнению ряда авторов [4, 6, 22, 23], обусловлено, прежде всего, ее индукцией на гены транскрипционных факторов, отвечающих за экспрессию соответствующих генов совместно с NO, липоксигеназной и другими сигнальными системами растительных клеток. Подтверждением этого являются исследования, в которых достоверно установлено повышение содержания ряда мРНК в присутствии экзогенной СК в клетках растений. Данные мРНК, как было установлено, кодировали соответствующие транскрипционные факторы и некоторые другие белки, отвечающие в растениях за процессы адаптации к неблагоприятным условиям среды [2, 4, 22–25].



**Рис. 2.** Влияние СК на содержание белка в условиях температурного стресса; контроль (1), тепловой (2) и холодной (3) стрессы, совместное влияние неблагоприятных температур и СК в концентрациях 0.025 (4), 0.1 (5), 0.125 (6) и 0.175 (7) мкмоль/100 г сырой биомассы.

Известно, что по содержанию ДНК в клетке можно косвенно судить о митотической активности культивируемых клеток. Ранее нами было установлено, что воздействие высоких и низких положительных температур на пролиферативную активность культуры ткани полисиас сопровождается достоверным уменьшением в клетках содержания ДНК и РНК [26]. Анализ полученных в данной работе результатов показал, что содержание ДНК и суммарного пула РНК в клетках полисиас после совместного воздействия неблагоприятных температур и СК было ниже контрольных значений, однако эти показатели были выше, чем в культивируемых растительных клетках, предварительно необработанных СК. Результаты проиллюстрированы на рис. 1б, 1в. Как видно из представленных данных, наиболее выраженный эффект на пролиферативную активность в условиях теплового шока и воздействия низких положительных температур оказывали концентрации СК в 0.1 мкмоль/100 г сырой биомассы. Несмотря на то, что в преобработанных СК клетках содержание ДНК было на 9–10% ниже контрольных значений, однако этот показатель был на 5–6% выше по сравнению с содержанием ДНК в необработанных СК клетках. Более низкие концентрации экзогенной СК (0.025 мкмоль/100 г сырой биомассы) практически не вызывали существенных изменений в содержании нуклеиновых кислот в стрессовых условиях по сравнению с клетками, необработанными СК. Повышение концентрации СК в среде культивирования до 0.175 мкмоль/100 г сырой биомассы приводило к снижению содержания нуклеиновых кислот в калусной ткани полисиас. При этом воздействие неблагоприятных температур вызывало снижение содержания нуклеиновых кислот не только по сравнению с контролем, но и на 2–3% по сравнению с клетками, необработанными СК.

Данные о влиянии СК на содержание нуклеиновых кислот, как было установлено нами ранее [27],

коррелировали с результатами, характеризующими концентрацию общего белка в культивируемых клетках полисиас в ее присутствии. В частности, было показано, что внесение в среду культивирования СК (до 0.1 мкмоль/100 г сырой биомассы) сопровождалось достоверным повышением содержания белка в растительных клетках. В работах других авторов с использованием растительных объектов также были получены сопоставимые с нашими результаты о влиянии СК на содержание белка в клетках [28, 29]. В частности, было установлено повышение его содержания в ткани клубней картофеля на 55% по отношению к контролю уже через 5 ч после обработки дисков композицией, содержащей СК [30]. Однако в ряде работ было выявлено снижение содержания белков в растительных клетках при действии СК [21, 30]. В связи с неоднозначным влиянием СК на различные растительные объекты к настоящему времени у исследователей нет единого мнения об универсальности действия СК, более того, полагают, что характер ее воздействия у разных растений при стрессе может сильно различаться [20].

Повышение уровня белка в растительных клетках может быть обусловлено влиянием СК на активность протеаз. Однако проведенное нами ранее определение общей протеиназной активности в культуре ткани полисиас показало достоверное повышение общей протеолитической активности в клетках в присутствии СК [27]. Полученные результаты не противоречат данным литературы. Так, другими исследователями было установлено возрастание в присутствии СК целого ряда протеиназ за счет, как предположили авторы, индукции биосинтеза ферментов и/или регуляции их процессинга [31, 32]. Кроме того, имеются данные о репрессии СК генов, кодирующих ингибиторы протеиназ [33].

Таким образом, как было показано нами ранее, изменение протеолитической активности в культивируемых клетках при воздействии СК не коррелировало с уровнем внутриклеточного белка [27]. Содержание общего белка в клетках, как известно, определяется соотношением скоростей его биосинтеза и распада и всегда меняется при изменении любой из этих двух величин. Поэтому увеличение уровня общего белка в клетках может быть обусловлено как замедлением скорости его распада, так повышением скорости его биосинтеза. В частности, было установлено, что обработка СК и жасмонатом листьев гороха повышала уровень биосинтеза белка, а именно, обработка СК листьев гороха приводила к увеличению включения  $^{14}\text{C}$ -аминокислот в полипептиды с молекулярными массами 90, 64, 57, 38, 32, 25 и 18 кДа [28].

Данные о сочетанном влиянии СК и неблагоприятных температур на содержание внутриклеточного белка представлены на рис. 2. Из полученных результатов видно, что наиболее выраженный эффект на содержание белка оказывала СК также в концентрации

0.1 мкмоль на 100 г сырой биомассы. Обработка экзогенной СК культивируемых клеток в концентрациях 0.025 и 0.1 мкмоль на 100 г сырой биомассы увеличивала в них содержание внутриклеточного белка при воздействии высоких и низких положительных температур по сравнению с необработанными СК клетками. Повышение концентрации СК до 0.125–0.175 мкмоль на 100 г сырой биомассы вызывало противоположное действие, а именно резкое снижение содержания внутриклеточного белка в преобработанных СК клетках по сравнению не только с контролем, но и клетками, выращенными без СК.

Таким образом, в данном исследовании было установлено, что обработка салициловой кислотой культуры ткани *Polyscias filicifolia* приводит к изменению содержания нуклеиновых кислот и суммарного белка в растительных клетках полисциас, культивируемых как в стандартных условиях, так и при воздействии неблагоприятных температур. При сочетанном воздействии салициловой кислотой и неблагоприятных температур уровень нуклеиновых кислот оставался выше по сравнению с их концентрацией в культуре клеток, подвергнутых воздействию неблагоприятных температур, без предварительной обработки салициловой кислотой. Проведенное исследование позволяет дополнить общую картину ответных реакций растительных клеток, отражающих структурно-функциональную перестройку в растениях при стрессе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тарчевский И.А.* Катаболизм и стресс у растений. М.: Наука, 1993. 80 с.
2. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
3. *Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 5. С. 557–563.
4. *Shilpi M., Sudhir K.S., Narendra T.* // FEBS J. 2006. V. 273. № 5. P. 907–925.
5. *Kang H.M., Salveit M.E.* // Physiol. Plant. 2002. V. 115. № 4. P. 571–576.
6. *Raskin I.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. V. 43. P. 439–463.
7. *Rock C.D.* // New Phytol. 2000. V. 148. № 3. P. 357–396.
8. *Носов А.М.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 837–844.
9. *Бурьянов Я.И.* // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 930–944.
10. *Слепян Л.И., Арнаутов Н.И., Грушвицкий И.В.* // Растительные ресурсы. 1975. Т. 11. № 2. С. 198–204.
11. *Трилис Я.Г., Давыдов В.В.* // Растительные ресурсы. 1995. Т. 31. № 3. С. 19–35.
12. *Murachige T., Skoog F.* // Physiol. Plantarum. 1962. V. 15. № 5. P. 473–497.
13. *Писецкая Н.Ф.* // Растительные ресурсы. 1970. Т. 6. № 4. С. 516–522.
14. *Barret A.J., Kirschke H., Cathepsin H., Cathepsin L.* // Methods of Enzymology: Proteolytic Enzymes / Ed. L. Lorand. N.-Y.: Acad. Press, 1981. V. 80. P. 535–561.
15. *Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M.* // Physiol. Plant. 1997. V. 100. № 2. P. 241–254.
16. *Bowler C., Montagu M.V., Inze D.* // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. V. 43. P. 83–116.
17. *Dat J.F., Lopez-Delgado H., Foyer C.H., Scott I.M.* // Plant Physiol. 1998. V. 116. № 3. P. 1351–1357.
18. Методы биохимического исследования растений / Ред. А.И. Ермаков. Л.: Наука, 1972. С. 325–327.
19. *Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 5. С. 557–563.
20. *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.
21. *Максютова Н.Н., Галеева Е.И.* // Биохимия. 2005. Т. 70. № 3. С. 390–396.
22. *Сахабутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Шакирова Ф.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 579–583.
23. *Overmyer K., Brosché M., Pellinen R., Kuittinen T., Tuominen H., Ahlfors R., Keinänen M., Saarma M., Scheel D., Kangasjärvi J.* // Plant Physiol., 2005. V. 137. № 3. P. 1092–1104.
24. *Тарчевский И.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 5. С. 441–449.
25. *Молодченкова О.О., Адамовская В.Г., Левицкий Ю.А., Гонтаренко О.В., Соколов В.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 4. С. 441–446.
26. *Кириллова Н.В., Спасенков А.М., Спасенкова О.М., Стрелкова М.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 292–296.
27. *Белых Ю.В., Кириллова Н.В., Спасенков А.И.* // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2009. Сер. 3. № 2. С. 145–151.
28. *Тарчевский И.А., Максюткова Н.Н., Яковлева В.Г.* // Физиология растений. 1996. Т. 43. № 5. С. 667–670.
29. *Герасимова Н.Г., Придворова С.М., Озерецковская О.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 117–120.
30. *Ramanujam M.P., Abduljaleel V., Kumaravelu G.* // Biol. Plantarum. 1998. V. 41. № 2. P. 307–311.
31. *Hara-Nishimura L., Shimada T., Hiraiwa N.* // J. Plant Physiol. 1995. V. 145. № 5–6. P. 632–640.
32. *Kinoshita T., Yamada K, Hiraiwa N, Kondo M.* // Plant J. 1999. V. 19. № 1. P.43–53.
33. *Pena-Cortes H., Albrecht T., Prat S., Weiler E.W., Willmitzer L.* // Planta. 1993. V. 191. № 1. P. 123–128.

## Influence of Salicylic Acid on Biosynthesis of Nucleic Acids in *Polyscias filicifolia* Cell Culture under the Action of Unfavorable Temperatures

N. V. Kirillova, Yu. V. Belykh, and A. I. Spasenkov

*St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, ul. Professora Popova 4, St. Petersburg, 197376 Russia*

*e-mail: biochem@spcra.ru*

Received July 20, 2010

**Abstract**—Amounts of DNA and RNA was increased (from 20 to 50%) in the presence of salicylic acid in cells of *Polyscias filicifolia* tissue culture grown in Murachige–Skoog modified medium. Treatment of the tissue culture with salicylic acid resulted in a significant increase of intracellular protein and decrease of proteolytic activity. In cells treated with salicylic acid, the amounts of DNA and RNA was higher in conditions of heat (3 h, 45°C) and cold (24 h, 7°C) stress in comparison with cells exposed to unfavorable temperatures without the initial treatment with salicylic acid.

УДК 581.14.22+581.1

## ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОТОНТРАНСЛОЦИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 г. Э. П. Ладыженская, Н. П. Кораблёва

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

e-mail: ladyzhen@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 09.08.2010 г.

Обнаружено влияние салициловой кислоты (СК) на активность мембран-связанной  $H^+$ -АТФазы и пассивную протонную проницаемость мембраны везикул плазмалеммы (ВП) из паренхимных клеток клубней картофеля. Выявлена корреляция между действием СК на прорастание клубней и на активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы: применение ростостимулирующих концентраций СК ( $10^{-10}$ – $10^{-8}$  М) в системе *in vitro* приводило к активации плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы, тогда как введение в среду инкубации СК в ростингибирующих концентрациях ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  М) вызывало подавление активности фермента. При добавлении в инкубационную смесь жасмоновой кислоты (ЖК) отмечалось усиление эффекта СК на накопление  $H^+$  в ВП.

Регуляция покоя, роста и устойчивости клубней картофеля к патогенам имеет важное практическое значение для развития современного картофелеводства. Состояние покоя тесно связано с устойчивостью к поражению фитопатогенными микроорганизмами: покоящиеся клубни более устойчивы, чем прорастающие. Клубни, полученные от больных растений либо зараженные при хранении, подвержены преждевременному прорастанию, что приводит к потере семенного материала и ухудшению качества продовольственного картофеля [1]. В то же время искусственная стимуляция прорастания семенного картофеля при подготовке посадочного материала способствует получению раннего урожая, что снижает угрозу поражения фитофторой. Познавание молекулярных механизмов, контролирующих эти процессы, позволит целенаправленно изменять продолжительность состояния покоя и повышать устойчивость растений картофеля к патогенам и другим неблагоприятным факторам.

Фитогормон СК контролирует ответ растения на биотические и абиотические стрессы (заражение патогенными микроорганизмами, солевой, температурный, световой стрессы) [2–4]. Кроме того, СК участвует в регуляции ряда физиологических процессов: прорастание семян, рост сеянцев, цветение, старение [2, 5, 6].

В настоящее время накоплен обширный экспериментальный материал о механизмах действия СК на экспрессию защитных генов при индукции устойчивости растений к заражению патогенами [2]. Начальные этапы передачи сигнала СК – влияние этого соединения на функционирование цитоплазматической мембраны клетки значительно меньше привлекали внимание исследователей. Остаются также не-

достаточно изученными пути реализации сигнала СК при регуляции различных физиологических процессов у растений.

По современным представлениям, передача внешнего сигнала в растительную клетку обусловлена изменением функциональной активности компонентов цитоплазматической мембраны [7–9]. Мембраносвязанная  $H^+$ -АТФаза (КФ 3.6.1.3) генерирует на плазмалемме трансмембранный электрохимический градиент  $H^+$ , от величины которого зависит активность ионных каналов, пассивная диффузия и активный транспорт низкомолекулярных метаболитов [10]. Этот фермент участвует в регуляции многих функций растительной клетки и может рассматриваться, как одно из звеньев в цепи передачи внешних сигналов, контролирующих клеточный метаболизм. Показано, что активность протонтранслоцирующей АТФазы плазмалеммы растительной клетки изменяется под влиянием ряда сигнальных молекул (элиситоров защитных реакций, бактериальных и грибных токсинов, фитогормонов), различающихся по химической структуре, происхождению и действию на растение [7–10]. К числу таких соединений относится фитогормон ЖК, участвующий в регуляции состояния покоя и устойчивости растений [2, 3]. Установлено взаимодействие ЖК и СК в индукции защитных реакций у растений картофеля [12, 13], механизмы этого явления остаются неизученными.

Цель работы – оценка действия СК на прорастание клубней картофеля, активность  $H^+$ -АТФазы цитоплазматической мембраны клеток клубня и взаимодействия СК и ЖК при регуляции протонтранслоцирующей активности плазмалеммы.

## Влияние СК на прорастание клубней картофеля

Концентрация СК, М	Вес проростков, мг/клубень	Число клубней с боковыми корнями, шт.
0 (контроль)	863 ± 22	18 ± 1.1
10 <sup>-5</sup>	535 ± 18	13 ± 0.9
10 <sup>-6</sup>	648 ± 21	15 ± 0.6
10 <sup>-7</sup>	784 ± 27	17 ± 0.7
10 <sup>-8</sup>	1045 ± 32	22 ± 1.3
10 <sup>-9</sup>	1234 ± 35	24 ± 1.2
10 <sup>-10</sup>	1584 ± 33	28 ± 1.4

## МЕТОДИКА

**Объект исследования.** В опытах использовали клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский, находящиеся на начальной стадии прорастания, хранившиеся в темноте при +4°C.

**Оценка действия СК на прорастание клубней.** Клубни опрыскивали растворами СК (10<sup>-5</sup>–10<sup>-10</sup> М). Исходный раствор 10<sup>-3</sup> М СК, приготовленный на дистиллированной воде, содержал 0.125% этанола. Контрольные клубни обрабатывали дистиллированной водой с аналогичным содержанием этанола. Для каждого варианта использовали 30 клубней. После обработки клубни помещали во влажные камеры при оптимальных условиях для прорастания (20°C, темнота). Через 7 сут из опытных и контрольных клубней извлекали проросшие “глазки” и взвешивали их вместе с образовавшимися боковыми корнями. Вес проростков пересчитывали на 1 клубень. Опыты проводили в 3-кратной повторности.

**Выделение фракции, обогащенной ВП.** Выделение проводили из паренхимных тканей клубней описанным ранее методом с помощью дифференциального центрифугирования и очистки микросомальной фракции распределением в двухфазной системе ПЭГ 3350–декстран Т-500 [14].

**Измерение скорости накопления Н<sup>+</sup> в ВП.** Накопление и выход Н<sup>+</sup> оценивали по начальной скорости изменения интенсивности флуоресценции акридинового оранжевого (АО), как описано ранее [14]. Основная инкубационная среда содержала (мМ): сахароза – 150; трис-морфолиноэтансульфоновая кислота (МЕС) – 10; MgSO<sub>4</sub> – 3; этиленгликоль-бис-(аминоэтиловый эфир) N,N,N,N'-тетрауксусной кислоты (ЭГТА) – 1; KNO<sub>3</sub> – 50; KCl – 50; АО – 10 и препарат ВП (конечная концентрация 50 мкг белка/мл), рН 6.5. Реакцию начинали добавлением АТФ до конечной концентрации 1 мМ. В зависимости от варианта опыта в инкубационную среду вместе или по отдельности добавляли СК (10<sup>-5</sup>–10<sup>-12</sup> М) и ЖК (10<sup>-8</sup> М). Объем среды инкубации – 1 мл. Накопление протонов в ВП рассчитывали как [(F<sub>0</sub> – F)/F<sub>0</sub>]/мин/мг белка, где F<sub>0</sub> и F –

флуоресценция АО в инкубационной среде до и после начала реакции соответственно. При оценке действия СК и СК + ЖК на начальную скорость АТФ-зависимого накопления протонов в ВП контролем служила величина [(F<sub>0</sub> – F)/F<sub>0</sub>]/мин/мг белка = 1.4, полученная при отсутствии фитогормонов в среде инкубации. В присутствии 10<sup>-8</sup> М ЖК эта величина возрастала до 2.

**Измерение скорости пассивной утечки протонов.** В инкубационную смесь через 10 мин после начала реакции вводили дициклогексилкарбодимид (ДЦКД) до конечной концентрации 200 мкМ и регистрировали кинетику возрастания флуоресценции АО. При определении влияния СК и ЖК на пассивный выход протонов совместно с ДЦКД добавляли СК и ЖК в соответствующей концентрации. В контрольных опытах в инкубационную смесь вместо растворов АТФ, ДЦКД, СК и ЖК вносили равный объем буферного раствора. Контролем служила величина 1.1, полученная при отсутствии фитогормонов в среде инкубации. ЖК не влияла на выход Н<sup>+</sup> из ВП.

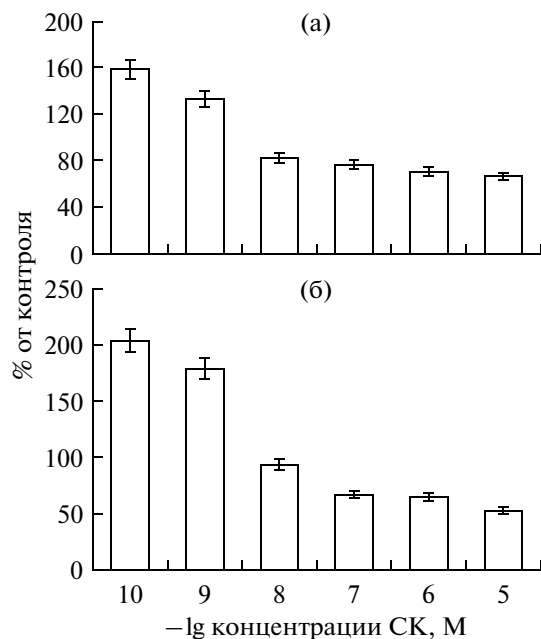
Флуоресценцию АО измеряли на спектрофлуорофотометре RF-5301PC (“Shimadzu” Япония). Белок определяли по методу Брэдфорд.

Опыты по измерению скорости накопления и пассивной утечки Н<sup>+</sup> проводили в 5 биологических повторностях. В таблице и на рисунках приведены средние арифметические величины и их стандартные отклонения.

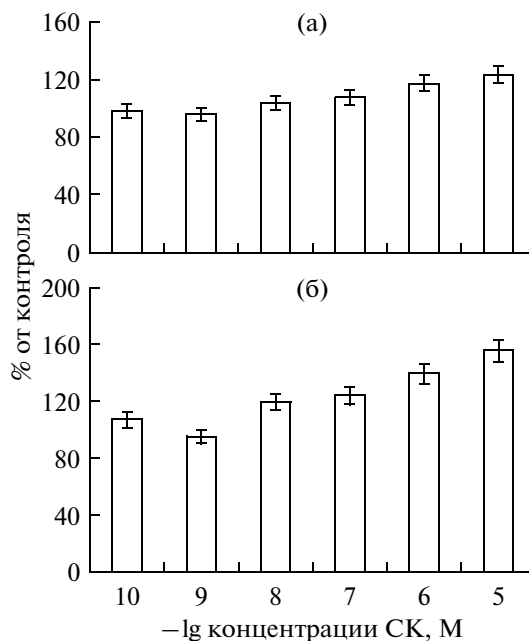
**Реактивы.** Использовали АО, БСА, дитиотрейтол, МЕС, трис, тетракаин, ЭГТА, фенолметилсульфонилфлуорид, СК и ЖК – “Sigma”, США; АТФ, ДЦКД – “Serva”, Германия; ПЭГ-3350 и декстран Т-500 – “Pharmacia”, Швеция. Остальные реактивы отечественного производства, квалификации х.ч.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Действие СК на прорастание клубней.** Обработка клубней, находящихся на начальной стадии прорастания, СК в концентрациях 10<sup>-5</sup>–10<sup>-10</sup> М показала, что препарат в низких концентрациях стимулировал рост “глазка” и образование на нем боковых корней. Максимальный стимулирующий эффект обнаружен при концентрации СК 10<sup>-10</sup> М. Применение более высоких концентраций СК приводило к снижению величины стимулирующего действия, замедлению роста апексов и подавлению образования боковых корней (таблица). Известно, что начальные этапы прорастания апикальной меристемы клубней картофеля связаны с процессами растяжения центральной стержневой меристемы клеток точек роста [15, 16], тогда как боковые корни являются продуктом деятельности периферической меристемы, которая митотически более активна, чем центральная зона апексов [17]. Это обстоятельство может свидетельствовать о регуляции СК процессов деления и растяжения клеток меристем апексов клубней кар-



**Рис. 1.** Действие СК (а) и СК + ЖК ( $10^{-8}$  М) (б) на начальную скорость АТФ-зависимого накопления  $H^{+}$  в ВП из клубней картофеля, % от контроля.



**Рис. 2.** Действие СК (а) и СК + ЖК ( $10^{-8}$  М) (б) на начальную скорость пассивного выхода  $H^{+}$  из ВП, % от контроля.

тофеля. Влияние СК на митотическую активность отмечалось ранее для клеток корней проростков пшеницы и гороха [18].

Установлено, что ингибирование прорастания клубней картофеля связано с действием абсцизовой кислоты (АБК), синтез которой может стимулироваться при введении в ткани клубней дополнительных количеств этилена [16]. Показана также стимуляция образования этилена в клетках клубней картофеля, обработанных СК в концентрации 90 мкМ [19]. Кажется весьма вероятным, что обнаруженный в наших экспериментах ростингибирующий эффект  $10^{-5}$ – $10^{-7}$  М СК связан с этилен-индуцированным повышением содержания АБК в тканях клубня.

#### Характеристика полученного препарата мембран.

Ранее было показано, что использованный нами метод позволяет выделить фракцию мембран, состоящую в основном из ВП, с незначительной примесью везикул тонопласта и содержит не менее 30% инвертированных ВП. Введение в инкубационную среду 50 мМ  $KNO_3$  полностью подавляло активность нитратчувствительной АТФазы тонопласта [14]. Таким образом, выделенный препарат может быть использован для оценки активности  $H^{+}$ -АТФазы плазмалеммы. Установлено также, что наблюдавшееся в опытах падение интенсивности флуоресценции АО при добавлении АТФ в инкубационную смесь отражает АТФ-индуцированное закисление внутренней полости мембранных везикул [14].

**Действие СК на транспорт  $H^{+}$  через везикулярную мембрану.** Введение СК в основную инкубационную

смесь изменяло начальную скорость тушения флуоресценции АО; характер действия определялся концентрацией фитогормона. В концентрациях  $10^{-10}$  и  $10^{-9}$  М СК увеличивала начальную скорость накопления протона в ВП; повышение концентрации СК до  $10^{-8}$ – $10^{-5}$  М вызывало прогрессирующее снижение протонтранслоцирующей активности (рис. 1а).

Накопление  $H^{+}$  в ВП зависит как от поступления в везикулы за счет функционирования  $H^{+}$ -АТФазы, так и от пассивной утечки из везикул по градиенту концентрации. Подавление активности  $H^{+}$ -АТФазы путем добавления ДЦКД в инкубационную смесь при сформированном градиенте  $H^{+}$  на мембране ВП (через 10 мин после начала реакции) позволяет оценить скорость пассивного выхода  $H^{+}$  из ВП. Сопоставление кинетики возрастания интенсивности флуоресценции АО в присутствии и отсутствии СК в инкубационной смеси обнаружило некоторое повышение скорости выхода  $H^{+}$  из ВП при добавлении  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  М СК (рис. 2а). Очевидно, значительное подавление накопления  $H^{+}$  в ВП повышенными концентрациями СК связано отчасти со стимуляцией выхода протона из везикул.

В отсутствие АТФ либо  $Mg^{2+}$  в среде инкубации не наблюдалось стимуляции СК ( $10^{-10}$  и  $10^{-9}$  М) поступления протонов в ВП и уменьшалась величина ингибирующего действия более высоких концентраций СК. Наиболее вероятным объяснением полученных результатов кажется влияние этого соединения на активность протонтранслоцирующей АТФазы; в высоких концентрациях СК может вы-

полнять функции протоннофора. СК вызывала диссипацию протонного градиента на плазмалемме клеток корней проростков пшеницы [18]. Авторы предполагают, что СК, обладая свойствами протоннофора, стимулирует протонную проводимость мембран патогена, подавляя тем самым его развитие.

Активация СК плазмалеммой  $H^+$ -АТФазы отмечалась ранее при индукции термоустойчивости в листьях гороха и проростках винограда [4, 20]. Механизм действия СК на функциональную активность плазмалеммы может быть связан со стимуляцией образования активных видов кислорода, изменяющих структуру мембраны путем перекисного окисления мембранных липидов [21–23].

Полученные данные свидетельствуют о возможности непосредственного взаимодействия СК с плазмалеммой клеток клубней картофеля, что влияет на активность мембраносвязанной  $H^+$ -АТФазы и пассивную протонную проницаемость мембраны.

Прорастание клубней картофеля в значительной степени обусловлено притоком низкомолекулярных питательных веществ и фитогормонов из запасющей паренхимы в апикальные меристемы. Этот процесс во многом зависит от функционирования  $H^+$ -АТФазы цитоплазматической мембраны [10]. Соответственно, влияние СК на интенсивность ростовых процессов в апикальных меристемах может осуществляться путем модификации активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток паренхимы клубней картофеля.

Действие СК на локальную и системную устойчивость клубней картофеля к фитотфоре также определялось концентрацией вещества. При высоких концентрациях ( $7 \times 10^{-4}$ – $7 \times 10^{-5}$  М) СК стимулировала заражение грибом, при более низких ( $7 \times 10^{-9}$ – $7 \times 10^{-8}$  М) – подавляла, а дальнейшее снижение концентрации СК приводило к уменьшению защитного действия вплоть до полного его исчезновения [24]. Устойчивость клубней картофеля к заражению патогенами зависит от физиологического состояния: прорастающие клубни менее устойчивы, чем покоящиеся [1]. Одним из механизмов влияния СК на устойчивость клубней может быть рострегулирующее действие этого фитогормона, синтез которого активируется в ответ на заражение фитотфоров.

В месте инфекции возрастает содержание не только СК но и ряда других сигнальных веществ [2], одно из которых – ЖК обладает свойствами регулятора роста клубней картофеля и влияет на функциональную активность плазмалеммы [11]. В наших экспериментах введение в инкубационную смесь ЖК в концентрации  $10^{-8}$  М, стимулирующей рост и  $H^+$ -АТФазную активность ВП, приводило к усилению эффекта СК на накопление  $H^+$  в ВП (рис. 1). При низких концентрациях СК в инкубационной смеси, стимулирующих активность  $H^+$ -АТФазы, до-

бавление ЖК вызывало дальнейшую активацию фермента, тогда как в присутствии более высоких концентраций СК, подавляющих накопление  $H^+$  в ВП, ЖК усиливала ингибирующее действие СК.

Пассивная протонная проницаемость везикулярной мембраны несколько возрастала при добавлении ЖК в инкубационную смесь, содержащую СК в высоких концентрациях. При низких концентрациях СК не наблюдалось действия ЖК на выход  $H^+$  из везикул (рис. 2).

В литературе имеется противоречивые сведения о взаимосвязи эффектов ЖК и СК. По мнению ряда авторов, взаимодействие между путями передачи сигнала этих соединений сводится к взаимному антагонизму [25, 26], однако получены данные о синергическом действии ЖК и СК при регуляции иммунного ответа клубней картофеля [12, 13]. Для развития защитных реакций у растений картофеля в отличие от арабидопсиса были необходимы оба эти фитогормона [13]. Предполагают функционирование единого пути передачи сигнала СК и ЖК [13].

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что СК в зависимости от концентрации может стимулировать или подавлять прорастание вышедших из покоя клубней картофеля и транспорт  $H^+$  через мембрану ВП клеток клубня. Отмечена корреляция между действием СК на прорастание клубней и на активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы: применение ростостимулирующих концентраций СК приводило к активации плазмалеммой  $H^+$ -АТФазы, тогда как введение в инкубационную смесь СК в ростингибирующих концентрациях вызывало подавление активности фермента и выход  $H^+$  из ВП. ЖК усиливала как стимулирующий, так и ингибирующий эффекты СК, что свидетельствует о различных молекулярных механизмах действия этих фитогормонов на протонтранслоцирующую активность плазмалеммы.

Анализ полученных нами и литературных данных позволяет предположить, что одним из общих пусковых механизмов передачи сигнала СК и ЖК может служить регуляция транспорта  $H^+$  через цитоплазматическую мембрану.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барская Т.А., Кораблёва Н.П., Морозова Э.В., Корневская Т.Ю. // Иммуитет и покой растений. М.: Наука, 1972. С. 172–179.
2. Rajjou L., Belghazi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C., Job D. // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. №. 3. P. 910–923.
3. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.
4. Liu Y., Liu H., Pan Q., Yang H., Huang W. // *Planta.* 2009. V. 229. № 5. P. 1087–1098.



5. *Morris K., MacKerness S.A.H., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Duchfnan-Wollaston V.* // *Plant J.* 2001. V. 23. № 5. P. 677–685.
6. *Martintz C., Pons E., Prats G., Leon G.* // *Plant J.* 2003. V. 37. № 2, P.208–217.
7. *Тарчевский И.А.* Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн, 2001. 448 с.
8. *Тарчевский И. А.* Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 295 с.
9. *Ладыженская Э.П., Проценко М.А.* // *Биохимия.* 2002. Т. 67. № 2. С. 181–189.
10. *Morsomme P., Voutry M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1465. № 1. P. 1–16.
11. *Ладыженская Э.П., Кораблёва Н.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология,* 2003. Т. 39. № 3. С. 341–345.
12. *Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Валугева Т.А., Озерецковская О.Л.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2008. Т. 44. № 2. С. 236–240.
13. *Halim V.F., Altmann S., Ellinger D., Eschen-Lippold L., Miersch O., Scheel D., Rosahl S.* // *Plant J.* 2009. V. 57. № 2. P. 230–242.
14. *Ладыженская Э.П.* // *Биол. мембраны.* 1999. Т. 16. № 5. С. 503–508.
15. *Платонова Т.А., Кораблёва Н.П.* // *Бот. журн.* 1992. Т. 77. № 1. С.73–77.
16. *Платонова Т.А., Кораблёва Н.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1995. Т. 31. № 1. С. 103–114.
17. *Иванов В.Б.* Пролиферация клеток в растениях. М.: Мир, 1987. 216 с.
18. *Гордон Л.Х., Минибаева Ф.В., Огородникова Т.И., Рахматуллина Д.Ф., Ценцевитский А.Н., Колесников О.Р., Максютин Д.А., Валитова Ж.Н.* // *Докл. РАН.* 2002. Т. 387. № 6. С. 839–842.
19. *Liang W.-S., Wen J.-Q., Liang H.-G.* // *Phytochemistry.* 1997.V.44. № 2. P. 221.–223.
20. *Zhang J.-H., Liu Y.-P., Pan Q.-H., Zhan Ji.-C., Wang Xin-Qin* // *Plant Sci.* 2006.V. 170. № 4. P. 768–777.
21. *Kawano T., Sahashi N., Takahashi R., Uozumi N., Muto S.* // *Plant Cell Physiol.* 1998. V. 349. № 7. P.721–730.
22. *Ali M. B., Hahn E.J., Paek K.Y.* // *Plant Cell Rep.* 2006.V. 25. № 6. P. 613–620.
23. *Ali M. B., Hahn E.J., Paek K.Y.* // *Molekules.* 2007. V. 12. № 3. P. 607–621.
24. *Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Чаленко Г.И., Озерецковская О.Л.* // *Докл. РАН.* 1996. Т. 347. № 3. С. 418–420.
25. *Farmer E.E., Ryan C. A.* // *Plant Cell.* 1992. V. 4. № 2. P. 129–134.
26. *Kunkel B.N., Brooks D.M.* // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. V. 5. № 4. P. 325–331.

## Effect of Salicylic Acid on the Proton Translocation Activity of Plasmalemma of Potato Tuber Cells

E. P. Ladyzhenskaya and N. P. Korablyova

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

*e-mail: ladyzhen@inbi.ras.ru*

Received August 9, 2010

**Abstract**—Action of salicylic acid (SA) on the activity of membrane bound H<sup>+</sup>-ATPase and passive proton permeability of plasmalemma membrane vesicles (PMV) from parenchyma cells of potato tubers was detected. A correlation between SA action and germination of tubers and activity of plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase was revealed: the application of growth-stimulating concentrations of SA (10<sup>-10</sup>–10<sup>-8</sup> M) in the system in vitro resulted in activation of plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase, while the utilization of growth-inhibiting concentrations (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> M) provoked inhibition of the enzyme activity. Addition of jasmonic acid (JA) to the incubation mix resulted in increase of SA effect on the accumulation of H<sup>+</sup> in PMV.

УДК 581.14.21+576.31.347

## ВЛИЯНИЕ МЕЛАФЕНА НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ АППАРАТ КЛЕТОК АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПРИ РЕГУЛЯЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛУБНЯХ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 г. Т. А. Платонова, А. С. Евсюнина, Н. П. Кораблёва

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

e-mail: platonova@inbi.rus.ru

Поступила в редакцию 24.06.2010 г.

Показано увеличение площади митохондриального аппарата клеток (укрупнение митохондрий) апикальных меристем при стимуляции ростовых процессов в клубнях растений картофеля *Solanum tuberosum* L. с помощью препарата мелафен. Выявлен стимулирующий эффект мелафена на дифференцировку митохондрий (увеличение числа конденсированных митохондрий, более богатых кристами). Полученные данные свидетельствуют об усилении активности митохондриального аппарата, связанной с возрастанием энергетических потребностей клеток апексов клубней картофеля при активации роста с помощью мелафена.

В настоящее время по-прежнему актуально изучение механизмов действия природных фитогормонов и их синтетических аналогов, направленно изменяющих рост и развитие растений, повышающих продуктивность и качество сельскохозяйственных культур, а также их устойчивость к воздействию неблагоприятных условий окружающей среды. Активно ведется поиск и испытания новых синтетических препаратов, действие которых в очень малых концентрациях приводило бы к стимуляции важнейших физиолого-биохимических процессов в растительном организме и, как результат, обеспечивало бы повышение урожайности и качества сельскохозяйственной продукции. В этой связи значительный интерес представляет регулятор роста нового поколения — синтетический препарат мелафен, представляющий собой меламиновую соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты, получаемый с высоким выходом из промышленно доступных продуктов [1]. При изучении ответных реакций растительных организмов было установлено, что мелафен в очень низких концентрациях проявляет рост-регулирующую активность и может быть рекомендован в качестве регулятора роста растений, отвечающий современным требованиям технологий применения регуляторов роста для повышения продуктивности важнейших сельскохозяйственных культур [2]. При изучении механизма действия мелафена на растения были установлены следующие факты:

— активация энергетических процессов, в частности дыхания и фотосинтеза, причем препарат в большей степени оказывал влияние на циклическое фотофосфорилирование [3];

— усиление регуляции метаболизма клеток тирозинкиназной сигнальной системой и изменение уровня тирозинового фосфорилирования белков

фотосинтетической ассимиляции углерода под действием мелафена [4];

— усиление синтеза фенольных соединений и алкалоидов [5].

Высокая физиологическая активность препарата мелафен связана с его влиянием на физико-химическое состояние биологических мембран растительного и животного происхождения. Это, в свою очередь, приводит к изменению липид-белкового взаимодействия, влияющего на активность ассоциированных с мембранами ферментов [4].

Удобным объектом для изучения молекулярных механизмов действия регуляторов роста являются клубни картофеля *Solanum tuberosum* L., апикальные меристемы которых в течение определенного времени после уборки находятся в состоянии глубокого покоя, т.е. не переходят к росту даже при благоприятных условиях внешней среды. Продолжительность глубокого покоя закреплена генетически и является характерным признаком сорта. По окончании периода покоя меристемы клубней, находящихся в благоприятных условиях (температура, влажность) переходят к росту. При неблагоприятных условиях рост замедляется, наступает период вынужденного покоя. Регуляция прорастания клубней имеет большое значение для практики картофелеводства: подавление прорастания является существенным фактором при хранении урожая клубней картофеля, тогда как стимуляция прорастания важна для предпосевной обработки клубней.

Изучение механизма действия мелафена на ростовые процессы в клубнях растений картофеля показало его влияние на процессы деления, растяжения и активации эндоплазматического ретикулаума клеток апикальных меристем [6, 7]. Установлено

увеличение площади пластидного аппарата клеток (укрупнение пластид) и стимулирующее действие препарата на накопление крахмала и развитие периферического пластидного ретикула в лейкопластах клеток апикальных меристем клубней под действием мелафена [8]. В препарате плазмалеммы из паренхимных клеток обработанных мелафеном клубней отмечалось возрастание активности мембраносвязанной  $H^+$ -АТФазы и увеличение пассивной протонной проницаемости мембраны везикул плазмалеммы, что влияет на поступление низкомолекулярных метаболитов и фитогормонов в клетки апекса и на процессы деления и растяжения клеток апекса клубней картофеля [7]. Однако имеющиеся данные не дают полного представления о механизмах действия мелафена, связанных с интенсификацией физиологических процессов в клетках апикальных меристем в процессе роста. В связи с этим дальнейшее изучение механизма действия этого перспективного регулятора роста на клетки клубней картофеля представляет значительный интерес.

Настоящая работа является частью комплексного биохимического исследования по изучению механизма действия мелафена на ростовые процессы в меристемах клубней картофеля. Синтетические процессы при росте требуют значительных энергозатрат, которые напрямую связаны с активацией энергетического обмена клеток и, в первую очередь, с изменением энергетики митохондрий. Представляло интерес оценить влияние мелафена в рост-стимулирующей концентрации на митохондриальный аппарат клеток апикальных меристем клубней картофеля. Митохондрии — одна из наиболее удобных для анализа структур при изучении реакции клеток на действие биологически активных веществ, поскольку их тонкая структура в значительной степени является показателем функционального состояния клеток.

Цель работы — электронно-микроскопическое и морфометрическое изучение митохондрий в клетках апикальных меристем клубней картофеля при прорастании и под действием мелафена в рост-стимулирующей концентрации.

## МЕТОДИКА

Объект исследования — апексы (апикальные меристемы) клубней картофеля *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской в норме (на стадии прорастания) и под действием мелафена в ранее установленной рост-стимулирующей концентрации [6]. Для опыта брали по 30 клубней, находящихся в состоянии вынужденного покоя и погружали на 10 мин в раствор мелафена в концентрации  $10^{-8}$  М (сильная стимуляция роста). Контролем служили клубни, обработанные дистиллированной водой. После обработки клубни из опытных и контрольных вариантов высушивали и помещали во влажные камеры при опти-

**Таблица 1.** Ультраморфометрическая характеристика митохондрий в клетках апикальных меристем клубней картофеля в норме (при прорастании) и под действием мелафена

Вариант	Число митохондрий на срезе клетки	Общая площадь митохондрий на срезе клетки, $\mu\text{м}^2$	Площадь одной митохондрии, $\mu\text{м}^2$
Контроль	$2.03 \pm 0.01$	$0.45 \pm 0.02$	$0.22 \pm 0.01$
Мелафен, $10^{-8}$ М	$2.04 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.02$	$0.32 \pm 0.03$

мальных условиях для прорастания ( $18^\circ\text{C}$ , темнота). Через 12–14 сут при появлении на клубнях признаков роста из опытных и контрольных клубней под бинокулярным микроскопом МБС-2 (ЛОМО, Россия) извлекали “глазки” (апексы), фиксировали их в 2.5%-ном глутаровом альдегиде на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.1–7.2) и в 1%-ном  $\text{OsO}_4$ , обезвоживали этанолом возрастающей концентрации и ацетоном, заключали в эпоксидную смолу ЭПОН-812 по общепринятой методике. Для сравнительного изучения из контрольных и опытных вариантов были взяты клетки стержневой меристемы апексов и клетки нижнего слоя центральной меристемы, граничащие со стержневой зоной. Согласно ранее полученным данным именно эти клетки являются клетками-мишенями для действия биологически активных веществ при регуляции ростовых процессов в клубнях картофеля [9, 10]. Предварительную ориентировку срезов для определения зональности апексов выполняли под световым микроскопом, используя полутонкие срезы. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме (“LKB”, Швеция), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца [11] и просматривали под электронным микроскопом JEM-100С (“Jeol”, Япония). Для количественной оценки митохондриального аппарата клеток апексов была применена специальная компьютерная программа “Cell Counter”, позволяющая автоматически обчислять площади клеток и различных внутриклеточных структур (в том числе, митохондрий,  $\mu\text{м}^2$ ) по отсканированным изображениям, полученным с микроскопа (с учетом увеличений микроскопа и разрешений сканера) [12]. Точность вычисления площади определяется погрешностью при фотографировании и сканировании изображения, а также точностью представления вещественных чисел в компьютере.

Число митохондрий на срез клетки (или частоту встречаемости митохондрий) просчитывали визуально на тех же изображениях клетки. Результаты измерений с 30 негативов каждого варианта опыта, выраженные средними морфометрическими показателями, и их стандартные ошибки представлены в табл. 1. Статистическую обработку данных проводи-

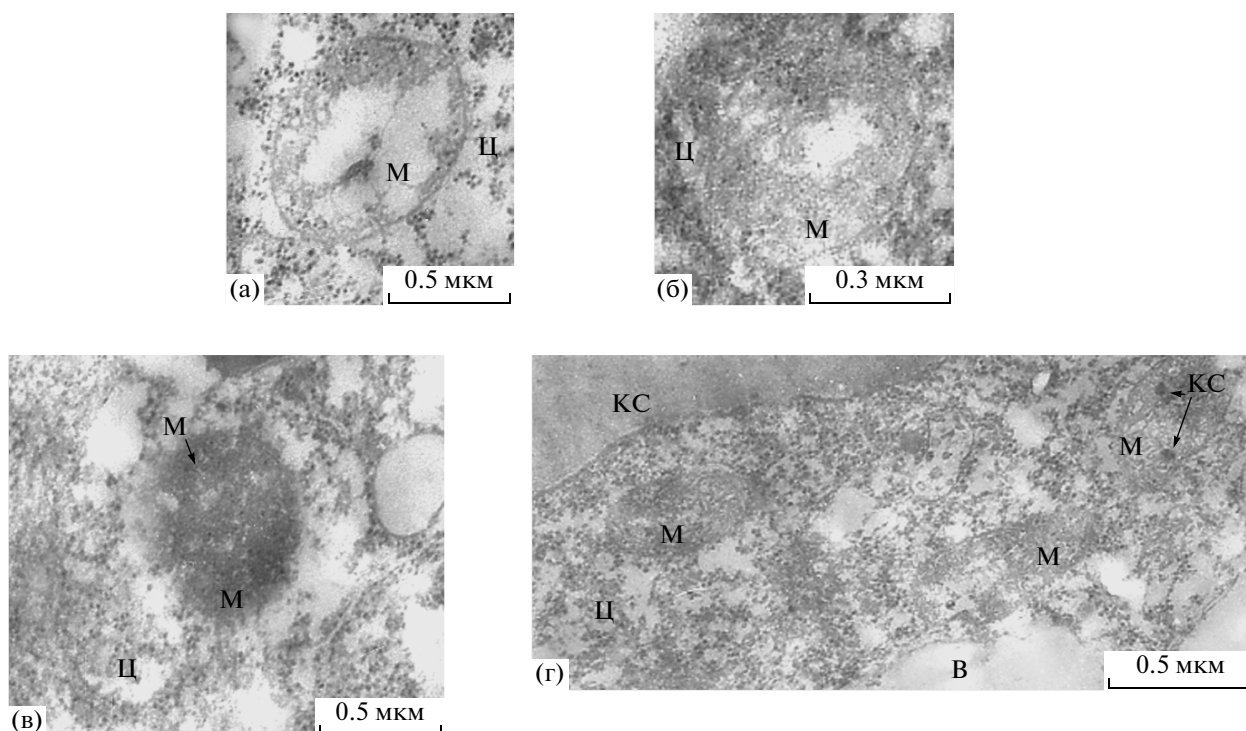
**Таблица 2.** Ультраструктурная характеристика митохондрий в клетках апексов клубней картофеля под действием мелафена (в % от числа просмотренных митохондрий)

Вариант	Характеристика митохондрий				
	форма	строма		кристы	
		электронно-прозрачная	конденсированная	единичные, пластинчатые	многочисленные
Контроль	Округлая, овальная	58	42	58	42
Мелафен, $10^{-8}$ М	Округлая, овальная, удлиненная	38	62	38	62

ли с помощью компьютерной программы “Microsoft Excel”. Кроме того, наряду со средними морфометрическими данными о числе и площади митохондрий представляли интерес показатели, характеризующие разнообразие митохондриального аппарата (по ультраструктурной характеристике) в клетках апексов контрольных и опытных растений. Для этого в каждом случае подсчитывали число митохондрий с той или иной морфологией. Эти данные, выраженные в процентах от общего числа просмотренных митохондрий в каждом варианте опыта, представлены в табл. 2.

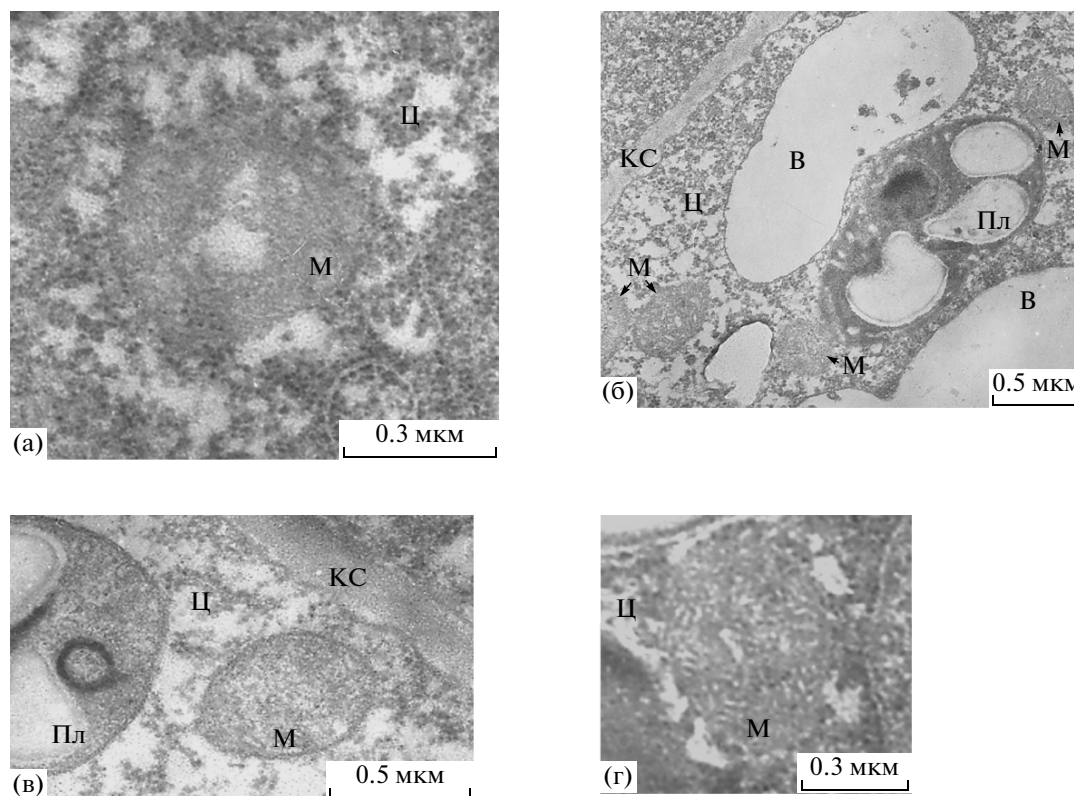
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальный аппарат клеток стержневой и пограничного с ней слоя центральной меристемы в контроле (при прорастании) представлен в среднем двумя митохондриями на срез клетки (при увеличении микроскопа 15000; табл. 1). Средняя площадь одной митохондрии составляла  $0.22 \pm 0.01$  мкм<sup>2</sup>, а общая площадь всех митохондрий на срезе клетки —  $0.45 \pm 0.01$  мкм<sup>2</sup> (табл. 1). В клетках стержневой меристемы апексов клубней картофеля митохондрии были достаточно разнообразными по морфологии даже в



**Рис. 1.** Фрагменты клеток стержневой меристемы апексов клубней картофеля (контроль, при прорастании): а, б – митохондрии с участками малой электронной плотности в центре и слабовыраженными кристами; в, г – конденсированные митохондрии.

Обозначения к рис. 1, 2: В – вакуоль, ИГ – интрамитохондриальные гранулы, КС – клеточная стенка, М – митохондрия, Пл – пластида, Ц – цитоплазма.



**Рис. 2.** Фрагменты клеток стержневой меристемы клубней картофеля (обработка мелафеном,  $10^{-8}$  М): а – митохондрия с электронно-прозрачным участком в центре; б–г – конденсированные митохондрии.

пределах одной клетки. Они были округлой или овальной формы (рис. 1а, 1б), более правильной, чем форма пластид. Митохондрии имели среднюю электронную плотность матрикса, равную либо незначительно превышающую плотность окружающей гиалоплазмы и заметно ниже плотности стромы пластид (табл. 2; рис. 1а, 1б). У многих митохондрий в центре обнаруживалась светлая зона малой электронной плотности (табл. 2; рис. 1а, 1б), в которой при больших увеличениях микроскопа можно наблюдать фибриллы митохондриальной ДНК. Митохондрии имели немногочисленные, неупорядочно ориентированные, рыхло расположенные, часто слабо выраженные кристы (рис. 1а, 1б). В матриксе отдельных митохондрий можно было наблюдать темные интрамитохондриальные гранулы неизвестной природы (рис. 1г). Таким образом, в большинстве случаев (58%) митохондрии имели ортодоксальную конфигурацию, соответствующую состоянию сниженной выработки АТФ. Однако, наряду с ортодоксальными митохондриями, встречались и более конденсированные митохондрии (уплотненный матрикс, четко очерченные кристы с расширенными интракристными промежутками, 42%) (табл. 2; рис. 1в, 1г), что соответствует состоянию активной продукции АТФ.

Анализ электронно-микроскопических и ультраморфометрических данных показал, что под дей-

ствием мелафена в стимулирующей рост концентрации по отдельным параметрам внутренней структуры митохондриального аппарата клеток апикальных меристем клубней картофеля происходили качественные и количественные изменения.

Подсчет числа митохондрий на срез клетки не выявил различий между опытным и контрольным вариантами (табл. 1), однако в 1.5 раза увеличивалась средняя площадь одной митохондрии (до  $0.32 \pm 0.03$   $\mu\text{m}^2$ ) и общая площадь всего митохондриального аппарата клеток (до  $0.65 \pm 0.03$   $\mu\text{m}^2$ , табл. 1). Таким образом, наблюдалось укрупнение митохондрий под действием мелафена в стимулирующей рост концентрации. Этот факт может свидетельствовать об усилении активности митохондрий, проявляющейся в увеличении площади их поверхности [13, 14], что необходимо для оптимизации энергетических потребностей растущей клетки. Следует отметить, что это явление хорошо согласуется с нашими данными об усилении роста апексов клубней картофеля при данной концентрации мелафена [6].

При обработке мелафеном в клетках отмечалось уменьшение числа митохондрий с электронно-прозрачными участками матрикса (до 38%, табл. 2; рис. 2а) и увеличение (до 62%) числа конденсированных митохондрий, более богатых кристами

(дифференциация митохондрий) (рис. 2б–2г). Известно, что конденсированная структура митохондрий соответствует усилению процесса окислительного фосфорилирования и, следовательно, увеличению выработки АТФ в клетке [15] при возрастании потребности в энергии.

На митохондриях, выделенных из корнеплодов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), было показано [16], что под действием мелафена происходило увеличение максимальной скорости окисления НАДФ-зависимых субстратов и эффективности окислительного фосфорилирования, активирование переноса электронов на конечном (цитохромоксидазном) участке дыхательной цепи митохондрий, что, по-видимому, обеспечивало активацию энергетических процессов в клетке. С этим, очевидно, связано описанное в литературе ускорение прорастания семян, усиление теплопродукции растительных клеток и активация синтетических процессов под действием мелафена [2].

К настоящему времени накоплена обширная литература относительно морфологических изменений в ответ на различного рода воздействия на клетку. Показано, что структурные и ультраструктурные изменения клеточных органоидов в ответ на воздействия соответствуют характеру и степени определенных функциональных и биохимических клеточных изменений. Можно считать доказанным, что изменения структуры клеточных органоидов связаны с их функциональным состоянием и хорошо отражают его [14, 15, 17], а точные количественные параметры не только существенно дополняют картину структурных изменений клеточных органелл, но и позволяют судить о степени функциональной активности клетки и ее структур.

Ультраморфометрический анализ полученных данных позволяет заключить, что под действием мелафена в стимулирующей рост концентрации в клетках апикальных меристем клубней картофеля площадь митохондриального аппарата и отдельные показатели внутренней структуры митохондрий были выше, чем в контроле. Следует отметить, что наблюдалась определенная корреляция между действием мелафена в рост-стимулирующей концентрации и действием цитокинина. Это корреляция проявлялась в стимуляции процессов деления и растяжения клеток, в активации гранулярного эндоплазматического ретикулума цитоплазмы, в укрупнении пластид, накоплении крахмала и развитии периферического пластидного ретикулума в клетках апикальных меристем клубней картофеля, показанных нами ранее [6–8], а также в установленной в опытах *in vitro* стимуляции активности митохондрий клеток меристем картофеля в присутствии кинетина [18].

Показано, что мелафен, подобно стимуляторам роста цитокининового ряда, участвует в регуляции многих физиологических процессов у растений, о чем свидетельствуют данные об однонаправленно-

сти действия природного фитогормона цитокинина и мелафена на растительную клетку. Однако пока нельзя утверждать, что механизмы действия этих веществ полностью совпадают [19, 20].

Полученные данные могут представлять интерес для практики картофелеводства, так как расширяют наши представления о биохимических механизмах регуляции ростовых процессов в клубнях картофеля с помощью мелафена и могут быть использованы при разработке новых биотехнологий по регуляции покоя, роста и повышения продуктивности картофеля.

Авторы выражают глубокую благодарность разработчикам препарата д.б.н. В.С. Резнику и к.х.н. С.Г. Фаттахову (Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН) за предоставленную возможность работать с мелафеном.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент РФ № 2158735 // Б.И. 2000. № 31. С. 314.
2. Фаттахов С.Г., Лосева Н.Л., Коновалов А.И., Резник В.С., Алябьев А.Ю., Гордон Л.Х., Трибунских В.И. // Докл. РАН. 2004. Т. 394. № 1. С. 127–129.
3. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.Г., Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. // Докл. РАН. 2006. Т. 409. № 1. С. 123–125.
4. Каримова Ф.Г., Ванюшина С.А., Федина Е.О., Мударисов Ф.А. Сб. материалов Всерос. семинара-совещания “Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста растений нового поколения “Мелафен” в сельском хозяйстве и биотехнологии”. Казань: РИЦ “Школа”, 2006. С. 50–69.
5. Загоскина Н.В., Алявина А.К., Гладышко Т.О. Сб. материалов Всерос. семинара-совещания “Состояние исследований и перспективы применения регулятора роста растений нового поколения “Мелафен” в сельском хозяйстве и биотехнологии”. Казань: РИЦ “Школа”, 2006. С. 114–120.
6. Ладыженская Э.П., Платонова Т.А., Евсюнина А.С., Фаттахов С.Г., Кораблёва Н.П., Резник В.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 246–251.
7. Платонова Т.А., Ладыженская Э.П., Евсюнина А.С., Лагутина Н.Ф., Кораблёва Н.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 4. С. 468–475.
8. Платонова Т.А., Евсюнина А.С., Кораблёва Н.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 354–360.
9. Платонова Т.А., Кораблёва Н.П. // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 6. С. 870–881
10. Korableva N.P., Platonova T.A., Dogonadze M.Z., Evsyunina A.S. // Biol. Plantarum. 2002. V. 45. № 1. P. 39–43.
11. Reynolds E.S. // J. Cell Biol. 1963. V. 17. № 1. P. 208–210.
12. Платонова Т.А., Евсюнина А.С., Беликов С.В., Кораблёва Н.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 3. С. 330–339.

13. Машанский В.Ф., Винниченко Л.Н., Мосевич Т.Н., Дунаева С.Е., Сеницкая И.А. // Ультраструктура растительных клеток. Л.: Наука, 1972. С. 90–97.
14. Польшгалова О.О., Гордон Л.Х., Бутакова И.В., Алексеева В.Я., Ценцевицкий А.Н., Швец И.М. // Физиология и биохимия культ. растений. 1991. Т. 23. № 4. С. 343–348.
15. Пономарева А.А., Польшгалова О.О. // Цитология. 2001. Т. 43. № 6. С. 561–565.
16. Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., Шугаев А.Г., Генерозова И.П., Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 5. С. 672–677.
17. Машанский В.Ф., Рабинович И.М. Ранние реакции клеточных органоидов. Л.: Наука, 1987. 119 с.
18. Шатило В.И., Морозова С.Е., Мелик-Саркисов О.С. // Физиология растений. 1988. Т. 35. № 1. С. 150–157.
19. Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. // Физиология растений. 2000. Т. 49. № 4. С. 626–640.
20. Кашина О.А., Фаттахов С.Г., Лосева Н.Л., Коновалов А.И., Гордон Л.Х., Алябьев А.Ю., Резник В.С. // Докл. РАН. 2005. Т. 405. № 1. С. 123–124.

## Effect of Melafen on Mitochondrial Apparatus of Apical Meristem in Growth Regulation in Potato Tubers

T. A. Platonova, A. S. Evsyunina, and N. P. Korablyova

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

*e-mail: platonova@inbi.ras.ru*

Received June 24, 2010

**Abstract**—Growth stimulation in potato *Solanum tuberosum* L. tubers by melafen preparation caused an increase in area of mitochondrial apparatus (increase in mitochondrial size) in apical meristem cells. Melafen stimulated mitochondrial differentiation (increase in number of condensed mitochondria enriched in cristas). Obtained data revealed an increase in activity of mitochondrial apparatus which is connected with an increase in energetic demands of cells in potato tuber apexes at melafen growth activation.

УДК 543.544:547.913

## ЭФИРНОЕ МАСЛО ОРЕГАНО КАК ИНГИБИТОР ОКИСЛЕНИЯ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2011 г. М. Б. Теренина, Т. А. Мишарина, Н. И. Крикунова, Е. С. Алинкина,  
Л. Д. Фаткулина, А. К. Воробьева

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва 119334*

*e-mail: tmish@rambler.ru*

Поступила в редакцию 08.10.2010 г.

Исследовано ингибирование окисления метиловых эфиров жирных кислот эфирным маслом орегано методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии. Смесь жирных кислот была выделена из мозга мышцей и содержала насыщенные, моно-, ди- и полиненасыщенные кислоты с числом атомов углерода от 16 до 24. Изучено изменение состава гексанового раствора эфиров в присутствии масла орегано и без него при автоокислении на свету в течение 1 года. Установлено, что скорость окисления ненасыщенных жирных кислот возрастала с увеличением степени их ненасыщенности. Эфирное масло орегано ингибировало процесс окисления. Антиоксидантная активность масла увеличивалась с увеличением его концентрации. Показано, что карвакрол и тимол являлись основными антиоксидантными компонентами эфирного масла орегано.

Природные антиоксиданты как альтернатива синтетическим в последние годы находят широкое применение в пищевой промышленности, косметологии, фармацевтике, медицине. Их используют для ингибирования процессов окисления в сложных биологических системах, содержащих липиды [1–3]. Известно, что эфирные масла обладают биологической активностью, в том числе и антиоксидантной [4, 5]. В ряде исследований найдено, что высокую антиоксидантную активность (АОА), сравнимую с активностью  $\alpha$ -токоферола, проявляют масла пряных растений: гвоздика, орегано, тимьян, розмарин, базилик [4–9].

Антиоксидантная активность эфирных масел в значительной степени зависит от их состава. Они представляют собой сложные смеси, содержащие несколько десятков органических соединений. Основными компонентами масел являются терпеновые углеводороды, функциональные производные терпенов, секвитерпены, бензольные производные. Исследование их АОА показало, что наиболее сильными антиоксидантами являются фенольные соединения. Тимол и карвакрол, основные компоненты ряда эфирных масел, по способности ингибировать окисление близки к  $\alpha$ -токоферолу [10, 11]. АОА масел различных видов орегано и чабреца увеличивалась с увеличением концентрации этих соединений в их составе [12]. Высокую АОА проявляли монотерпеновые углеводороды, терпинолен,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -терпинены [10, 11]. Как правило, АОА эфирных масел выше, чем активность индивидуальных компонентов, что указывает на наличие синергетического эффекта за счет сложного многокомпонентного состава масел [11–13].

Антиоксидантные свойства эфирных масел зависят не только от состава тестируемых систем, но и от метода оценки, поэтому результаты, полученные разными методами, невозможно сопоставить [11, 14, 15]. Одним из простых и информативных методов являлось ингибирование автоокисления низшего альдегида в присутствии антиоксиданта, который использовался успешно для определения АОА эфирных масел [16–19].

Наибольший интерес вызывает использование эфирных масел для предотвращения окисления высших жирных кислот (ЖК), особенно в живых системах. В опытах на животных было показано, что уменьшающийся с возрастом уровень полиненасыщенных жирных кислот можно стабилизировать добавлением в пищу лабораторным животным растительных эфирных масел, обладающих антиоксидантной активностью [20–22]. Эфирные масла активно ингибировали окисление полиненасыщенных ЖК в модельных экспериментах [10, 23–26]. Проявление антиоксидантной или прооксидантной активности эфирных масел по отношению к жирным кислотам полностью зависит от состава и концентрации тестируемых систем. Ранее нами обнаружено, что однократное и десятикратное масла лимона, отличающиеся только количественным составом основных компонентов из-за различных методов выделения, обладали различной АОА [26]. Однократное масло лимона, содержащее большее количество лимонена и  $\gamma$ -терпинена, ингибировало окисление метиллинолеата и метилолеината, а десятикратное — ускорило этот процесс, т.е. проявляло прооксидантную активность [26]. В последнем случае метиловые эфиры полиненасыщенных ЖК являлись антиоксиданта-



ми по отношению к отдельным компонентам десятикратного эфирного масла лимона. В работе [25] показано, что высокой АОА обладали полиненасыщенные ЖК с числом атомов углерода в цепи от 16 до 24. Способность компонентов эфирных масел конкурировать с полиненасыщенными жирными кислотами за окисляющие агенты является химической основой их АОА. В настоящее время доказано, что АОА определяется составом всей изучаемой системы, поэтому важно определять свойства антиоксидантов в реальных продуктах или модельных системах, максимально воспроизводящих такие продукты [14, 27].

Цель работы — изучение влияния структуры полиненасыщенных ЖК на степень ингибирования их автоокисления в системе, содержащей эфирное масло орегано и сложную смесь метиловых эфиров жирных кислот, выделенную из мозга мышей.

### МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования выбрана смесь жирных кислот, выделенных из мозга мышей линии BALB в возрасте 6 мес. Мозг гомогенизировали вручную в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. К 1 г гомогената, помещенного в стеклянную пробирку с герметично завинчивающейся пробкой добавляли 25 мл метанола и оставляли в холодильнике на 1 ч, затем при охлаждении и интенсивном перемешивании добавляли 1 мл ацетилхлорида и кипятили на водяной бане 1 ч. К образцу добавляли 25 мл 6%-ного водного раствора  $K_2CO_3$  и встряхивали. Полученные метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) экстрагировали 10 мл гексана. Гексановый раствор отделяли после центрифугирования в течение 5 мин при 970 г и сушили над безводным сульфатом натрия. После добавления 2 мкл тетрадекана (внутренний стандарт) раствор МЭЖК разделяли на 3 пробы по 2.5 мл, которые помещали в пробирки объемом 5 мл. В растворы 2 и 3 добавляли 0.005 и 0.5 мкл эфирного масла орегано, что соответствовало 0.1 и 10% по отношению суммарному количеству МЭЖК, так как в образцах 1–3 содержалось по 5 г/смесь МЭЖК. В контрольный раствор 1 масло не добавляли. Образцы в закрытых пробками пробирках хранили на свету при комнатной температуре в течение 12 мес. Каждую неделю пробирки открывали и продували 10 мл воздуха с помощью пипетки. Количественное содержание веществ в образцах определяли методом капиллярной газовой хроматографии в течение 2 мес каждые 2 нед, а затем через каждый месяц хранения.

Газохроматографический анализ (ГЖХ) образцов проводили на хроматографе Кристалл 2000 М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (50 м × 0.32 мм, слой фазы 0.25 мкм, фирма “Supelco”, США) при программировании температуры колонки от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин и температуре инжек-

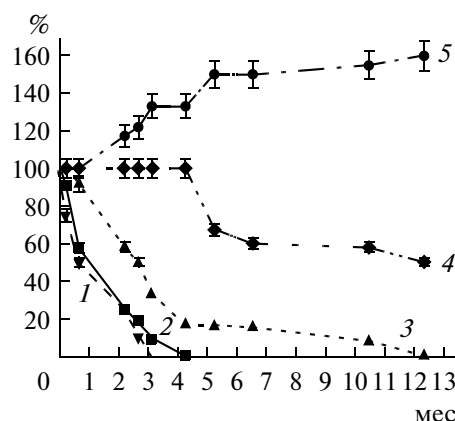


Рис. 1. Изменение содержания (%) тимола (1), карвакрола (2),  $\gamma$ -терпинена (3), линалоола (4) и п-цимена (5) в образце 3 с увеличением длительности хранения (мес).

тора и детектора 250°C. Скорость газа-носителя—гелия через колонку составляла 2 мл/мин. Анализировали по 2 мкл гексановых растворов. Количественное содержание веществ в растворах образцов рассчитывали по отношению площадей пиков, соответствующих веществам и внутреннему стандарту. Степень окисления МЭЖК и компонентов эфирных масел (%) определяли по отношению к их содержанию в исходных образцах.

Идентификацию компонентов в образцах осуществляли на основе величин индексов удерживания и масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных ГЖХ, на приборе HP 5890/5980 (“Hewlett Packard”, США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основными компонентами выбранного для исследования масла орегано являлись (%): карвакрол — 64.2, п-цимен — 17.4,  $\gamma$ -терпинен — 11.3, тимол — 3.0, линалоол — 2.9. Исследования показали, что в процессе хранения происходили значительные изменения в составе эфирного масла (рис. 1). Наиболее сильному окислению подвергались фенольные соединения, которые, как известно, являлись очень активными антиоксидантами [10–12]. Окисление карвакрола, тимола и  $\gamma$ -терпинена начиналось уже через 1 нед хранения. Карвакрол и тимол полностью исчезали через 12 и 14 нед хранения соответственно. В меньшей степени наблюдалось окисление  $\gamma$ -терпинена. За 18 нед его количество уменьшилось в 6 раз, к концу эксперимента оставалось 8%  $\gamma$ -терпинена по отношению к исходному количеству. Окисление линалоола начиналось после 18 нед и через 1 год хранения 67% спирта оставалось неокисленным. Как видно из рис. 1, в про-

Состав МЭЖК, выделенных из мозга мышей (отн. %)

№	Индекс удерживания	МЭЖК	Кислота	Отн. %
1	1883	16 : 1 $\omega$ 9* 16 : 1 $\omega$ 7	7-гексадеценовая 9- гексадеценовая	0.35
2	1912	16 : 0	Гексадекановая (пальмитиновая)	21.61
3	2011	17 : 0	Гептадекановая (маргариновая)	0.10
4	2075	18 : 2 $\omega$ 6	9,12-октадекадиеновая (линолевая)	0.66
5	2080	18 : 1 $\omega$ 9	9-октадеценовая (олеиновая)	16.19
6	2087	18 : 1 $\omega$ 7	11-октадеценовая	4.15
7	2113	18 : 0	Октадекановая (стеариновая)	23.28
8	2235	20 : 4 $\omega$ 6	5,8,11,14-эйкозатетраеновая (арахидоновая)	8.86
9	2253	20 : 3 $\omega$ 6, 20 : 3 $\omega$ 9	8,11,14-эйкозатриеновая 5,8,9-эйкозатриеновая	0.40
10	2265	20 : 2 $\omega$ 9	8,11-эйкозациеновая	0.10
11	2273	20 : 2 $\omega$ 6	11,14-эйкозациеновая	0.15
12	2281	20 : 1 $\omega$ 9	11-эйкозеновая	2.28
13	2287	20 : 1 $\omega$ 7	13-эйкозеновая	0.35
14	2311	20 : 0	Эйкозановая (арахиновая)	0.66
15	2418	22 : 5 $\omega$ 6	4,7,10,13,16-докозапентаеновая	0.35
16	2423	22 : 6 $\omega$ 3	4, 7,10,13,16,19-докозагексаеновая	12.25
17	2431	22 : 4 $\omega$ 6	7,10,13,16-докозатетраеновая	3.04
18	2482	22 : 1 $\omega$ 9	13-докозеновая	0,25
19	2487	22 : 1 $\omega$ 7	15-докозеновая	0.25
20	2515	22 : 0,	Докозановая (бегеновая)	0.76
21	2616	23 : 0	Трикозановая	0.25
22	2690	24 : 1 $\omega$ 9, 24 : 1 $\omega$ 7	15-тетракозеновая 17-тетракозеновая	2.43
23	2718	24 : 0	Тетракозановая	1.26

\* Первая цифра в обозначении кислоты показывает число атомов углерода в цепи, вторая — количество метиленпрерывающихся двойных связей, величина  $\omega$  показывает номер углеродного атома (считая от конца цепи), у которого расположена первая двойная связь.

цессе хранения в 1.6 раза увеличивалось количество п-цимена. Это связано с тем, что  $\gamma$ -терпинен окислялся до п-цимена. Такое поведение было обнаружено ранее при хранении эфирных масел [28]. Механизм этой реакции и антиоксидантная активность терпиненов изучена в работе [29].

В таблице представлен состав жирных кислот, выделенных из мозга мышей. Как видно, смесь содержала насыщенные, моно- и полиненасыщенные кислоты с числом атомов углерода в цепи от 16 до 24. Суммарное количество насыщенных кислот состав-

ляло почти 45%. Остальная часть — это ненасыщенные кислоты, содержащие от 1 до 6 двойных связей, в том числе наиболее чувствительные к окислению кислоты, такие, как 20:4 $\omega$ 6, 22:6 $\omega$ 3, 22:4 $\omega$ 6.

Результаты исследования показали, что в условиях эксперимента при хранении в течение 1 г. в образцах с маслом орегано и без него не происходило окисление метиловых эфиров насыщенных жирных кислот. Также не подвергались окислению мононенасыщенные МЭЖК с числом атомов углерода 16, 20, 22 и 24. Несколько иная картина наблюдалась в

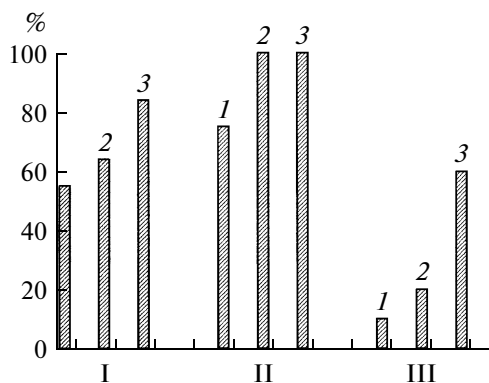


Рис. 2. Содержание (%) метиловых эфиров кислот 18:1ω9 (I), 18:1ω7 (II) и 18:2ω6 (III) в образцах 1 (контроль), 2 и 3 через 12 мес автоокисления.

случае ненасыщенных кислот С-18. Незначительное окисление метиловых эфиров олеиновой и 11-октадеценовой кислот начиналось после 4 мес в контрольном образце (1) и в образце с меньшей концентрацией эфирного масла (2). На рис. 2 представлены данные по изменению содержания метиловых эфиров С-18 моно- и диненасыщенных кислот в системах, хранившихся 1 г. Как видно, добавление в смесь масла орегано замедляло процесс окисления этих соединений, причем увеличение концентрации эфирного масла усиливало его активность. Обнаружено, что степень окисления зависела от положения двойной связи. Эфир кислоты 18:1ω7 более устойчив к окислению по сравнению с 18:1ω9. После 1 г автоокисления в образце 3 оставалось 84% МЭ олеиновой кислоты, 100% МЭ 11-октадеценовой кислоты. Линолевая кислота, содержащая 2 двойных связи, более чувствительна к окислению. Уже через 4 мес начиналось активное окисление метиллинолеата в образцах 1 и 2, однако скорость этого процесса в смеси с орегано была в 2 раза меньше. Увеличение концентрации эфирного масла в 100 раз значительно ингибировало окисление метиллинолеата. Так, к концу эксперимента в смесях 1, 2 и 3

оставалось 10, 20 и 60% метиллинолеата соответственно.

С увеличением числа двойных связей степень окисления МЭЖК увеличивалась. Особенно легко окислялись наиболее важные тетра- и гексаненасыщенные кислоты. На рис. 3 представлено изменение содержания МЭ кислот 20:4ω6, 22:4ω6 и 22:6ω3 в процессе автоокисления. Найдено, что в контрольном образце и в образце 2 наблюдалось окисление этих кислот уже через 1 мес. Наличие в смеси 0.002 мкг/мл эфирного масла орегано (образец 2) ингибировало процесс окисления на 15–20%. Так, через 2.5 мес в контрольном образце оставалось 41% эфира кислоты 20:4ω6, 46% – 22:4ω6 и только 22% – 22:6ω3, а в образце 2 их содержание было несколько больше: 56, 64 и 41% соответственно. Через 6.5 мес в контрольном образце и в образце 2 полностью окислялись МЭ 20:4ω6 и 22:4ω6, а эфир более активной 22:6ω3 исчезал уже к 5 мес автоокисления.

Увеличение концентрации масла орегано в 100 раз значительно замедляло окисление МЭ полиненасыщенных кислот. Сравнение данных рис. 1 и 3 показало, что в течение 4 мес процесс активного окисления тимола, карвакрола, γ-терпинена полностью ингибировал окисление МЭ кислот 20:4ω6, 22:4ω6 и 22:6ω3. После полного исчезновения фенольных соединений в качестве антиоксиданта продолжал действовать γ-терпинен и стали проявлять антиоксидантные свойства линалоол и другие минорные компоненты эфирного масла. Действие этих соединений не предотвратило дальнейшее окисление МЭЖК, но значительно замедлило этот процесс. К 12 мес хранения в образце 3 оставалось 15% эфира арахидоновой кислоты, но полностью окислялись эфиры полиненасыщенных кислот с 22 атомами углерода.

Таким образом, установлено, что эфирное масло орегано является эффективным антиоксидантом в системах, содержащих полиненасыщенные высшие жирные кислоты. Карвакрол и тимол – основные компоненты масла с антиоксидантным действием. Эфирные масла, содержащие фенольные производ-

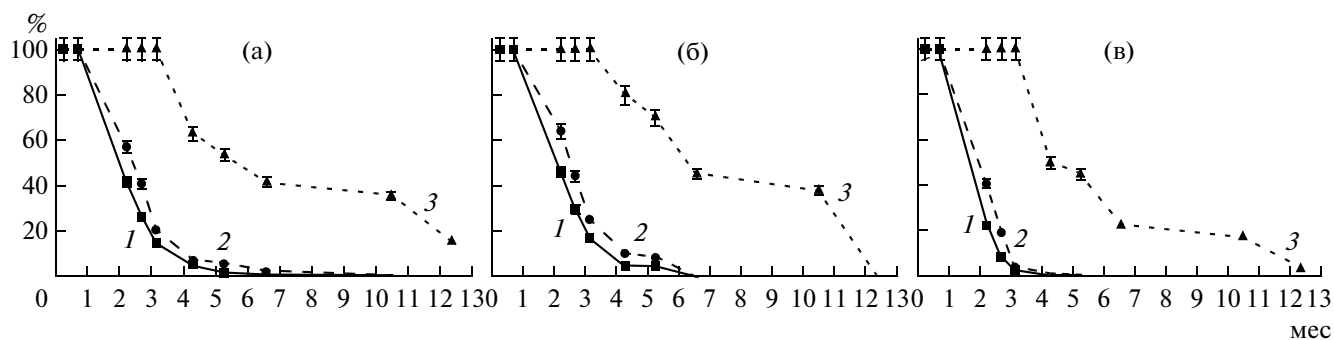


Рис. 3. Изменение содержания (%) метиловых эфиров кислот 20:4ω6 (а), 22:4ω6 (б) и 22:6ω3 (в) в образцах 1, 2 и 3 с увеличением длительности хранения (мес).

ные, могут быть с успехом использованы в качестве природных антиоксидантов в различных липидсодержащих пищевых продуктах, фармакологических препаратах и других объектах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Отделения химии и наук о материалах РАН 10-ОХНМ “Медицинская и биомолекулярная химия”, проект 01-РАН-01.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shahidi F., Ho Ch.-T.* Antioxidant Measurement and Applications. ACS Symp. Ser. Washington: Amer. Chem. Soc. 2007. V. 956. V. 4, P. 2–7.
2. *Shahidi F., Zhog Y.* Antioxidant Measurement and Applications. ACS Symp. Ser. Washington: Amer. Chem. Soc. 2007. V. 956. P. 36–66.
3. *Boyd L.C.* Omega-3 Fatty Acids. ACS Symp. Ser. Washington: Amer. Chem. Soc. 2001. V. 788. P. 258–279.
4. *Koroch A.R., Juliani H.R., Zygodlo J.A.* Bioactivity of essential oils and components. Flavour and Fragrances. / Ed. R.G. Berger. New York: Springer, 2007. P. 87–115.
5. *Baratta M.T., Dorman H.J.D., Deans S.G., Figueiredo A.C., Barosso J.G., Ruberto G.* // Flavour and Fragrance J. 1998. V. 13. P. 235–244.
6. *Wei A., Shibamoto T.* // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 5. P. 1737–1742.
7. *Lee K.G., Shibamoto T.* // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 15. P. 4947–4952.
8. *Jirovetz L., Buchbauer G., Stollova I., Stoyanova A., Krasnov A., Schmidt E.* // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 17. P. 6303–6307.
9. *Tomaino A., Cimino F., Zimbalatti V., Venuti V., Sulfaro V., De Pascuale A., Saija A.* // Food Chem. 2005. V. 89. P. 549–554.
10. *Ruberto G., Baratta M.T.* // Food Chem. 2000. V. 69. P. 167–174.
11. *Kulusic T., Radonic A., Katalinic V., Milos M.* // Food Chem. 2004. V. 85. P. 633–640.
12. *Hazzit M., Baalioamer A., Faleiro M.L., Miguel M.G.* // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 17. P. 6314–6321.
13. *Cabrera A.C., Prieto J.M.* // Food Chem. 2010. V. 118. P. 141–146.
14. *Huang D., Ou B., Prior R.L.* // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 6. P. 1841–1856.
15. *Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцев Е.В.* // Химия растит. сырья. 2004. № 3. С. 63–75.
16. *Yanagimoto K., Ouchi K., Lee K.G., Sibamoto T.* // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. № 3. P. 592–596.
17. *Мишарина Т.А., Поликов А.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 693–702.
18. *Мишарина Т.А., Самусенко А.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 3. С. 353–358.
19. *Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Калининченко* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 710–716.
20. *Recsan Z., Pagliuca G., Piretti M.V., Penzes L.G., Youdim K.A., Noble R.C., Deans S.G.* // J. Essent. Oil Res. 1997. V. 9. P. 53–56.
21. *Deans S.G., Noble R.C., Penzes L., Imre S.G.* // Age. 1993. V. 16. P. 71–74.
22. *Youdim K.A., Deans S.G.* // British J. Nutr. 2000. V. 83. p. 87–93.
23. *Farag R.S., Badei A., Hewedi F.M., Elbaroty G.S.A.* // J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989. V. 66. № 3. P. 792–799.
24. *Yanishlieva N.V., Mariniva E.M., Gordon M.H., Raneva V.G.* // Food Chem. 1999. V. 64. P. 59–66.
25. *Henry G.E., Momin R.A., Nair M.G., Dewitt D.L.* // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 8. P. 2231–2234.
26. *Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Медведева И.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 5. С. 599–604.
27. *Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P.* // Progr. Lip. Res. 2007. V. 46. P. 244–282.
28. *Мишарина Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 6. С. 726–732.
29. *Foti M.C., Ingold K.U.* // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 9. P. 2758–2765.

## Oregano Essential Oil as an Inhibitor of Higher Fatty Acid Oxidation

M. B. Terenina, T. A. Misharina, N. I. Krikunova, E. S. Alinkina,  
L. D. Fatkulina, and A. K. Vorob'yova

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

*e-mail: tmish@rambler.ru*

Received October 8, 2010

**Abstract**—Inhibition of the oxidation of fatty acids methyl esters by oregano essential oil was studied using capillary gas chromatography. A mixture of fatty acids which contained saturated, mono-, di-, and polyunsaturated acids with 16–24 carbon atoms was extracted from mice brain. Changes in the composition of esters in hexane solutions both in the presence of oregano essential oil and without it were examined during their autooxidation in light for 1 year. It was found that the oxidation rate of unsaturated fatty acids increases with increasing degree of their unsaturation. Oregano essential oil inhibited the oxidation process. Antioxidant activity of the oil increased with increase of its concentration. It was shown that carvacrol and thymol are the main antioxidant components of oregano oil.

## ПОЗДРАВЛЯЕМ ЮБИЛЯРА. ЮРИЮ АЛЕКСАНДРОВИЧУ ТРОЦЕНКО – 70 ЛЕТ



Исполнилось 70 лет Юрию Александровичу Троценко – профессору, доктору биологических наук, заведующему лабораторией радиоактивных изотопов в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН.

Юрий Александрович родился 13 июля 1941 г. в Свердловске (Екатеринбург). В 1958 г. окончил школу и поступил на биологический факультет Уральского государственного университета. Дипломную работу выполнял под руководством известного биохимика В.В. Юркевича. После окончания университета работал ассистентом на кафедре физиологии растений (зав. А.Т. Мокроносов). В 1964 г. был зачислен в аспирантуру на кафедре микробиологии Биолого-почвенного факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, где выполнил диссертационную работу по физиологии зеленых фототрофных бактерий под руководством Е.Н. Кондратьевой. С 1968 г. по настоящее время работает в Институте биохимии и физиологии микроорга-

низмов им. Г.К. Скрябина РАН, пройдя путь от младшего научного сотрудника до заведующего лабораторией. В 1992 г. защитил докторскую диссертацию.

Ю.А. Троценко – видный специалист-микробиолог, признанный лидер в изучении биологии и метаболизма аэробных метилотрофов. основополагающие работы юбиляра внесли существенный вклад в исследование метилотрофных микроорганизмов как перспективного научного направления в микробиологии, получив высокую оценку отечественных и зарубежных специалистов. Под руководством и при участии Ю.А. Троценко создана наиболее представительная коллекция охарактеризованных аэробных метилотрофов, основу которой составляют полученные сотрудниками лаборатории изоляты из различных географических районов, включая экстремальные экосистемы. С использованием полифазной таксономии описано и валидировано 10 новых родов и 30 видов.

Группой Ю.А. Троценко определены пути углеродного, азотного и фосфорного метаболизма у вновь выделенных экстремофильных метилотрофных бактерий, обнаружены также специальные механизмы термо- и осмоадаптации: образование гликопротеиновых слоев на поверхности клеточной оболочки и синтез органических биопротекторов – сахарозы, меланина и циклической аминокислоты – эктоина. Выделены и охарактеризованы ключевые ферменты биосинтеза эктоина у галофильных метилотрофов, расшифрованы трех- и четырехгенные структуры эктоинового оперона, коррелирующие со степенью солеустойчивости метанотрофов и метиловых бактерий, обнаружен новый транскрипционный белок-регулятор EctR.

Ю.А. Троценко сформулированы современные представления об уникальной биосферной роли, структурно-функциональном и таксономическом разнообразии аэробных метилотрофов, что способствовало эффективной реализации их биотехнологического потенциала. Совместно с сотрудниками лаборатории разработаны и успешно испытаны новые лабораторные регламенты биосинтеза широкого спектра продуктов из метана и метанола (ферменты, биостабилизаторы, биоразлагаемые сополимеры бутирата и валерата, экзополисахариды), а также способы биодegradации ряда высокотоксичных алифатических соединений.

Ю.А. Троценко – автор пяти монографий, более 350 научных статей в отечественных и зарубежных журналах, а также 12 изобретений. Юрий Александрович ведет большую научно-организационную работу в ИБФМ РАН и Пушкинском государственном университете. Под его руководством подготовлены и защищены 2 докторских, 28 кандидатских и 18 магистерских диссертаций, выполнено несколько крупных целевых проектов (РФФИ, ИНТАС, фонд Сороса, РНП, ФЦП). Ю.А. Троценко – член ряда ученых советов и редколлегии журналов: “Прикладная биохимия и микробиология”, “Микробиология”. Работы Ю.А. Троценко с соавт. были отмечены премией им. Д.К. Заболотного Президиума АН Украины (1982 г.), премией им. С.Н. Виноградского Президиума РАН (2009 г.), а также премиями издательства МАИК “Наука” (1997, 2009, 2010 гг.) за циклы статей в журналах “Микробиология” и “Прикладная биохимия и микробиология”.

Отмечая многолетнюю плодотворную научную деятельность Юрия Александровича, редакция журнала “Прикладная биохимия и микробиология” и коллектив возглавляемой им лаборатории желают юбиляру крепкого здоровья и дальнейших творческих успехов.

*Редколлегия журнала  
“Прикладная биохимия и микробиология”*